



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

PABLO GORDIANO ALEXANDRE BARBOSA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ABACAXI
UTILIZANDO AS TÉCNICAS QUECHERS E CG-EM**

**FORTALEZA
2013**

PABLO GORDIANO ALEXANDRE BARBOSA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO
MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ABACAXI UTILIZANDO AS TÉCNICAS
QUECHERS E CG-EM**

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

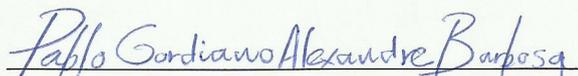
Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento

**FORTALEZA
2013**

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

-
- B211d Barbosa, Pablo Gordiano Alexandre.
Desenvolvimento de método analítico para determinação multirresíduo de agrotóxicos em abacaxi utilizando as técnicas QuEChERS e CG-EM / Pablo Gordiano Alexandre Barbosa.- 2013.
95 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, 2013.
Área de Concentração: Química Analítica.
Orientação: Prof. Dr Ronaldo Ferreira do Nascimento.
1. Abacaxi. 2. Cromatografia. 3. Pesticida. I. Título.

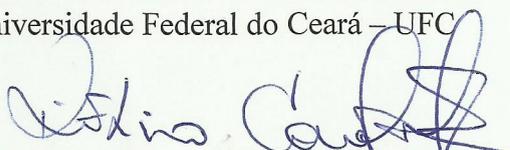
Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

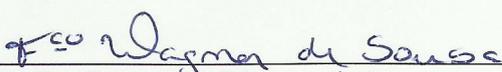

Pablo Gordiano Alexandre Barbosa

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 05/07/2013.

EXAMINADORES:


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


Prof. Dr. Rivelino Martins Cavalcante
Universidade Federal do Ceará – UFC


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

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado saúde, força, conhecimento e serenidade para a realização deste trabalho.

A minha família, em especial aos meus pais Marcelo Antônio Barbosa e Liduina Maria Alexandre Barbosa e meu tio José de Arimatéia pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento pela orientação e ensinamentos, fundamentais para minha formação profissional e científica, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.

A Universidade Federal do Ceará, em especial a todos os professores que contribuíram para a minha evolução intelectual e formação na graduação e pós-graduação.

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 para Certificação de Produtos de Caju (LABCAJU), Dra. Aparecida Liberato Milhome, que contribuiu ativamente para que este trabalho fosse realizado, como também os colegas Lucélia, Rubens, Renata e Cleidiane. Não esquecendo também da amizade e apoio das amigas Érika Sampaio e Solange Girão.

A minha namorada Fátima Itana, pelo carinho, apoio e companheirismo nos momentos felizes e nos momentos difíceis.

Aos membros da banca Prof. Dr. Rivelino Cavalcante e ao Prof. Dr. Wagner Sousa, pela atenção, disponibilidade e contribuição para a apresentação deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Análises de Traços (LAT), Ari Clecius, Diego, Jefferson, Carla, Gisele, Rouse, André Gadelha, André Henrique, Juliene, Cláudio, Nonato, Sarah, Vicente, Jhonyson, Clêrton, Cícero e, em especial, aos amigos Thiago Coutinho e Vitor Paulo, pela amizade e pelas conversas nos

momentos de descontração e de trabalho. Sem esquecer também dos amigos Wanda, Ivanildo e Marcelo pelos momentos de descontração na hora do café.

“O homem cósmico está com os pés solidamente firmados na Terra e com a cabeça gloriosamente banhada pela luz eterna do Céu e, quando contempla o Céu, não perde de vista a Terra.”

Huberto Rohden

RESUMO

O desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação multirresíduos de agrotóxicos em alimentos é fundamental para o monitoramento eficiente desses compostos nos produtos consumidos pela população, possibilitando aos órgãos reguladores a obtenção de resultados mais rápidos e confiáveis. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e validação de um método fundamentado nas técnicas QuEChERS-citrato modificada e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), para a determinação multirresíduo de 45 agrotóxicos em frutos de abacaxi. O método foi validado determinando-se a seletividade, a linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão, sendo configurado com detecção baseada em ionização por impacto de elétrons (IE) e monitoramento de íons selecionados (MIS). O método apresentou seletividade satisfatória para todos os compostos alvo, com exceção do cloroneb. Os limites de detecção variaram entre 0,005 mg/kg e 0,05 mg/kg e os limites de quantificação entre 0,015 mg/kg e 0,09 mg/kg. A linearidade foi adequada para a maioria dos analitos na faixa de concentração de 0,01 a 0,75 mg/kg, com coeficientes de correlação variando entre 0,9593 a 0,9996. Das amostras de abacaxi analisadas, aplicando-se o método desenvolvido, foram detectados os agrotóxicos fenpropatrina, piraclostrobina, ametrina, triflumizol e trifluralina.

Palavras-chave: QuEChERS, agrotóxicos, cromatografia

ABSTRACT

The development of analytical methods for multiresidue determination of pesticides in food is essential for the efficient monitoring of these compounds in products consumed by the population, enabling regulators to obtain faster and reliable results. This study aimed to the development and validation of a method based on techniques modified QuEChERS-citrate and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) for the multiresidue determination of 45 pesticides in fruits of pineapple. The method was validated by determining the selectivity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision and accuracy, being configured with detection based on electron impact ionization (EI) and selected ion monitoring (SIM). The method was satisfactory selectivity for all target compounds, except chloroneb. Limits of detection ranged from 0.005 mg/kg and 0.05 mg/kg and limits of quantification between 0.015 mg/kg and 0.09 mg/kg. The linearity was adequate for most analytes at a range of concentration of 0.01 to 0.75 mg/kg with correlation coefficients ranged from 0.9593 to 0.9996. Of pineapple samples analyzed, applying the developed method, were detected the pesticides fenpropathrin, pyraclostrobin, ametryn, triflumizole and trifluralin.

Keywords: QuEChERS, pesticides, chromatography

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivos gerais	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 Agrotóxicos	16
3.1.1 Classificação dos Agrotóxicos	19
3.1.1.1 Classificação quanto ao grupo químico	19
3.1.1.1.1 Organoclorados	19
3.1.1.1.2 Organofosforados	21
3.1.1.1.3 Piretróides	22
3.1.1.1.4 Carbamatos	23
3.1.1.1.5 Triazinas	24
3.1.1.1.6 Sulfoniluréias	25
3.1.1.1.7 Bupiridílios	26
3.1.1.1.8 Nitropesticidas	27
3.1.1.2 Classificação quanto ao organismo-alvo	27
3.1.1.3 Classificação Toxicológica	28
3.2 Aspectos Gerais da Cultura do Abacaxi	29
3.2.1 Principais Pragas na Cultura do Abacaxi	30
3.2.2 Características Químicas e Físico-Químicas do Abacaxi	30
3.3 Evolução das Técnicas de Preparo de Amostra para Determinação Multirresíduo de Agrotóxicos em Alimentos	31
3.3.1 Métodos Modernos de Preparo de Amostra na Determinação Multirresíduo de Agrotóxicos	33
3.4 Método QuEChERS	33
3.4.1 O Tamanho da amostra	34
3.4.2 O Solvente de Extração	35
3.4.3 A Adição de Sais e a Separação de Fases	36
3.4.4 Limpeza do Extrato (<i>Clean up</i>)	36
3.5 O uso da Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas na Determinação de Agrotóxicos	37
3.6 Efeito Matriz na Quantificação de Agrotóxicos por Cromatografia Gasosa	39
3.6.1 Efeito Matriz no Injetor	39

3.6.2 Efeito Matriz na Coluna Cromatográfica e no Detector	41
3.7 Validação de Métodos Analíticos	42
3.7.1 Seletividade	42
3.7.2 Faixa Linear/ Intervalo	43
3.7.3 Linearidade.....	43
3.7.4 Limite de Detecção (LD)	44
3.7.5 Limite de Quantificação (LQ)	45
3.7.6 Precisão.....	45
3.7.6.1 Repetitividade	46
3.7.6.2 Precisão Intermediária.....	47
3.7.6.3 Reprodutibilidade.....	47
3.7.7 Exatidão.....	48
3.7.8 Robustez.....	49
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	51
4.1 Preparo das Amostras para os Estudos de Validação.....	51
4.2 Reagentes.....	51
4.2.1 Preparo das Soluções Padrão Estoque dos Agrotóxicos.....	53
4.3 Equipamentos	53
4.4 Curvas Analíticas.....	53
4.4.1 Preparo do Extrato da Amostra	54
4.4.2 Preparo das Soluções Padrão das Curvas Analíticas.....	56
4.5 Análises Cromatográficas.....	56
4.6 Validação do Método	58
4.6.1 Estudo de Seletividade.....	58
4.6.2 Estudo da Linearidade e Faixa Linear	58
4.6.3 Estimativa dos Limites de Detecção (LD)	58
4.6.4 Estimativas dos Limites de Quantificação (LQ).....	59
4.6.5 Precisão.....	59
4.6.5.1 Repetitividade	59
4.6.5.2 Precisão Intermediária.....	59
4.6.6 Exatidão.....	60
4.6.6.1 Estudos de Recuperação	60
4.7 Análise de Amostras de Abacaxi Obtidas do Mercado Local.....	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	62
5.1 Aplicação do Método QuEChERS-Citrato Modificado – (Preparo da amostra)	62
5.2 Identificação e Quantificação dos Agrotóxicos por CG-EM	63

5.3 Validação do Método	69
5.3.1 Seletividade.....	69
5.3.2 Linearidade e faixa Linear	72
5.3.2.1 Teste de Significância dos Parâmetros de Calibração.....	74
5.3.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	77
5.3.4 Precisão.....	80
5.3.5 Exatidão.....	83
5.3.5.1 Estudos de Recuperação	83
5.4 Análises de Amostras de Abacaxi do Mercado Local	85
6. CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

A elevada demanda da sociedade por alimentos iniciada no século XVIII, com o início da industrialização, motivou o desenvolvimento de novas modalidades agrícolas, os agroecossistemas e os monocultivos. Essas formas de cultivo, apesar de favorecer a produção de alimentos em larga escala, potencializaram o surgimento de pragas, ervas daninhas e microrganismos, trazendo grandes problemas para o rendimento da produção agrícola, gerando a necessidade do desenvolvimento e aplicação de métodos artificiais de controle, como agrotóxicos e fertilizantes (RODRIGUES,2006).

Os agrotóxicos são compostos químicos que são classificados em diversos grupos de substâncias consideradas potencialmente tóxicas aos seres humanos e outros seres vivos. Apesar de atualmente se conhecer os efeitos nocivos dos agrotóxicos sobre o meio ambiente, a sua aplicação em várias etapas do cultivo de alimentos agrícolas, incluindo as etapas pós-colheita, que ocorrem durante o armazenamento dos produtos, tem grande relevância para a proteção e preservação dos alimentos (JARDIM; ANDRADE, 2009).

Considerando os conhecidos riscos que os agrotóxicos oferecem à saúde humana, sua persistência no meio ambiente e tendência de bioacumulação, a determinação dos resíduos desses compostos em alimentos e amostras ambientais é extremamente relevante para o monitoramento da exposição humana e do ecossistema a essas substâncias. O monitoramento dos níveis de agrotóxicos nos alimentos permite a avaliação da conformidade da produção agrícola e a tomada de decisões regulatórias comerciais para a segurança alimentar da população (JARDIM; ANDRADE, 2009; PRESTES *et al.*, 2009).

A cultura do abacaxi é uma das culturas de frutos tropicais mais relevantes no mercado agrícola, sendo também uma das mais exigentes. No Brasil, o abacaxi é produzido em praticamente todos os estados, possuindo grande aceitação pelo mercado interno como também pelo mercado externo, o que faz do país um dos maiores produtores mundiais ao lado da Tailândia, China, Filipinas, Índia e Costa Rica (THÉ, 2010). Em 2011, o Brasil apresentou 55.690 hectares de área plantada de abacaxi com uma produção de 1.444.387 toneladas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011).

Dentre os fatores que podem gerar influência negativa sobre a produção e a qualidade dos frutos de abacaxi destacam-se ervas daninhas e patógenos como o *Fusarium subglutinans*, agente causador da “fusariose”, presente nas principais regiões produtoras do país. Para controle de doenças nas lavouras de abacaxi é necessária a aplicação de agrotóxicos como a ametrina (*herbicida*), a simazina (*herbicida*), deltametrina (*inseticida*), dentre outros (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012a; EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2010). A aplicação desses produtos no controle de pragas no cultivo de abacaxi, torna necessário o monitoramento das concentrações tanto dos agrotóxicos recomendados para esta cultura, como dos não recomendados, com o intuito de avaliar e fiscalizar os produtores quanto aos resíduos desses compostos nos frutos consumidos pela população.

O estabelecimento e a regulamentação dos limites máximos de resíduos (LMRs) em alimentos pelas agências governamentais, tem se intensificado atualmente como mecanismos de garantia da segurança dos consumidores e do comércio. No Brasil, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) é a instituição responsável por estabelecer e regulamentar os LMRs para diversos tipos de alimentos comercializados no país (JARDIM; ANDRADE, 2009). Como uma das principais ações de controle para avaliar a qualidade dos alimentos, a ANVISA desenvolve o *Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA)*, monitorando periodicamente diversos alimentos *in natura*, inclusive o abacaxi, para investigar a conformidade desses produtos quanto à identidade e o teor dos resíduos de agrotóxicos presentes (ABAD, 2006; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007).

Tendo em vista a elevada variedade de agrotóxicos empregados nas culturas agrícolas nos dias atuais, muitas pesquisas têm sido realizadas para o desenvolvimento, otimização e validação de métodos analíticos para a determinação de resíduos dessas substâncias em alimentos e outras matrizes. O desenvolvimento de novas metodologias para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos tem possibilitado a obtenção de resultados mais precisos, confiáveis e rápidos (JARDIM; ANDRADE, 2009).

Dentro deste contexto, este trabalho visa desenvolver e validar uma metodologia analítica eficiente para a determinação multirresíduo de 45 agrotóxicos em abacaxi, empregando o método QuEChERS-citrato modificado no preparo da amostra e a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) na identificação e quantificação dos analitos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento e validação de metodologia analítica viável para a determinação multirresíduo de agrotóxicos de diferentes classes em abacaxi, adaptando a técnica QuEChERS, na etapa de preparo da amostra e a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, na identificação e quantificação dos compostos alvo.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver estudos de modificação do método QuEChERS, considerando a versão QuEChERS-citrato, visando produção de extratos mais limpos para análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).
- Aplicar o método multirresíduo validado para identificar e quantificar os agrotóxicos alvo em amostras de abacaxi obtidas no mercado local da cidade de Fortaleza e região metropolitana.
- Correlacionar as concentrações estimadas nas amostras com os limites máximos de resíduo (LMRs) estabelecidos na legislação, quando aplicável, para os pesticidas detectados.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Agrotóxicos

Agrotóxicos, defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas são apenas alguns dos variados termos utilizados para designar substâncias químicas empregadas no controle de pragas e doenças que possam atingir as culturas agrícolas (ABAD, 2006). O *Codex Alimentarius* define pesticida como sendo toda e qualquer substância utilizada com o propósito de prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar qualquer peste, incluindo espécies indesejáveis de plantas, insetos ou animais, durante as etapas de produção, armazenamento, transporte, distribuição e processamento do alimento ou ração animal (KOLBERG, 2008).

Existem registros de diferentes substâncias orgânicas e inorgânicas utilizadas por gregos e romanos como pesticidas desde a antiguidade, como por exemplo, o piretro, um pesticida de origem natural, o arsênio e o enxofre (AMARAL, 2007; GALLI *et al.*, 2006). Durante muito tempo substâncias inorgânicas como sais de arsênio e compostos organometálicos foram usados como pesticidas, porém eram bastante tóxicos aos seres humanos e outros mamíferos, principalmente nos níveis de dosagem que eram requeridos para torná-los efetivos. No período da Segunda Guerra Mundial, uma grande variedade de inseticidas orgânicos foi desenvolvida, substituindo significativamente as substâncias inorgânicas e organometálicas (BAIRD, 2002).

Em torno de 1939, Paul Meuller descobriu propriedades inseticidas do DDT (*p*-diclorodifeniltricloroetano), que possibilitou uma espantosa elevação da produção agrícola mundial, sendo visto como um composto “miraculoso”, capaz de evitar a ação de pragas incontroláveis na época (PIMENTEL, 2007). A descoberta do DDT como inseticida eficiente propiciou o desenvolvimento de agrotóxicos constituídos de compostos organossintéticos. Posteriormente, descobriu-se uma série de características danosas do DDT e de outros organossintéticos semelhantes (organoclorados), como sua forte tendência de bioacumulação e reduzida taxa de degradação no meio ambiente, gerando a necessidade do desenvolvimento de compostos menos agressivos (AMARAL, 2007; BAIRD, 2002).

Em 1897 o alemão Michaelis e o russo Arbuzov foram os pioneiros a trabalhar com ésteres contendo o elemento fósforo, que dariam origem aos pesticidas organofosforados. Não obstante, o progresso dos organofosforados só ocorreu em torno de 1934 devido aos trabalhos do alemão Gerhard Schrader. O primeiro pesticida organofosforados aplicado como inseticida de ação sistêmica foi o OMPA (*octamethyl pyrophosphoro amidate*) em 1941, sendo posteriormente chamado usualmente de “Scharadan”, em homenagem a Schrader, seu descobridor (MACIEL, 2005). Em 1953 foi sintetizado o primeiro pesticida carbâmico, o carbaril (N-metil- α -naftilcarbamato), mostrando-se muito menos tóxicos a mamíferos quando comparados aos organofosforados (PERES, 2000).

O desenvolvimento dos agrotóxicos no período que sucedeu a Segunda Guerra configurou o perfil da produção agrícola mundial, havendo uma forte relação entre a agricultura moderna intensiva e a utilização de agrotóxicos. A partir da década de 1960 esse modelo de produção se estendeu aos países do Terceiro Mundo, originando um processo conhecido como “Revolução Verde” (SPADOTTO, 2012). Apesar dos benefícios que o uso de agrotóxicos possibilitou à agricultura, seus efeitos toxicológicos têm gerado danos significativos nos seres vivos e nos ecossistemas, obrigando aos países intensificar pesquisas relativas ao assunto para criar medidas legais de controle, restrição ou mesmo proibição do emprego dessas substâncias (FLORES *et al.*, 2004).

A aplicação de agrotóxicos organossintéticos no Brasil iniciou-se em torno de 1943, porém, foi apenas a partir da década de 1970 que o uso desses compostos na agricultura passou a ocorrer em maior escala, especialmente no sul do país, nas monoculturas tradicionais, como ferramenta base para a mitigação de infestações e doenças nas lavouras (AMARAL, 2007; SPADOTTO, 2012). Na última década, o uso de agrotóxicos no Brasil elevou-se excessivamente, considerando que entre 2001 e 2008 a comercialização de venenos agrícolas saltou de um valor em torno de U\$ 2 bilhões para U\$ 7 bilhões, tornando o país o maior consumidor de agrotóxicos do mundo. Em 2009 o consumo de venenos agrícolas ampliou-se ultrapassando a marca de 1 milhão de toneladas, o que representa um consumo de 5,2 Kg por habitante (LONDRES, 2011).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável por regulamentar e fiscalizar o uso de agrotóxicos na produção de alimentos, estabelecendo os Limites Máximos de Resíduo (LMR) para essas substâncias em diversos alimentos comercializados (JARDIM; ANDRADE, 2009). O limite máximo de resíduo (LMR) pode ser definido como sendo a *quantidade máxima de resíduo do agrotóxico, ou afim, oficialmente aceita no alimento, em decorrência de sua aplicação adequada, numa fase específica, desde a produção até o consumo, expressa em miligramas da substância ou de seus metabólitos por quilograma do alimento (mg/Kg)* (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007; FERMAN; ANTUNES, 2009). Os LMRs são baseados nas Boas Práticas de Produção Agrícola, de forma que, os alimentos e produtos agrícolas que possuam agrotóxicos em níveis que respeitem os limites máximo de resíduos determinados são considerados toxicologicamente aceitos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012).

Os LMRs estabelecidos para cada agrotóxico são derivados de estudos de campo, exigidos para cada cultura alimentar, considerando-se a Ingestão Diária Aceitável (IDA), que é a *quantidade máxima do agrotóxico, que ingerida diariamente durante toda a vida, parece não oferecer risco apreciável à saúde, levando-se em consideração os conhecimentos atuais*. A IDA é expressa em miligrama do agrotóxico por quilograma de peso corpóreo (mg/Kg p.c.), sendo determinada, assim como os LMRs, para cada ingrediente ativo com base em estudos das propriedades físico-químicas, metabólicas, farmacológicas e toxicológicas dos agrotóxicos (FERMAN; ANTUNES, 2009).

O Brasil possui uma legislação moderna, exigente e restritiva, no que se refere a agrotóxicos, que dispõe sobre pontos que vão além da necessidade de comprovação da eficiência agrônômica, das garantias de redução dos riscos aos seres humanos (seja de caráter ocupacional, alimentar e de saúde pública) e das ameaças ao meio ambiente ocasionadas por essas substâncias químicas (SPADOTTO, 2012). A Lei 7.802 de 1989 foi a primeira a ser editada para garantir a segurança do uso de agrotóxicos, sendo regulamentada pelo decreto N° 4.074 de 2002 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012 b; COOPERCITRUS, 2012).

Órgãos internacionais como a *Food and Drugs Administration* (FDA), a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) e a *World Health Organization* (WHO) atuam na regulamentação e no controle do uso de agrotóxicos em todo o mundo, estabelecendo normas e padrões a serem seguidos pelos produtores e pelo mercado.

3.1.1 Classificação dos Agrotóxicos

Os agrotóxicos compreendem uma vasta variedade de substâncias químicas, com diferentes grupos funcionais em suas moléculas, conseqüentemente com diferentes mecanismos de ação, biotransformação e eliminação (GALLI *et al.*, 2006). A classificação desses produtos, é feita, portanto, com base no grupo químico funcional da substância (classificação química), no organismo-alvo de ação e no nível de toxicidade (classificação toxicológica) (BRASIL, 2012).

3.1.1.1 Classificação quanto ao grupo químico

Com relação ao grupamento químico principal da constituição das moléculas dos agrotóxicos, podemos citar dentre as principais classes (GALLI *et al.*, 2006):

- a) Organoclorados;
- b) Organofosforados;
- c) Piretróides;
- d) Carbamatos;
- e) Triazinas;
- f) Sulfoniluréias;
- g) Bipiridílios;
- h) Nitropesticidas

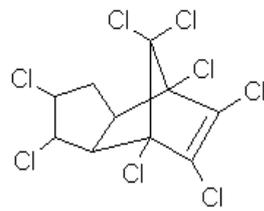
3.1.1.1.1 Organoclorados

Os compostos organoclorados têm sua estrutura química baseada em cadeias hidrocarbônicas com a presença de átomos de cloro (DEL GRANDE; REZENDE, 2003). São agrupados em diferentes classes: derivados do diclorodifeniletano, ciclodienos, clorobenzenos e clorociclohexanos (ALVES, 2005).

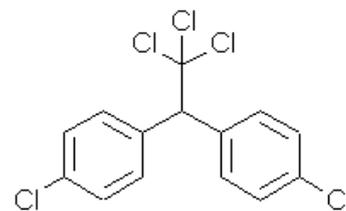
São relativamente inertes, com baixa tendência de degradação, tendo sua estabilidade química associada as ligações carbono-cloro (DEL GRANDE; REZENDE, 2003; RISSATO *et al.*, 2004). Possuem elevada hidrofobicidade, sendo pouco solúveis em água e bastante solúveis em meios semelhantes a hidrocarbonetos (meios pouco polares), tais como óleos e tecidos adiposos, sendo portanto, extremamente bioassolúveis (BAIRD, 2002; RISSATO *et al.*, 2004).

Devido a sua elevada toxicidade, estabilidade e baixa biodegradabilidade, esses compostos têm sido bastante estudados. Alguns organoclorados podem persistir em torno de 15 a 20 anos no solo e através de processos de lixiviação ser transportados aos corpos hídricos, causando por longo prazo a contaminação do meio ambiente e dos seres vivos. Dentre os principais representantes dos organoclorados, temos o DDT, a aldrina, os endossulfans, os lindanos, hexaclorobenzeno, heptacloro, endrin, mirex e o clordano (RISSATO *et al.*, 2004).

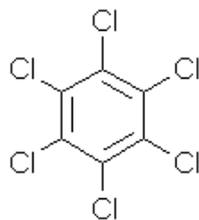
Figura 1 – Estruturas químicas dos organoclorados clordano, DDT, hexaclorobenzeno e aldrina (IUPAC, 2012).



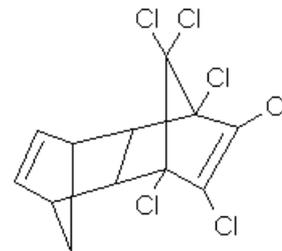
Clordano



DDT



Hexaclorobenzeno



Aldrina

A principal ação tóxica aguda dos organoclorados é sobre o sistema nervoso, induzindo a um estado de hiperexcitação cerebral, com este efeito se

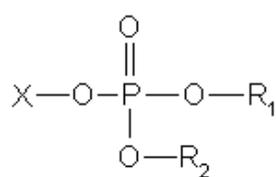
manifestando principalmente na forma de convulsões (REIGART; ROBERTS, 2012). Sabe-se também, que estes compostos, tem grande potencial carcinogênico, tendo seu uso restringido ou até mesmo proibido em muitos países (FLORES *et al.*, 2004).

3.1.1.1.2 Organofosforados

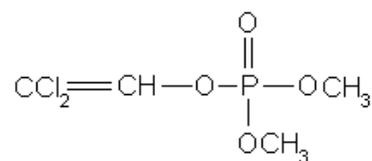
Os agrotóxicos organofosforados são compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, do ácido tiosfosfórico, do ácido ditiosfosfórico e fosfônico (AMARAL, 2007; BRASIL, 2012). Suas moléculas, contém um átomo central de fósforo pentavalente, ao qual está conectado um átomo de oxigênio ou enxofre, unidos ao átomo de fósforo por meio de ligação dupla, havendo dois grupos metóxi ou etóxi unidos ao mesmo átomo de fósforo através de uma ligação simples e um grupo X mais complexo, conectado também ao fósforo, usualmente através de um átomo de oxigênio ou enxofre mediante ligação simples (BAIRD, 2002).

A atividade desses compostos depende dos diversos radicais R_1 e R_2 (metóxi ou etóxi) ligados ao átomo de fósforo, de forma que pequenas modificações nestes grupamentos podem afetar significativamente a toxicidade do composto em questão (MACIEL, 2005). Dentre as três subclasses principais de organofosforados, podemos destacar: os fosfatos, os fosfotioatos e os fosforoditioatos (BAIRD, 2002).

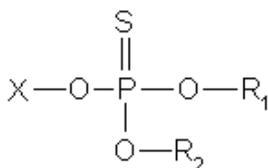
Figura 2 – Estruturas genéricas das principais classes de organofosforados e exemplos de representantes de cada classe (BAIRD, 2002).



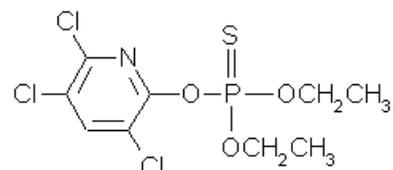
fosfato



diclorvos

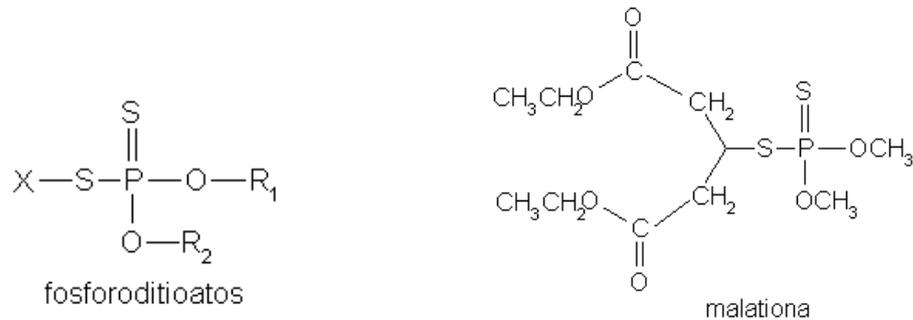


fosforotioatos



clorpirifós

Figura 2 – (continuação) - Estruturas genéricas das principais classes de organofosforados e exemplos de representantes de cada classe (BAIRD, 2002).

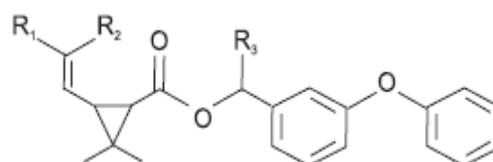


Quando comparados aos organoclorados, os organofosforados são mais tóxicos, considerando um nível de intoxicação aguda. Porém, são menos estáveis quimicamente, não possuindo tendência de bioacumulação. O seu mecanismo de ação tóxica, baseia-se na inibição da enzima acetilcolinesterase, que atua nas sinapses do sistema nervoso central e periférico (MORAIS, 2009; PINHO, 2007).

3.1.1.1.3 Piretróides

Os piretróides são pesticidas sintéticos com estrutura química semelhante à piretrina, componente ativo natural extraído das flores do *Chrysanthemum cinerariaefolium*. As piretrinas, são usadas há alguns séculos no controle de várias espécies de insetos, sendo consideradas inseticidas ideais por terem baixa toxicidade para mamíferos e um vasto espectro de ação, apresentando também baixo poder residual e efetividade em doses reduzidas (CHEN; WANG, 1996; VIERA; NEVES; QUEIROZ, 2007).

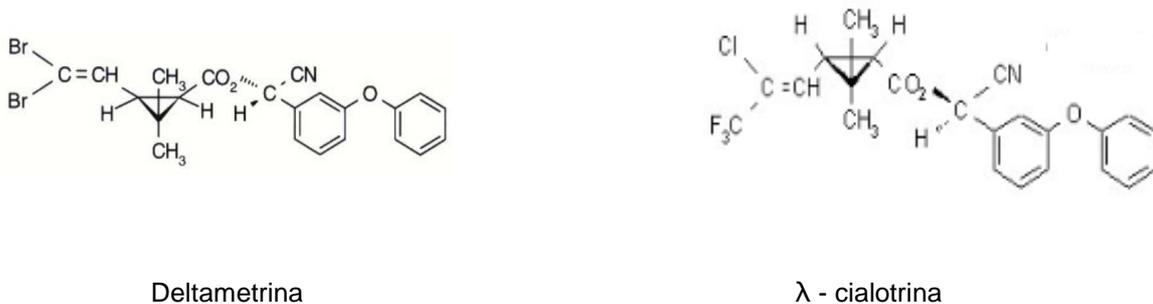
Figura 3 – Estrutura genérica de piretróides sintéticos.



Apesar de suas características bastante positivas, as piretrinas possuem instabilidade frente à luz, o que limita o seu uso contra pestes nas culturas agrícolas. Porém, químicos orgânicos ao redor do mundo, levando em consideração suas propriedades marcantes como inseticida, desenvolveram pesquisas para mostrar

que os centros de fotolabilidade molecular poderiam ser substituídos por outros grupamentos, produzindo sinteticamente derivados estáveis à ação da luz e que mantivessem sua atividade inseticida eficiente e baixa toxicidade a mamíferos, desenvolvendo assim os piretróides (CHEN; WANG, 1996).

Figura 4 – Estruturas químicas dos piretróides deltametrina e λ - cialotrina.

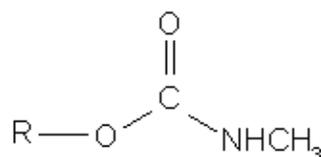


Muitos piretróides são formulados em combinação com componentes denominados sinergistas, como por exemplo, o butóxido de piperonila, que é um antioxidante que potencializa a ação pesticida dos piretróides (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2012). O mecanismo de ação inseticida dos piretróides fundamenta-se na alteração da cinética de condutância dos canais de sódio do sistema nervoso dos insetos (SODERLUND *et al.*, 2002).

3.1.1.1.4 Carbamatos

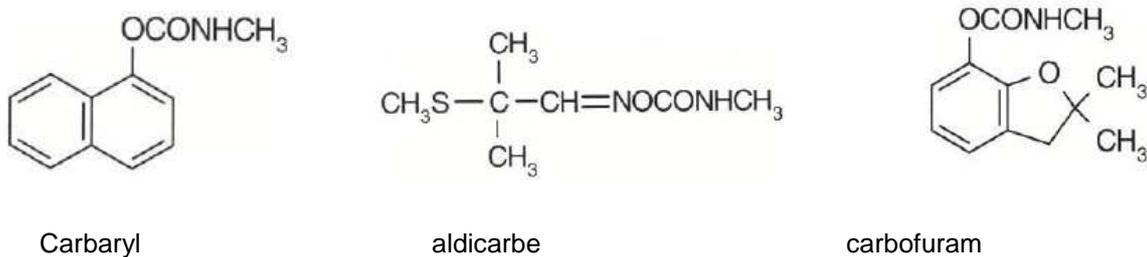
Os carbamatos são compostos derivados do ácido carbâmico, sendo instáveis sob condições neutras e alcalinas em temperatura ambiente. Os agrotóxicos deste grupo possuem alta atividade inseticida, baixa ação residual e reduzida toxicidade em longo prazo (GOULART, 2010). O mecanismo de ação dos carbamatos é semelhante ao dos organofosforados, também se baseando na inibição da enzima acetilcolinesterase, havendo algumas suspeitas de também serem carcinogênicos e mutagênicos (BOGIALLI *et al.*, 2004).

Figura 5 – Estrutura química genérica dos carbamatos



Os carbamatos tem curta duração no ambiente porque reagem com a água (hidrólise). Os produtos de hidrólise não possuem atividade pesticida e são pouco tóxicos. A reação com a água envolve a cisão de uma das ligações simples do carbono central (BAIRD, 2002; GOULART, 2010). Os produtos de reações de oxidação dos carbamatos também possuem ação anticolinesterásica (GOULART, 2010). Dentre os principais representantes dos pesticidas carbamatos, podemos destacar o carbaril, o aldicarbe e o carbofurano.

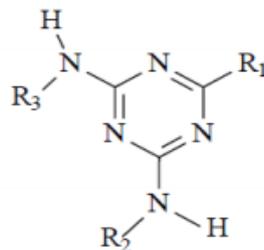
Figura 6 – Estruturas químicas dos carbamatos carbaril, aldicarbe e carbofurano.



3.1.1.1.5 Triazinas

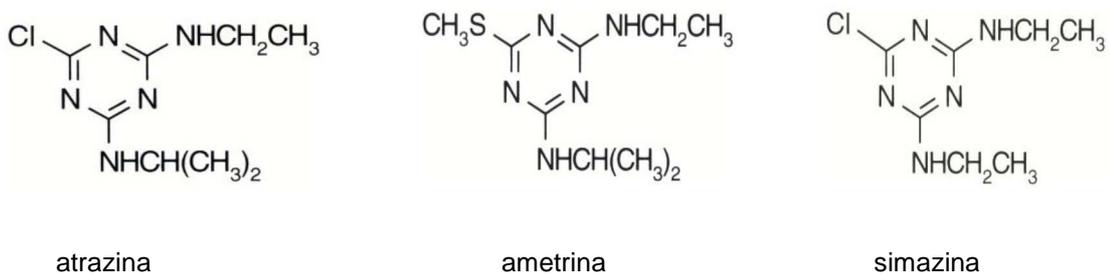
As triazinas são substâncias derivadas da s-triazina, sendo compostos com estrutura química baseada num sistema heterocíclico de 6 átomos, caracterizado pela presença de átomos de nitrogênio simetricamente arranjados nas posições 1,3 e 5, de maneira que nas posições 2 e 4, poderão haver diferentes grupos amino, dependendo dos grupos R₂ e R₃ ligados aos átomos de nitrogênio, e, na posição 6 do sistema cíclico, haverá um substituinte R₁. Os grupos R₁, R₂ e R₃ caracterizam cada tipo diferente de triazina (DOPICO *et al.*, 2002; GARBELLINI *et al.*, 2007).

Figura 7- Estrutura química genérica das triazinas.



Os produtos de degradação das triazinas possuem elevada toxicidade, sendo muito persistentes nos solos, na água e em plantas e animais (GARBELLINI *et al.*, 2007; SOARES, 2011). O mecanismo de ação das triazinas é baseado na inibição fotossintética das plantas, sendo, por esta razão, empregadas no controle de ervas daninhas (SILVA, 2010). Dentre as principais representantes das triazinas, temos: atrazina, ametrina e simazina (Figura 8).

Figura 8 – Estruturas das triazinas atrazina, ametrina e simazina.

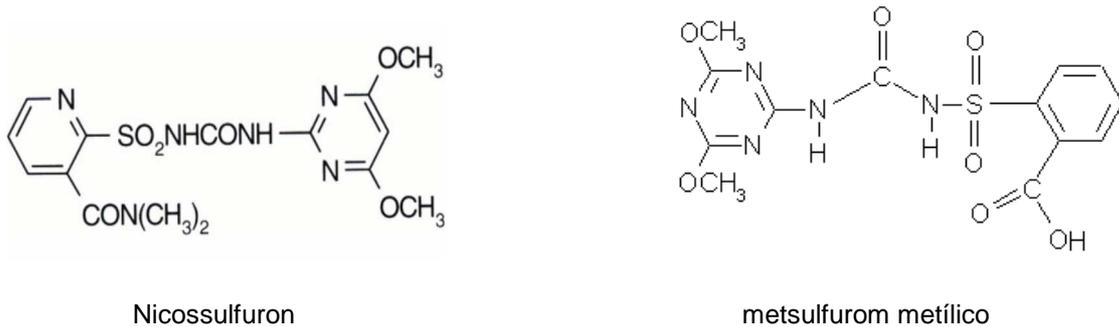


3.1.1.1.6 Sulfoniluréias

As sulfoniluréias são compostos que possuem sua estrutura química baseada na presença de uma ponte “sulfoniluréia” conectando duas ramificações laterais. A primeira ramificação pode ser constituída tanto por grupos alifáticos, como por aromáticos ou grupamentos heterocíclicos, que são conectados pela ponte sulfoniluréia, que pode ser uma triazina substituída ou uma pirimidina (INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS, 2011). Geralmente possuem alta solubilidade em água e reduzida absorção no solo. São pouco tóxicas e possuem significativa seletividade em sua ação (SORENSEN *et al.*, 2003).

O mecanismo de ação das sulfoniluréias é baseado na inibição da enzima acetolactato sintase (ALS), prejudicando a síntese de aminoácidos valina, leucina e isoleucina, gerando o efeito de inibição da divisão celular em plantas, sendo portanto empregadas como herbicidas. No geral esses agrotóxicos possuem significativa seletividade a algumas culturas (SALMAZO, 2009).

Figura 9 – Estruturas das sulfoniluréias nicossulfurom e metsulfurom metílico.

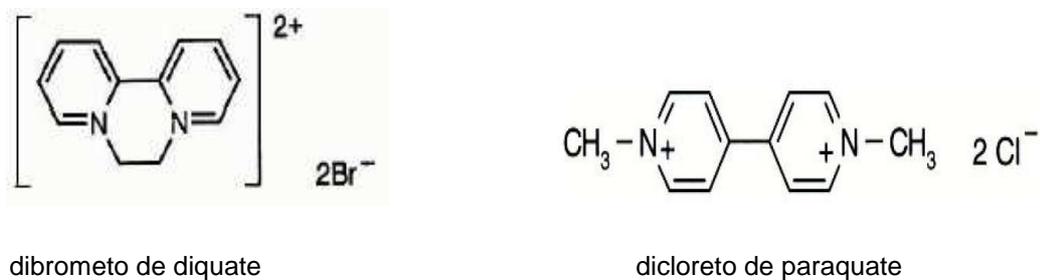


3.1.1.1.7 Bipiridílios

Os bipiridílios são sais de amônio diquaternário, caracterizando-se como cátions bivalentes extremamente solúveis, estáveis na presença de luz e calor. Possuem elevada toxicidade ao meio ambiente e a saúde humana (GALLI, 2006). Esses agrotóxicos atuam como herbicidas bloqueando a respiração e a fotossíntese dos vegetais (ROHR, 2008).

Bipiridílios como o paraquate, capturam elétrons provenientes da fotossíntese do vegetal, gerando radicais tóxicos. Estes radicais são instáveis e rapidamente sofrem oxidação produzindo os radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio. Os superóxidos e o peróxido gerados reagem produzindo radicais hidroxil e oxigênio livre (singlete), que são os agentes efetivamente responsáveis pelos efeitos tóxicos sobre as ervas daninhas, pois promovem a degradação das membranas celulares ocasionando a morte dos tecidos (VARGAS, 2003).

Figura 10 – Estruturas do bipiridílios dibrometo de diquate.e dicloreto de paraquate.



3.1.1.1.8 Nitropesticidas

Estes agrotóxicos apresentam em sua estrutura química o grupo nitro (NO_2), sendo muito tóxicos. Os nitropesticidas são divididos em quatro grupos básicos: derivados de nitrofenol, derivados de dinitroanilinas, nitroorganofosforados e nitroorganoclorados. Dentre os principais representantes dos nitropesticidas podemos citar o metil paration (nitroorganofosforado), a trifluralina (dinitroanilina) e o *p*-nitrofenol (derivado do nitrofenol) (GALLI, 2006).

Figura 11 – Estruturas dos nitropesticidas metil paration, trifluralina e *p*-nitrofenol.



3.1.1.2 Classificação quanto ao organismo-alvo

Quanto ao organismo-alvo de ação os agrotóxicos são classificados conforme o Quadro 1.

Quadro 1- Classificação dos agrotóxicos quanto ao organismo-alvo (BAIRD, 2002; BRASIL, 2012).

Tipo de agrotóxico	Organismo-alvo	Representantes
Inseticida	insetos	Organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides
Herbicida	Ervas daninhas	Triazinas, sulfoniluréias e bipiridílios
Fungicida	Fungos	hexaclorobenzeno(organoclorado), a captana (dicarboximida) e o etileno- <i>bis</i> -ditiocarbamato (ditiocarmabamato).

Quadro 1- (continuação) - Classificação dos agrotóxicos quanto ao organismo-alvo (BAIRD, 2002; BRASIL, 2012).

Tipo de agrotóxico	Organismo-alvo	Representantes
Raticidas	Roedores	Fosforeto de zinco, anidrido de arsênio.
Molusquicidas	Caracóis, lesmas	Metaldeído
Nematicidas	Nematóides	Carbofuran, aldicarb, terbufós
Acaricidas	ácaros	Tetradifon (clorodifenilsulfona), dicofol (organoclorado)
Bactericidas	Bactérias	-
Algicidas	Algas	Brometos de alquilbenzilamônio

3.1.1.3 Classificação Toxicológica

Esta classificação é de extrema relevância para o conhecimento do poder tóxico de cada agrotóxico, do ponto de vista de seus efeitos agudos. A tabela 1 relaciona as classes toxicológicas com a “Dose Letal 50” (DL₅₀) oral e dérmica e com a Concentração Letal 50 (CL₅₀) de formulações líquidas e sólidas dos agrotóxicos.

Tabela 1 – Classificação toxicológica dos agrotóxicos segundo DL₅₀ oral e dérmica e CL₅₀.

Toxicidade	DL₅₀ oral		DL₅₀ dérmico		CL₅₀ inalatório
	(mg Kg⁻¹ peso corporal)		(mg Kg⁻¹ peso corporal)		(mg L⁻¹)
	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido	
Extremamente tóxico	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40	≤ 0,2
Altamente tóxico	20 – 200	5-50	10 – 100	40 – 400	0,2- 2,0
Medianamente tóxico	200-2000	50-500	100 – 1000	400 – 4000	2,0 – 20,0
Pouco tóxico	> 2000	> 500	> 1000	> 4000	> 20,0

Os termos DL₅₀ (Dose Letal 50) e CL₅₀ (Concentração Letal 50) são parâmetros toxicológicos experimentais utilizados para a avaliação do nível de toxicidade de uma substância química. A DL₅₀ é definida como sendo a quantidade de uma substância que, quando administrada em uma única dose por via oral ou dérmica, produz a morte de 50% dos animais de um dado grupo teste, dentro de um período de observação de 14 dias. É expressa quantitativamente como a massa da substância por massa do indivíduo, que é capaz de matar 50% dos indivíduos do

grupo teste (FUNDAÇÃO JORGE DUPRAT FIGUEIREDO DE SEGURANÇA E MEDICINA DO TRABALHO, 2011).

A CL₅₀ relaciona-se a concentração média da substância no ar ambiente, inalada pelos animais de um grupo teste, capaz de produzir a morte de 50% dos indivíduos deste grupo, sob determinadas condições, sendo expressa em miligramas da substância por litro de ar ambiente (mg/L) (FUNDAÇÃO JORGE DUPRAT FIGUEIREDO DE SEGURANÇA E MEDICINA DO TRABALHO, 2011). A classificação toxicológica diz respeito unicamente a quem manuseia o produto, havendo exposição única, sendo importante como medida de segurança para quem trabalha na produção, embalagem, no armazenamento, no transporte e no preparo da calda do agrotóxico e da sua aplicação (CARVALHO; PIVOTO, 2012).

Como determinação legal, todos os agrotóxicos devem apresentar no rótulo uma faixa colorida indicativa de sua classe toxicológica, conforme quadro 2.

Quadro 2 – Classe toxicológica e cor da faixa no rótulo de produto agrotóxico (LONDRES, 2011).

Classe toxicológica	Toxicidade	Cor da faixa no rótulo
I	Extremamente tóxico	Vermelha
II	Altamente tóxico	Amarela
III	Medianamente tóxico	Azul
IV	Pouco tóxico	Verde

3.2 Aspectos Gerais da Cultura do Abacaxi

O abacaxizeiro é uma planta que faz parte do gênero *Ananas*, tendo como uma das principais espécies representantes a espécie *Ananas comosus* (L.) Merrill., classificada botanicamente como pertencendo a família *Bromeliaceae* (PEREIRA; PUTZKE, 2010). Esta espécie distribui-se predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais do globo e abrange todas as cultivares plantadas de abacaxi (DOS SANTOS, 2011).

A provável região de origem do abacaxizeiro situa-se na área do globo que está compreendida entre 15° N e 30°S de latitude e 40°L e 60°O de longitude, o que inclui as zonas central e sul do Brasil, o Nordeste da Argentina e o Paraguai (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2010). O abacaxi é um

fruto muito apreciado pelo seu aroma e sabor, consumido em todo o mundo, sendo rico em sais minerais, açúcares e vitaminas (GONÇALVES; BLUME, 2008).

Segundo dados coletados pela FAO (*Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação*), em 2008 o mundo produziu mais de 19 milhões de toneladas de abacaxi, sendo que o Brasil, naquele ano, foi o primeiro produtor mundial, produzindo mais de 2,5 milhões de toneladas, correspondendo a 13% de toda a produção (ABANORTE, 2012). De acordo com dados do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA) de novembro de 2011, efetuado pelo Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE), o Brasil apresentou 57.006 hectares plantados para a produção de abacaxi, fornecendo 1.504.988 toneladas do fruto (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011).

3.2.1 Principais Pragas na Cultura do Abacaxi

Como a maioria das culturas de frutos e hortaliças, o cultivo do abacaxi também está sujeito ao ataque de pragas e doenças que podem vir a prejudicar o desenvolvimento da lavoura e conseqüentemente da produção. Cerca de 85 espécies de organismos nocivos já foram associadas a cultura do abacaxi no mundo (DA COSTA, 2010).

Dentre as principais doenças, ervas daninhas, insetos e pragas que atingem o cultivo deste fruto no Brasil destacam-se: o capim-colchão (*Digitaria horizontalis*), a cochonilha-do-abacaxi (*Dysmicoccus brevipes*), a podridão negra (fungo *Ceratocystis paradoxa*), a broca do fruto (*Strymon basalides*) e a fusariose, causada por um fungo (*Fusarium subglutinans*) (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2010; DA COSTA, 2010). Por ser uma cultura de pequeno porte e apresentar desenvolvimento vegetativo inicial muito lento, favorecendo a extração de água, a cultura do abacaxi é muito susceptível ao ataque de ervas daninhas (PINHEIRO; PORTO; MENEZES, 2005).

3.2.2 Características Químicas e Físico-Químicas do Abacaxi

É atribuída a presença de uma série de constituintes químicos nos frutos do abacaxi, com destaque para os açúcares e ácidos orgânicos, responsáveis pelo sabor e compostos voláteis associados ao aroma. A presença de carotenoides está associada à coloração amarela da polpa, e as vitaminas e os minerais estão

relacionados com o valor nutritivo do fruto, com destaque para o ácido ascórbico (vitamina C) e o potássio (DA COSTA, 2010).

Os principais ácidos responsáveis pela acidez são os ácidos cítrico e málico, contribuindo com 80% e 20% respectivamente com a acidez total (DA COSTA, 2010). Há também uma série de outros compostos como polifenóis, substâncias pécticas, enzimas, como a pectinametilesterase, poligalacturanase, peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônio liase, ácido galacturônico, vitamina B2 e minerais como sódio e cálcio (PINHEIRO; PORTO; MENEZES; 2005 THÉ, 2010).

Tabela 2 – Valores médios e respectivos desvios padrão das características físicas, físico-químicas e químicas de abacaxis *cv smooth cayenne* recém-colhidos (THÉ, 2010).

Característica analisada	Média geral	Desvio-padrão
Umidade (%)	87,38	± 0,28
pH	3,85	± 0,02
Açúcares totais (% de glicose)	8,86	± 0,29
Açúcares redutores (% de glicose)	3,23	± 0,27
Açúcares não redutores (% de glicose)	5,34	± 0,20
Vitamina C (mg de ácido ascórbico/100g)	19,19	± 0,73
Pectina total (mg de ácido galacturônico/100 g)	327,20	±19,57
Pectina solúvel (mg de ácido glacturônico/100 g)	52,70	± 1,06
Cálcio total (% da matéria seca)	0,26	± 0,01
Fenólicos totais (mg de ácido tânico)	58,80	± 0,00
Poligalacturonase (mmol g ⁻¹)	702,24	± 4,76
Pectinametilesterases (mmol g ⁻¹)	116,25	± 10,23
Fenilalanina amônio liase (mmol g ⁻¹)	307,20	± 8,82
Peroxidase (mmol g ⁻¹)	34,77	± 2,45
Polifenoloxidases (mmol g ⁻¹)	25,81	± 1,30

3.3 Evolução das Técnicas de Preparo de Amostra para Determinação Multirresíduo de Agrotóxicos em Alimentos

Na determinação de resíduos de pesticidas em alimentos, considerando as concentrações muito baixas dos compostos, suas propriedades químicas distintas, bem como a complexidade da matriz, há a necessidade de uma criteriosa etapa de preparo da amostra antes da análise instrumental (PRESTES *et al.*, 2009). Nessas condições, o foco da etapa de preparo de amostra é o enriquecimento

dos analitos de interesse na porção de amostra que será analisada (pré-concentração) e a remoção tanto quanto possível de espécies interferentes para a identificação e quantificação adequada dos agrotóxicos.

O primeiro método de preparo de amostra para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos foi publicado em 1959 por Mills, sendo originalmente desenvolvido para a determinação de organoclorados em alimentos gordurosos e não-gordurosos. Em 1963, nos laboratórios da *Food and Drugs Administration* (FDA), foi desenvolvido o método de Mills, Onley e Gaither (Método de Mills *et al.*), sendo empregado para a extração de organoclorados em produtos não-gordurosos (U.S. CONGRESS OFFICE OF TECHNOLOGY ASSESSMENT, 1988). Este método baseia-se numa extração com solvente acetonitrila, seguida da adição de água ao extrato, com subsequente etapa de partição, executada com solventes apolares como éter de petróleo ou hexano. Nesta etapa, não só água, como também componentes polares da matriz, açúcares e sais são separados do extrato, havendo conveniente limpeza da amostra para análise (*clean up*) (SCHENCK *et al.*, 2002).

Em 1975 Luke e colaboradores desenvolveram um método de preparo de amostra que possibilitou a extração de um maior espectro de pesticidas, incluindo compostos polares como organofosforados e organonitrogenados, sendo denominado método de Luke. Este método consistia de uma etapa de extração com solvente acetona, seguida de uma etapa de partição líquido-líquido com solventes apolares, como éter de petróleo e diclorometano. Com o objetivo de aumentar os níveis de recuperação dos pesticidas polares, os autores do método incluíram uma etapa de adição de cloreto de sódio na fase polar para potencializar a partição destes compostos para a fase orgânica, devido à ação do efeito iônico (efeito *salting out*) (PRESTES *et al.*, 2009; SCHENCK *et al.*, 2002).

Krijgsman e colaboradores, visando melhorar os resultados obtidos pelo método de Luke, propuseram em 1976 o uso de acetato de etila como solvente de extração dos pesticidas com subsequente adição de sulfato de sódio anidro, obtendo maior rapidez no preparo da amostra, maior simplicidade, extratos mais limpos e valores de recuperação mais adequados para pesticidas polares se comparado ao método de Luke. A imiscibilidade do sistema acetato de etila-água tornou obsoleta a

utilização de solventes apolares na etapa de partição. As vantagens do método de Krijgsman *et al.*, fizeram deste, o método oficial para a extração multirresíduo de pesticidas em boa parte dos países europeus (PRESTES *et al.*, 2009).

Na década de 1980, nos laboratórios da *Food and Consumer Product Safety Authority*, na Holanda, foi desenvolvido o método mini-Luke, sendo este uma miniaturização do método Luke original, executado com uma menor quantidade de solvente e sem a etapa de adição de cloreto de sódio. Este método possuía a vantagem de serem usadas menores quantidades de amostra e solvente, porém apresentou a desvantagem de fornecer valores de recuperação relativamente baixos para compostos polares (valores abaixo de 70%). No início dos anos 90 foram feitas alterações no método mini-Luke visando melhorar os níveis de recuperação dos pesticidas mais polares, sendo adicionado sulfato de sódio anidro no procedimento de extração, levando assim a extrações mais viáveis de analitos polares (PRESTES *et al.*, 2009).

3.3.1 Métodos Modernos de Preparo de Amostra na Determinação Multirresíduo de Agrotóxicos

Durante a década de 1990 a necessidade de métodos de preparo de amostra que possibilitassem maior rapidez da análise, utilizando menores quantidades de solventes orgânicos, com maior sensibilidade e para matrizes com baixa concentração dos analitos, fez surgir técnicas mais eficientes para extração multirresíduo de agrotóxicos em alimentos e outras matrizes.

Dentre as principais técnicas modernas empregadas na extração multirresíduo de agrotóxicos pode-se citar: a extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction – SPE*), extração por dispersão da matriz em fase sólida (*Matrix Solid Phase Dispersion-MSPD*), microextração em fase sólida (*Solid Phase Microextraction – SPME*), extração sortiva em barra magnética (*Stir Bar Sorptive Extraction – SBSE*) e extração com fluidos pressurizados (*Pressurized Fluid Extraction - PLE*) (BASTOS *et al.*, 2012; DEAN, 2009; PRESTES *et al.*, 2009).

3.4 Método QuEChERS

Em 2003, Anastassiades e colaboradores, visando desenvolver um método de preparo de amostra para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em

alimentos, que contornasse as limitações operacionais e analíticas dos métodos já existentes, introduziram o método “*QuEChERS*”. A sigla empregada para a denominação deste método deriva exatamente das iniciais das palavras da língua inglesa que expressam suas características de desempenho, já que o mesmo é considerado um método rápido (**Quick**), fácil (**Easy**), econômico (**Cheap**), efetivo (**Effective**), robusto (**Rugged**) e seguro (**Safe**) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009; SCHENCK; HOBBS, 2004).

Este método surgiu como um novo procedimento de preparo de amostra de matrizes complexas, como frutos e hortaliças, para extração simultânea de agrotóxicos com diferentes propriedades químicas. Durante seu desenvolvimento foi dado grande enfoque para a obtenção de um procedimento dinâmico, possível de ser aplicado em qualquer laboratório e adequado as instrumentações analíticas modernas (PRESTES *et al.*, 2009). O procedimento original baseia-se numa etapa de extração inicial monofásica, com solvente acetonitrila, de uma porção de 10 g da amostra processada, seguida pela partição líquido-líquido dos agrotóxicos na presença de sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

A etapa final de limpeza (*clean up*) do extrato é executada através de extração em fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid-Phase Extraction - D-SPE*) empregando sulfato de magnésio anidro e fase sólida sorvente PSA (*Primary Secondary Amine*), que são misturados ao extrato obtido com acetonitrila. Após a limpeza do extrato o mesmo é levado à análise por técnica cromatográfica (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

3.4.1 O Tamanho da amostra

No desenvolvimento do método *QuEChERS*, a seleção do tamanho da amostra utilizada para a obtenção do extrato para análise, baseou-se na observação da quantidade mínima dessa amostra a qual fornecia resultados estatisticamente confiáveis. De forma geral, amostras sólidas de alimentos necessitam de etapas mais complexas e demoradas durante seu preparo, como por exemplo, o corte do produto em pedaços mais reduzidos seguido de processamento em homogeneizadores (PRESTES *et al.*, 2009).

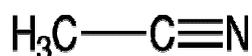
Métodos que utilizam grandes quantidades de amostra requerem maiores volumes de solvente, conduzindo a geração de uma maior quantidade de resíduos, maior preocupação com segurança do analista e conseqüentemente um maior gasto de materiais e reagentes. A maioria dos métodos multirresíduo para determinação de agrotóxicos utiliza massas de amostra em torno de 50 a 100 g, de maneira que baseado em evidências da literatura, a massa de amostra escolhida para a execução do método QuEChERS foi fixada em 10 g. Esta quantidade de amostra foi considerada como representativa e viável para a execução da análise (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

3.4.2 O Solvente de Extração

A seleção do solvente de extração é um ponto crucial no desenvolvimento de um método de extração multirresíduo. As principais características consideradas na escolha do solvente são: habilidade de extração de um amplo espectro de agrotóxicos com diferentes polaridades, apresentar seletividade durante a extração, partição e limpeza (*clean up*), separar-se eficientemente de fases aquosas e ser compatível com diferentes técnicas cromatográficas (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009).

Os principais solventes empregados na extração multirresíduo de agrotóxicos são: acetona, acetato de etila e acetonitrila. No desenvolvimento do método QuEChERS, o solvente que apresentou características mais convenientes foi a acetonitrila. Dentre as vantagens da acetonitrila pode-se citar a capacidade de extração de uma ampla faixa de agrotóxicos de diferentes polaridades, a extração de menores quantidades de coextrativos lipofílicos provenientes da amostra, como ceras, gorduras e pigmentos e a capacidade de permitir a remoção de residual de água apenas com o uso de um agente secante como o sulfato de magnésio anidro (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Figura 12 – Estrutura da acetonitrila e momento de dipolo.



Acetonitrila

Na execução do método são empregados 10 mL de acetonitrila para cada 10 g da amostra, dando uma razão de 1 mL de solvente para cada 1g de amostra. Esse valor é considerado baixo quando comparado a outros métodos de extração que apresentam geralmente uma relação amostra e solvente de 2 a 5 g por 1mL no extrato final (PRESTES *et al.*, 2009).

3.4.3 A Adição de Sais e a Separação de Fases

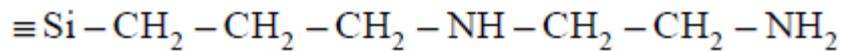
A adição dos sais sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e cloreto de sódio (NaCl) tem a função de promover a separação de fases após a extração. A adição do NaCl inicia a partição líquido-líquido. Este sal promove o efeito *salting out* (efeito iônico), que potencializa a partição dos compostos polares solubilizados na fase aquosa para a fase orgânica (acetonitrila), possibilitando maiores percentuais de recuperação para os agrotóxicos mais polares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009).

3.4.4 Limpeza do Extrato (*Clean up*)

A etapa de limpeza da amostra (*clean up*) é fundamental para a robustez e confiabilidade dos resultados obtidos pelo sistema analítico, pois reduz a presença de compostos interferentes da matriz, deixando a amostra mais adequada à instrumentação analítica. Tradicionalmente, as etapas de limpeza da amostra eram executadas por extração em fase sólida (SPE), porém, no desenvolvimento do método QuEChERS, os autores empregaram uma técnica mais moderna e mais viável que a SPE, sendo esta técnica, a extração em fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid-Phase Extraction- D-SPE*) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009).

Na técnica D-SPE, uma fase sólida sorvente, empregada em extração em fase sólida – SPE é adicionada e misturada ao extrato da amostra, sendo distribuída uniformemente por homogeneização, promovendo a retenção dos coextrativos da matriz presentes no extrato. O sorvente empregado no método QuEChERS, o PSA, é uma amina primária secundária que possui uma estrutura bidentada que promove um efeito quelante significativo devido a presença dos grupos amino primário e secundário (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009).

Figura 16 - Estrutura do PSA (N-propiletenodiaminossilano) (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).



Devido ao efeito quelante do PSA, ácidos graxos livres e outros compostos polares da matriz são fortemente retidos. Nesta etapa o MgSO_4 é também utilizado como agente secante para remover o residual de umidade no extrato. Após a limpeza do extrato o mesmo é levado à análise cromatográfica para identificação e quantificação dos agrotóxicos (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009).

3.5 O uso da Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas na Determinação de Agrotóxicos

A cromatografia é uma técnica de separação que pode ser acoplada a diversos sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais empregadas e de melhor desempenho na determinação de poluentes orgânicos em diversas matrizes. A cromatografia gasosa (CG) é atualmente o método mais versátil e sensível para a determinação de resíduos de poluentes orgânicos em alimentos, como os agrotóxicos, principalmente quando aliada a espectrometria de massas (EM) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; TADEO *et al.*, 2000).

Na cromatografia gasosa a amostra é vaporizada e seus constituintes são distribuídos entre uma fase móvel gasosa (gás de arraste) e uma fase estacionária que pode ser sólida ou líquida, dentro da coluna cromatográfica. Os compostos da amostra são carregados através da coluna pelo gás de arraste, sendo gradativamente separados em função de sua partição diferencial entre a fase móvel e a fase estacionária, de forma que cada componente da amostra sai da coluna num determinado tempo, sendo convenientemente identificados e quantificados (MCNAIR; MILLER, 1997). A cromatografia gasosa limita-se a determinação de compostos que apresentem uma certa volatilidade e que sejam termicamente estáveis, para que os mesmos possam passar a fase vapor sem sofrerem degradação química (MCNAIR; MILLER, 1997; SKOOG *et. al.*, 2005).

A combinação da cromatografia gasosa com a espectrometria de massas pode ser considerada simples, já que as características de funcionamento do cromatógrafo a gás são compatíveis com a necessidade de alto vácuo do espectrômetro de massas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). O mecanismo de detecção por espectrometria de massas (EM) baseia-se no bombardeamento das moléculas dos analitos com um feixe de elétrons de alta energia (em torno de 70 eV), de forma que as moléculas se ionizam, gerando um série de fragmentos. Cada espécie de fragmento gerado possuirá um valor de razão entre sua massa molar e carga elétrica (m/z). O detector expressa um espectro de massas para cada composto, sendo este espectro um gráfico que mostra a abundância relativa e as massas dos fragmentos carregados, gerados na ionização (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

Cada espectro é característico para um dado composto, de maneira que a interpretação do espectro é extremamente viável para a obtenção de informações qualitativas sobre os analitos, auxiliando a identificação. Na análise qualitativa, os espectros de massa dos analitos podem ser comparados simultaneamente com os espectros obtidos de padrões analisados, ou de bibliotecas armazenadas no software do equipamento (DE CARVALHO, 2009). Existem diferentes métodos de ionização na espectrometria de massas, sendo os principais, a ionização por impacto de elétrons (IE) e a ionização química (IQ) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

A técnica de GC-EM operando no modo de impacto de elétrons (IE) é extensivamente empregada em laboratórios de análise de resíduos de poluentes orgânicos, permitindo a elucidação de diversos compostos como os pesticidas (DE CARVALHO, 2009). Grande parte dos métodos recomendados pela *Food and Drugs Administration* (FDA) e pelo *United States Department of Agriculture* (USDA) para a determinação multirresíduo de agrotóxicos, são baseados em cromatografia gasosa, de maneira que esses métodos estão em constante expansão e otimização ao longo dos anos, tendo em vista que não são capazes de detectar todos os tipos de resíduos em todos os tipos de amostras (TADEO *et al.*, 2000).

3.6 Efeito Matriz na Quantificação de Agrotóxicos por Cromatografia Gasosa

A complexidade da amostra e a elevada diversidade de compostos que a constitui, gera um problema crítico na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa, sendo este problema denominado de *efeito matriz*. O Efeito matriz é resultado da interferência de coextrativos da amostra que afetam a precisão e exatidão dos resultados da análise (PICÓ; BLASCO; FONT, 2003; PINHO *et al.*,2009).

Alguns fatores podem influenciar o efeito de matriz, sendo os principais: a natureza do analito (propriedades químicas do agrotóxico), a natureza da amostra, o nível de concentração do agrotóxico em relação aos componentes da matriz e o sistema cromatográfico (GC) (SCHENCK; LEHOTAY, 2000). Este efeito é também conhecido como “aumento da resposta cromatográfica induzida pela matriz”, permitindo a explicação dos níveis de recuperação que excedem 100% para alguns agrotóxicos. O efeito de matriz pode também ocasionar outras alterações na análise cromatográfica, como por exemplo: (i) mascaramento do pico do analito de interesse, gerando um resultado falso negativo;(ii) ocorrência de falso positivo, devido a identificação errônea de componentes da matriz como sendo o composto de interesse, quando este está ausente; (iii) erros na quantificação devido ao aumento do sinal do detector, levando à superestimação do resultado (HAJŠLOVÁ, J. *et al.*, 1998).

As interferências geradas pelos componentes endógenos da matriz nas respostas do detector não dependem apenas das propriedades destes compostos, mas também das condições cromatográficas em que análise é executada, de maneira que podem haver interferências devido a processos que podem ocorrer particularmente no sistema injetor, na coluna cromatográfica e no detector (PINHO *et al.*,2009).

3.6.1 Efeito Matriz no Injetor

Uma das técnicas mais empregadas na injeção da amostra no sistema cromatográfico gasoso (CG) é a de injeção a quente (com ou sem divisão de fluxo *split/splitless*), em que a amostra é vaporizada no injetor aquecido, após sua introdução no sistema (PINHO *et al.*,2009).Esta técnica é a mais susceptível ao

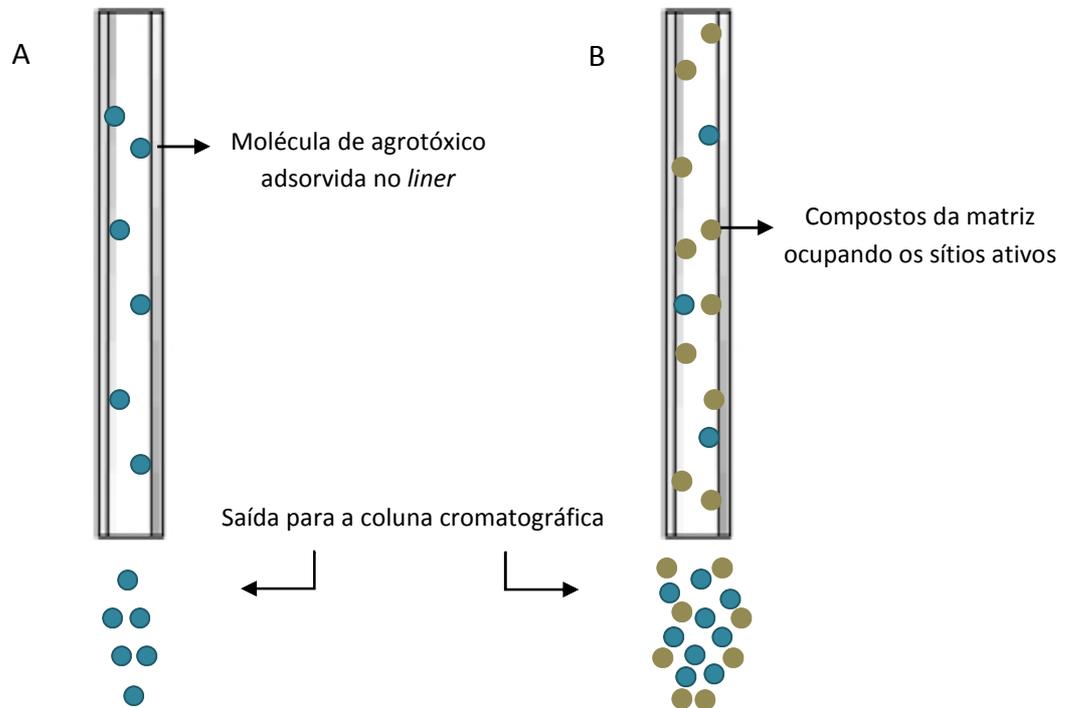
efeito matriz, pois em condições de temperatura elevada, sítios ativos no *liner* (*tubo de vidro insertor*) podem promover adsorção dos analitos ou mesmo catalisar processos de degradação térmica dos agrotóxicos (HAJŠLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2000; PINHO *et al.*, 2009).

Os sítios ativos são formados por grupos silanóis livres e metais potencialmente presentes na superfície do *liner*. Sítios ativos adicionais podem se formar também a partir de coextrativos não voláteis que se depositam na entrada do sistema cromatográfico durante repetidas análises (HAJŠLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2000). Quando os analitos são introduzidos no sistema cromatográfico através de soluções padrão em solvente puro, os sítios ativos do *liner* estão todos disponíveis para retenção, de forma que menor quantidade dos agrotóxicos é transferida para a coluna cromatográfica e conseqüentemente para o detector (figura 13A) (HAJŠLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2000).

Quando os agrotóxicos são injetados na presença dos componentes da matriz, ou seja, quando as soluções padrão são preparadas no extrato da matriz, ocorre uma competição entre os componentes da amostra e os analitos pelos sítios ativos do *liner*, possibilitando que maior quantidade dos agrotóxicos seja transferida à coluna cromatográfica e, conseqüentemente, detectada (figura 13B) (HAJŠLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2000; PINHO *et al.*, 2009).

Mesmo *liners* de elevada qualidade, denominados “desativados” possuem a característica de adsorver compostos (HAJŠLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2000). Mudanças na temperatura do sistema injetor podem afetar o efeito de matriz, pois em temperaturas mais elevadas é possível reduzir a adsorção dos analitos assim como dos coextrativos, porém a degradação térmica dos compostos termolábeis é potencializada (PINHO *et al.*, 2009).

Figura 13 - Fenômeno de adsorção dos agrotóxicos nos sítios ativos do *liner*. A) Agrotóxicos injetados na ausência dos componentes da matriz. B) Agrotóxicos injetados com extrato da matriz.



3.6.2 Efeito Matriz na Coluna Cromatográfica e no Detector

Não obstante a existência de poucos estudos sobre o efeito de matriz na coluna cromatográfica e no detector é sabido que as conexões entre o injetor e a coluna e entre a coluna e o detector podem também atuar no efeito de matriz. Nas primeiras análises executadas com uma coluna cromatográfica, pouco ou nenhum efeito de matriz é observado, porém, após algum tempo de uso, devido as sucessivas injeções e consequente contaminação do sistema cromatográfico, o efeito de matriz é gradativamente mais pronunciado (PINHO *et al.*, 2009).

O diâmetro interno da coluna cromatográfica possui também influência significativa na magnitude do efeito matriz, pois colunas que possuem diâmetros mais elevados tendem a apresentar maiores distorções dos resultados em comparação com colunas de diâmetros mais reduzidos (DÖMÖTÖROVÁ *et al.*, 2006). Com relação aos detectores, o efeito de matriz é mais perceptível em análises que empregam espectrômetros de massa do que em análises que usam detector fotométrico de chama. O detector espectrômetro de massas pode acentuar o efeito de matriz devido à superfície metálica do detector e por não haver combustão dos analitos no sistema (HAJŠLOVÁ *et al.*, 1998).

3.7 Validação de Métodos Analíticos

Os laboratórios, ao desenvolver, empregar ou adaptar metodologias analíticas, devem dispor de meios e critérios objetivos para comprovar que os ensaios que executam geram resultados com confiabilidade analítica e adequados à qualidade pretendida (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2003).

A validação de um método analítico é todo o processo de estudo e avaliação que visa garantir que este método produz resultados confiáveis e interpretáveis sobre a amostra em estudo. Os estudos de validação de um método, dependem fundamentalmente, da determinação dos parâmetros de desempenho do método, sendo estes parâmetros estimados durante o desenvolvimento do mesmo (EURACHEM/CITAC, 2002; RIBANI *et al.*, 2004).

Nos estudos de validação de metodologias analíticas quantitativas são determinados alguns ou mesmo todos os seguintes parâmetros: seletividade, faixa linear de trabalho/intervalo, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez (EURACHEM/CITAC, 2002; RIBANI *et al.*, 2004).

3.7.1 Seletividade

A seletividade é um parâmetro que expressa a capacidade do método em gerar resposta analítica livre de interferências para o(s) analito(s) de interesse. Os estudos de seletividade avaliam o grau de interferência de compostos presentes na amostra sobre os resultados obtidos pelo método (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

Este parâmetro pode ser avaliado de várias maneiras, porém a primeira forma viável é comparando a resposta analítica obtida para o composto de interesse, na matriz isenta do analito, com a resposta obtida na matriz com uma quantidade conhecida do analito (padrão). Em métodos cromatográficos, a pureza do pico cromatográfico (sinal analítico) pode ser avaliada com o auxílio do detector espectrômetro de massas, sendo um meio viável para a avaliação da seletividade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

3.7.2 Faixa Linear/ Intervalo

A faixa linear ou intervalo é a faixa de concentrações do analito na qual o método pode ser aplicado, compreendendo o limite de quantificação inferior e superior. Neste intervalo há uma relação linear entre a resposta analítica e a concentração da espécie química de interesse. A determinação da faixa linear ou intervalo geralmente é fruto dos estudos de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

3.7.3 Linearidade

A linearidade é um parâmetro que expressa a capacidade do método em demonstrar que o sinal analítico da espécie de interesse é diretamente proporcional à concentração desta espécie na amostra, dentro de um intervalo de concentração especificado. A linearidade é avaliada através de padronização interna ou externa, construindo-se uma curva de calibração com no mínimo 5 pontos (cinco concentrações diferentes) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). Após a obtenção da equação da curva de calibração, a linearidade é expressa quantitativamente através do coeficiente de correlação linear (R), obtido por regressão linear dos coeficientes de regressão da equação da curva (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2003).

Equação genérica da curva de calibração:

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

Em que:

y = resposta medida (absorbância ou área de pico, etc.);

x = concentração do analito;

a = coeficiente angular

b = coeficiente linear (intercepto)

O critério mínimo aceitável de linearidade segundo a ANVISA é de valores de $R \geq 0,99$, enquanto o INMETRO admite linearidade aceitável com valores de $R > 0,90$ (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2003).

3.7.4 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção do método é definido como a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas. Há diferentes maneiras de estabelecer o limite de detecção de um método, uma delas é por meio da análise de soluções com concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável, sendo esta concentração a estimativa do limite de detecção (método das diluições sucessivas) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

Em métodos instrumentais, como cromatografia ou espectroscopia, a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação sinal/ruído da linha de base, de maneira que o limite de detecção é determinado como sendo a concentração do analito que produz relação sinal/ruído igual a 3 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

Uma forma alternativa, quando se usa métodos instrumentais, é a estimativa do limite de detecção com base nos coeficientes da curva de calibração. Neste método são construídas no mínimo 3 curvas de calibração, contendo concentrações do analito próximas ao limite de quantificação (LQ), sendo o limite de detecção calculado da seguinte forma (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003):

$$LD = 3 \cdot \frac{s}{a} \quad (2)$$

Em que:

s = desvio padrão dos coeficientes lineares das curvas;

a = coeficiente angular (inclinação).

3.7.5 Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) do método é a menor concentração de um analito que pode ser determinada em uma amostra, com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação pode ser estimado por diferentes meios, considerando os mesmos critérios utilizados para a determinação do limite de detecção (LD).

Pelo método das diluições sucessivas o LQ é estimado como sendo a concentração que gera uma relação sinal/ruído igual a 10, correspondendo a aproximadamente a 3 vezes o valor de LD (RIBANI *et al.*, 2004).

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

Utilizando o método que leva em consideração os coeficientes das curvas de calibração, como descrito para estimativa de LD, LQ pode ser calculado pela equação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003):

$$LQ = 10 \cdot \frac{s}{a} \quad (4)$$

Em que:

- s = desvio padrão dos coeficientes lineares das curvas de calibração;
- a = coeficiente angular (inclinação).

O valor da concentração correspondente ao limite de quantificação (LQ) deve estar contida no intervalo de concentrações da curva de calibração (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2003).

3.7.6 Precisão

A precisão é um termo geral que expressa a dispersão dos resultados obtidos entre ensaios independentes, repetidos numa mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas, sendo expressa quantitativamente na forma de desvio padrão (s) ou desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV) (INSTITUTO NACIONAL DE

METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2003). A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

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

Em que:

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

x = valor individual de uma medição;

N = número de medições

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (6)$$

Em que:

s = desvio padrão das medições;

\bar{x} = média das medições.

O valor máximo aceitável para o coeficiente de variação deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

3.7.6.1 Repetitividade

A repetitividade expressa a concordância ou dispersão dos resultados dentro de um curto período de tempo, com ensaios executados sob as mesmas condições, denominadas condições de repetitividade: mesmo procedimento, mesmo analista, mesma instrumentação e mesmo local (RIBANI *et. al.*, 2004).

O termo “repetitividade” é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) e pelo INMETRO, já a ANVISA, utiliza o mesmo conceito para o termo “repetibilidade”. A repetitividade é também denominada precisão intra-ensaio

ou intra-corrída, sendo expressa mais comumente, através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2012; RIBANI et. al., 2004).

Segundo a ANVISA a repetitividade do método deve ser verificada por, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta com três réplicas cada ou mínimo de 6 (seis) determinações a 100% da concentração do teste. O INMETRO recomenda que sejam feitas 7 (sete) ou mais determinações para o cálculo da estimativa do desvio padrão ou coeficiente de variação (RIBANI et. al., 2004).

3.7.6.2 Precisão Intermediária

A precisão intermediária expressa a concordância dos resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para determinação da precisão intermediária recomenda-se no mínimo 2 dias diferentes com analistas diferentes para as determinações (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados dentro de um laboratório, portanto sendo mais recomendada a ser adotada. O método para determinação segue as mesmas recomendações para a repetitividade, sendo expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) (RIBANI et. al., 2004).

3.7.6.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados de medições de uma mesma amostra, obtidos com o método sendo executado em diferentes laboratórios, ou seja, sob condições variadas de medição. A reprodutibilidade pode ser entendida como a precisão inter-laboratorial do método (RIBANI et. al., 2004).

A determinação da reprodutibilidade do método é resultado de estudos colaborativos entre laboratórios e deve ser considerada em situações de padronização de métodos analíticos para serem incluídos, por exemplo, em farmacopéias ou outras compilações de procedimentos oficiais. A reprodutibilidade

também é expressa na forma de desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) (RIBANI *et. al.*, 2004).

3.7.7 Exatidão

A exatidão do método expressa o grau de concordância entre os resultados obtidos pelo método e o valor de referência aceito como valor verdadeiro. É importante salientar que um valor exato é obtido apenas por uma medição perfeita, sendo este valor indeterminado por natureza (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; RIBANI *et. al.*, 2004).

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, ou seja, estando sempre associada a valores de precisão. Estes limites podem ser mais restritos quando o nível de concentração do analito é mais elevado e mais amplos quando o analito está em nível traço de concentração. Existem diferentes meios para a determinação da exatidão do método, sendo eles: estudo de materiais de referência certificados (MRC), comparação entre métodos e estudos de recuperação (fortificação) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; RIBANI *et. al.*, 2004).

Os materiais de referência certificados (MRC) são fornecidos por instituições reconhecidas e confiáveis, como o NIST (*National Institute of Standards and Technology- USA*), sendo acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração do analito ou outra grandeza, como também a incerteza associada (RIBANI *et. al.*, 2004; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2012). Nos estudos com materiais de referência certificados (MRC), os valores obtidos através do método, média e estimativa do desvio padrão da concentração do analito de uma série de replicatas de uma mesma amostra padrão devem ser comparados com os valores certificados do material de referência, para verificação da exatidão do método (RIBANI *et. al.*, 2004).

A comparação de métodos consiste na comparação entre resultados obtidos pelo método em desenvolvimento e um método de referência, avaliando-se o grau de proximidade entre os resultados dos dois métodos para determinar a exatidão do método testado em relação ao método de referência. Os estudos de recuperação (R) consistem em determinar a quantidade do analito presente ou

adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (RIBANI *et. al.*, 2004).

A recuperação de um analito pode ser determinada através da adição de uma quantidade conhecida de um padrão deste analito na matriz isenta do mesmo ou à amostra, sendo esse procedimento conhecido como fortificação ou dopagem. O estudo deve ser executado em, no mínimo, 9 determinações contemplando o intervalo linear do método, sendo as determinações feitas em triplicata, em 3 (três) níveis de concentração, baixo, intermediário e alto. O percentual de recuperação é calculado através da seguinte equação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005):

$$R = \left(\frac{C_2 - C_1}{C} \right) \times 100\% \quad (7)$$

Em que:

C_1 = concentração obtida na amostra não fortificada (branco da amostra);

C_2 = concentração média do analito na amostra fortificada;

C = concentração adicionada na amostra (concentração teórica).

Em estudos que utilizam amostra isenta do analito, a equação acima pode ser escrita na forma abaixo, considerando que o branco da amostra não apresenta concentração residual significativa do analito (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003):

$$R = \left(\frac{C_2}{C} \right) \times 100\% \quad (8)$$

3.7.8 Robustez

A robustez expressa a capacidade do método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, ou seja, avalia estabilidade do método a mudanças nas condições de execução do mesmo. Os

estudos de robustez possibilitam a avaliação do efeito das mudanças nos parâmetros do método sobre os resultados obtidos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; EURACHEM/CITAC, 2002;).

Após os estudos de robustez do método é possível saber quais fatores podem influenciar nos resultados, possibilitando a inclusão de precauções e medidas de controle no procedimento a fim de evitar alterações nos resultados esperados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; EURACHEM/CITAC, 2002).

4. PARTE EXPERIMENTAL

A etapa experimental deste trabalho foi realizada no Laboratório de Análises para Certificação de Produtos do Caju (LABCAJU) da Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Estado do Ceará (NUTEC).

4.1 Preparo das Amostras para os Estudos de Validação

A amostra de abacaxi orgânico foi obtida em fornecedor da cidade de Fortaleza e imediatamente levada ao laboratório para execução do preparo prévio. O fruto *in natura* foi fracionado e em seguida integralmente processado em aparelho processador doméstico. A amostra foi armazenada em frascos de vidro previamente limpos e mantida em freezer a temperatura de -4°C até realização dos ensaios.

4.2 Reagentes

Para o preparo das amostras foi utilizado solvente acetonitrila 99,9 % grau HPLC/espectroscópico da marca TEDIA, acetato de etila grau UV/HPLC Vetec, ciclohexano grau UV/HPLC Vetec, sulfato de magnésio anidro P.A. Vetec, cloreto de sódio P.A. Vetec, citrato de sódio tribásico P.A. Vetec, hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado P.A. Aldrich, fase sorvente PSA Supelcoclean Bonded Silica Supelco, carbono grafitado Supelcoclean ENVI-CARB 120/400 Supelco, ácido fórmico 85% P.A. Vetec.

Foram utilizados padrões analíticos dos agrotóxicos com pureza entre 97,0 % e 99,9 %, certificados pelos fabricantes, conforme tabela 3.

Tabela 3 – Padrões analíticos dos agrotóxicos e fabricantes (*continua*).

Padrão Analítico	Classe	Grupo Químico	Pureza (%)	Fabricante
Alacloro	Herbicida	Cloroacetamida	99,2	SIGMA-Fluka
Ametrina	Fungicida	Triazina	98,5	SIGMA-Fluka
Atrazina	Herbicida	Triazina	98,5	SIGMA-Fluka
Azoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	99,9	SIGMA-Riedel-de-Häen
Bifentrina	Formicida/Acaricida	Piretróide	98,5	Dr.Ehrenstorfer GmbH
Boscalida	Fungicida	Anilida	99,9	SIGMA-Fluka

Tabela 3 – (Continuação) Padrões analíticos dos agrotóxicos e fabricantes.

Padrão Analítico	Classe	Grupo Químico	Pureza (%)	Fabricante
<i>cis</i> -Bromuconazol	Fungicida	Triazol	98,5	SIGMA-Riedel-de-Häen
<i>trans</i> -Bromuconazol	Fungicida	Triazol	98,5	SIGMA-Riedel-de-Häen
Buprofezina	Inseticida	Tiadiazinona	99,9	SIGMA-Fluka
Carbossulfano	Inseticida/Nematicida	Metilcarbamato	98,5	SIGMA-Riedel-de-Häen
λ -Cialotrina	Inseticida	Piretróide	99,7	Supelco
Ciproconazol	Fungicida	Triazol	99,8	SIGMA-Riedel-de-Häen
Clorobenzilato	Inseticida/Acaricida	Organoclorado	97,0	Accustandard
Clorotalonil	Fungicida	Isoftalonitrila	99,7	Accustandard
<i>cis</i> -Clordano	Inseticida	Organoclorado	98,5	Accustandard
<i>trans</i> -Clordano	Inseticida	Organoclorado	98,5	Accustandard
Cloroneb	Fungicida	Benzeno Subst.	99,7	Accustandard
Clorpirifós	Inseticida/Acaricida	Organofosforado	98,5	Accustandard
Deltametrina	Inseticida/Fungicida	Piretróide	99,7	SIGMA-Riedel-de-Häen
DCPA	Herbicida	Bipiridílio	99,9	Accustandard
Difenconazol	Fungicida	Triazol	97,0	SIGMA-Riedel-de-Häen
Esfenvalerato	Inseticida	Piretróide	97,0	SIGMA-Riedel-de-Häen
Etridiazol	Fungicida	Éter tiadiazólico	98,5	Accustandard
Fenarimol	Fungicida	Pirimidinil Carbinol	99,7	SIGMA -Riedel-de-Haën
Fenitrotona	Inseticida	Organofosforado	99,7	SIGMA-Riedel-de-Häen
Fenpropatrina	Inseticida	Piretróide	99,9	SIGMA-Riedel-de-Häen
Fentiona	Inseticida	Organofosforado	98,0	SIGMA-Riedel-de-Häen
Hexaclorobenzeno	Fungicida	Organoclorado	98,0	Accustandard
Imibenconazol	Fungicida	Organoclorado	99,9	Dr.Ehrenstorfer Gmbh
Malationa	Inseticida	Organofosforado	99,0	SIGMA -Riedel-de-Haën
Metalaxyl	Fungicida	Acilalaninato	99,7	SIGMA -Riedel-de-Haën
Molinato	Herbicida	Tiocarbamato	98,0	Dr.Ehrenstorfer Gmbh
Parationa metílica	Inseticida	Organofosforado	98,9	SIGMA -Riedel-de-Haën
<i>Cis</i> -Permetrina	Inseticida	Piretróide	99,9	Accustandard
<i>Trans</i> -Permetrina	Inseticida	Piretróide	99,9	Accustandard
Piraclostrobina	Fungicida	Estrobilurina	99,9	Accustandard
Piriproxifem	Inseticida	Piridiloxipropílico	98,9	Accustandard
Propaclor	Herbicida	Cloroacetamida	97,0	Accustandard
Propanil	Herbicida	Anilida	97,0	SIGMA-Riedel-de-Häen
Propiconazol	Fungicida	Triazol	98,9	SIGMA-Fluka
Smazina	Herbicida	Triazina	99,0	SIGMA-Fluka
Triazofós	Inseticida	Organofosforado	99,0	SIGMA -Riedel-de-Haën

Tabela 3 – (Conclusão) Padrões analíticos dos agrotóxicos e fabricantes.

Padrão Analítico	Classe	Grupo Químico	Pureza (%)	Fabricante
Trifloxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	99,0	SIGMA-Riedel-de-Häen
Triflumizol	Fungicida	Imidazol	98,0	Accustandard

4.2.1 Preparo das Soluções Padrão Estoque dos Agrotóxicos

A partir das soluções padrão 1000 mg L^{-1} de cada agrotóxico, foi preparada uma solução padrão estoque multicomponente, com todos os compostos, estando cada composto na concentração de 5 mg L^{-1} . Transferiu-se $50 \mu\text{L}$ de cada solução padrão 1000 mg L^{-1} para um balão volumétrico de 10 ml, completando-se o volume com solução ciclohexano /acetato de etila (1:1). Da solução estoque 5 mg L^{-1} foi preparada uma solução padrão 1 mg L^{-1} transferindo-se uma alíquota de 1 mL para um balão de 5 ml e completando-se o volume com solução de ciclohexano/acetato de etila (1:1).

4.3 Equipamentos

Para as operações de pesagem da amostra e reagentes sólidos foi utilizada balança analítica Shimadzu, com precisão de $\pm 0,0001 \text{ g}$. No procedimento de preparo da amostra foi utilizado agitador de tubos tipo vórtex Marconi MA-162, evaporador rotativo Marconi MA 120, bomba de vácuo Tecnal (TE-058).

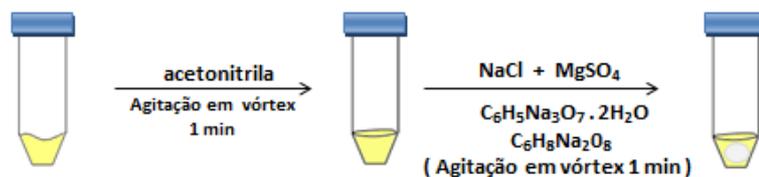
4.4 Curvas Analíticas

As curvas analíticas foram construídas a partir de soluções padrão da mistura dos agrotóxicos preparadas no extrato da amostra (*padronização externa com superposição na matriz*) (RIBANI, *et. al.* 2004). A partir da solução padrão mista 5 mg L^{-1} foram preparados padrões em sete níveis de concentração: 0,01; 0,03; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; $0,75 \text{ mg L}^{-1}$, que correspondem numericamente aos mesmos níveis de concentração em mg kg^{-1} na amostra do fruto de abacaxi. Cada uma das soluções padrão correspondentes a cada nível de concentração foi injetada em triplicata, sob as condições de corrida cromatográfica descritas na seção 4.5. As equações das curvas foram estimadas com o auxílio do software Microsoft Excel 2010.

4.4.1 Preparo do Extrato da Amostra

Os extratos foram preparados segundo o método QuEChERS-citrato modificado, sendo tomados 10,0 g de abacaxi processado em tubo Falcon e em seguida adicionados 10,0 mL de acetonitrila 99,9%, seguido 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.

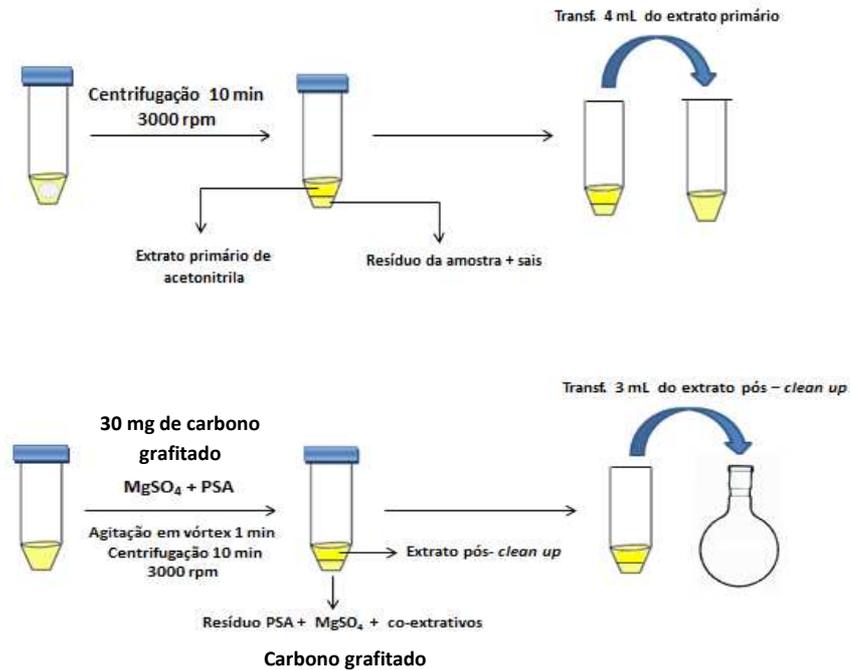
Figura 14 - Etapa de extração inicial com acetonitrila e adição de sais (*efeito salting out*).



Após agitação manual, foi promovida agitação por 1 min em agitador vórtex seguido de centrifugação por 10 min a 3000 rpm. Para a obtenção do extrato final foi retirada uma alíquota de 4,0 mL da fase líquida de acetonitrila.

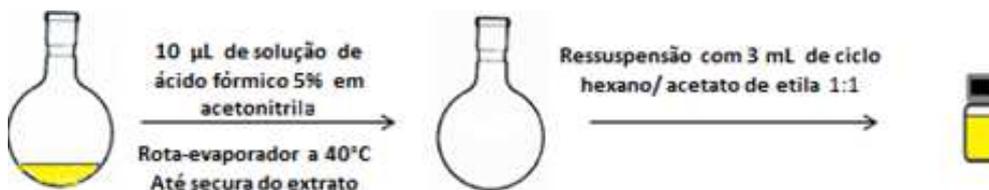
Na etapa de limpeza (*clean up*) por extração em fase sólida dispersiva (D-SPE), foram adicionados 600 mg de sulfato de magnésio, 100 mg do sorvente PSA, 30 mg de carbono grafitado Supelcoclean ENVI-CARB 120/400, e em seguida executada agitação por 1 min, visando promover dispersão do sorvente no extrato primário da matriz. Em seguida, após centrifugação por 10 min, foi retirada alíquota de 3,0 mL da fase acetonitrila (*extrato pós-clean up*) e transferida para balão de fundo esmerilhado.

Figura 15 - Obtenção do extrato primário e limpeza do extrato (*clean up*).



Finalmente, foram adicionados ao extrato 10 μ L de solução de ácido fórmico 5 % em acetonitrila, que em seguida foi levado a evaporador rotativo a 40°C para eliminação da acetonitrila proveniente da extração. Após evaporação foi executada ressuspensão do extrato com 3,0 mL de solução 1:1 de ciclohexano/acetato de etila. O extrato final foi armazenado em vial para posterior preparo das soluções padrão das curvas analíticas. Esse procedimento foi executado seguidas vezes até a obtenção de um volume de extrato suficiente para a preparação das soluções padrão das curvas de calibração, sendo também executado no preparo das amostras analisadas.

Figura 16 – Obtenção do extrato final em ciclohexano/acetato de etila 1:1.



4.4.2 Preparo das Soluções Padrão das Curvas Analíticas

Após o preparo de um volume suficiente de extrato da amostra (matriz) isenta dos analitos, foram adicionadas alíquotas da solução padrão estoque da mistura dos agrotóxicos em volumes fixos do extrato em balões volumétricos de 5 mL e em seguida aferidos com o próprio extrato para produzir as soluções 0,01; 0,03; 0,05; 0,1; 0,5; 0,75 mg L⁻¹ na matriz.

4.5 Análises Cromatográficas

Para a análise cromatográfica foi utilizado cromatógrafo a gás Thermo Fisher-Scientific GC-MS acoplado a detector espectrômetro de massas Thermo-Fisher-Scientific modelo DSQ II. As injeções foram executadas injetando-se 1,0 µL da amostra, com temperatura do injetor de 250°C operando no modo splitless (sem divisão de fluxo), sendo utilizado gás hélio como gás de arraste (fase móvel) com vazão de 1,0 mL min⁻¹, coluna cromatográfica capilar *OV-5 Bonded*, 5 % fenil 95 % polidimetilsiloxano, 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 corridas cromatográficas foram executadas no modo de temperatura programada com a seguinte programação: temperatura inicial de 100°C permanecendo por 1,0 min, seguindo de aquecimento de 15 °C min⁻¹ até 180°C e posteriormente com aquecimento de 4°C min⁻¹ até 280°C, permanecendo nesta temperatura por 14 min. 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 o método de ionização por impacto de elétrons (EI), utilizando quadrupolo linear como analisador de massas.

Figura 17 – Programação de temperatura do método cromatográficas.

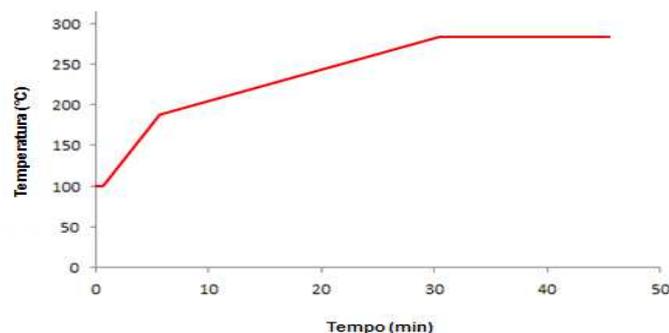


Tabela 4 – Fragmentos dos agrotóxicos monitorados pelo detector – método SIM (continuação)

Agrotóxico	íon de Quantificação	íons de identificação (m/z)
Alacloro	160	146,188
Ametrina	227	170,185,212
Atrazina	200	173,202,215
Azoxistrobina	344	345,388
Bifentrina	97	165,166
Boscalide	140	112,142
<i>cis</i> -Bromuconazol	173	175,295
<i>trans</i> -Bromuconazol	173	175,295
Buprofezina	105	106,172
Carbosulfano	160	118,163
λ -Cialotrina	181	197,208
Ciproconazol	125	125,222
Clorobenzilato	139	251,253
Clorotalonil	266	264,267
<i>cis</i> -Clordano	373	371,375,377
<i>trans</i> -Clordano	373	371,375,377
Cloroneb	191	193,206,208
Clorpirifós	197	199,314,316
Deltametrina	181	251,253
DCPA	301	299,303,332
Difenconazol	265	267,323
Esfenvalerato	125	167,181
Etridiazol	211	183,185,213
Fenarimol	139	107,251
Fenitrotiona	125	109,260,277
Fenpropatrina	97	125,181
Fentiona	278	109,125
Hexaclorobenzeno	286	142,282,284
Imibenconazol	125	127,251
Malationa	127	125,158
Metalaxyl	132	130,160,206
Molinato	126	98,187
Parationa metílica	109	125,263
<i>Cis</i> -Permetrina	183	163,165
<i>Trans</i> -Permetrina	183	163,165
Piraclostrobina	132	133,164
Piriproxifem	136	96,137
Propaclor	120	169,176

Tabela 4 – Fragmentos dos agrotóxicos monitorados pelo detector – método SIM (*conclusão*)

Agrotóxico	íon de Quantificação	íons de identificação (m/z)
Propanil	161	163,217
Propiconazol	173	172,259
Simazina	201	173,186,203
Triazofós	161	162,172
Trifloxistrobina	116	131,145
Triflumizol	278	179,206,287
Trifluralina	306	248,264,290

4.6 Validação do Método

4.6.1 Estudo de Seletividade

A seletividade do método para os compostos estudados foi determinada através da análise da amostra isenta dos analitos (branco da amostra) e da amostra adicionada dos analitos, sob as mesmas condições cromatográficas. Após a obtenção dos cromatogramas referentes ao branco da amostra e à amostra adicionada dos analitos, com o auxílio do detector espectrômetro de massas (EM), foi feita 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 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

4.6.2 Estudo da Linearidade e Faixa Linear

Para os estudos de linearidade e faixa linear foram construídas curvas de calibração conforme descrito na seção 4.4. A linearidade foi avaliada através do coeficiente de correlação R obtido da regressão linear dos coeficientes das curvas de calibração, obtidas pela leitura das 7 concentrações diferentes, avaliando-se também a faixa linear com base nos estudos de linearidade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

4.6.3 Estimativa dos Limites de Detecção (LD)

Os limites de detecção dos compostos foram estimados através da análise de soluções com concentrações decrescentes dos analitos até o menor nível detectável para cada um dos compostos, “método das diluições sucessivas”,

considerando como menor nível detectável a concentração onde se observou a relação sinal/ruído aproximadamente 3 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; RIBANI et al., 2004).

4.6.4 Estimativas dos Limites de Quantificação (LQ)

Os limites de quantificação foram estimados considerando a menor concentração da solução dos analitos que produziu a relação sinal/ruído de aproximadamente 10 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; RIBANI et al., 2004).

4.6.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada através da repetitividade e da precisão intermediária, conforme descrito nas subseções 4.6.5.1 e 4.6.5.2 respectivamente.

4.6.5.1 Repetitividade

Para os estudos de repetitividade foram feitas sete injeções de uma solução contendo todos os analitos na matriz no nível de concentração correspondente a $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$, sendo as sete corridas cromatográficas realizadas sob condições de repetitividade: mesmo analista, mesmo equipamento e num mesmo dia. Finalmente a concentração de cada agrotóxico foi determinada para cada uma das sete réplicas, sendo obtido o coeficiente de variação (CV%) para cada analito como estimativa da repetitividade do método (RIBANI *et al.*, 2004).

4.6.5.2 Precisão Intermediária

Os estudos de precisão intermediária foram conduzidos da mesma maneira que os estudos de repetitividade, sendo as análises executadas em um outro dia por outro analista, no mesmo nível de concentração dos analitos ($0,1 \text{ mg kg}^{-1}$). Finalmente após a quantificação de cada analito nas sete replicatas foi estimado o coeficiente de variação (CV%) (RIBANI *et al.*, 2004).

4.6.6 Exatidão

Os estudos de exatidão foram executados por meio de ensaios de recuperação realizados em três níveis de concentração, um nível baixo, um intermediário e um nível alto, executados em triplicata (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). O nível mais baixo de concentração escolhido foi de $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$, o nível intermediário foi de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ e nível alto foi de $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$.

4.6.6.1 Estudos de Recuperação

Os ensaios de recuperação foram conduzidos através da fortificação das amostras de abacaxi orgânico com solução mista 5 mg L^{-1} dos agrotóxicos, sendo adicionadas alíquotas da solução para dar as concentrações de $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$; $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$ nas réplicas de $10,0 \pm 0,0579 \text{ g}$ de fruto processado, antes da execução do preparo das amostras, conforme figura 18. Após a fortificação das amostras as mesmas foram preparadas conforme o método QuEChERS, como descrito na subseção 4.4.1.

Figura 18 – Esquema da execução dos ensaios de recuperação do método analítico.

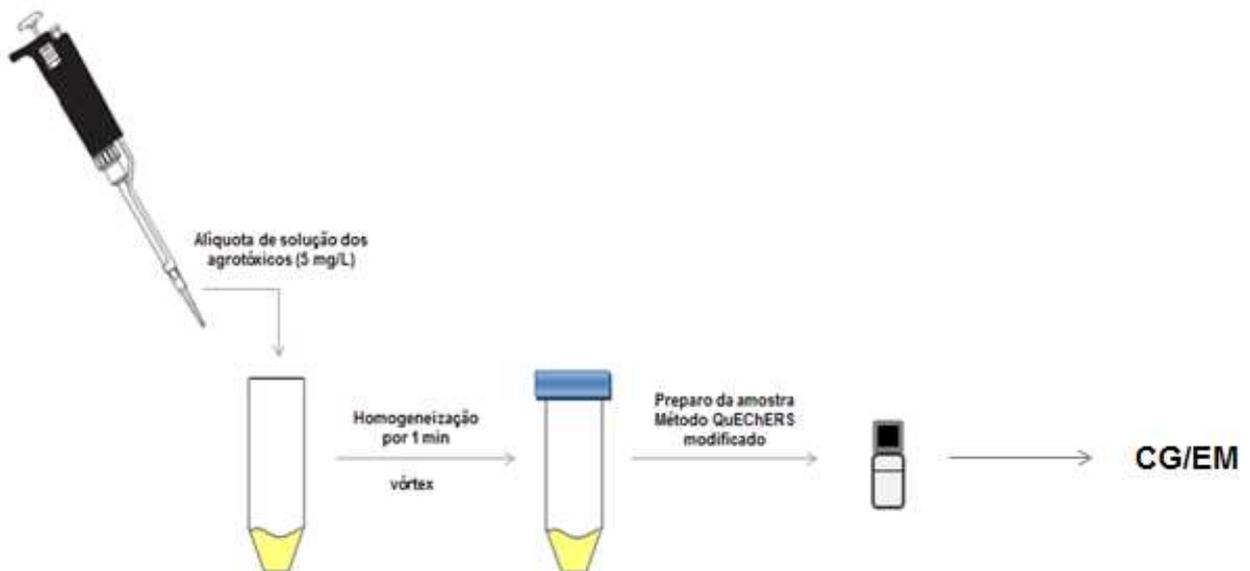


Tabela 5 – Níveis de fortificação e volumes de solução padrão adicionados nas amostras.

Nível de Concentração (mg kg ⁻¹)	Alíquota da Solução 5 mg L ⁻¹	
	dos Agrotóxicos (µL)	
0,05	100	
0,1	200	
0,25	500	

4.7 Análise de Amostras de Abacaxi Obtidas do Mercado Local

Após o desenvolvimento e validação do método analítico, o mesmo foi empregado na determinação dos agrotóxicos pertencentes ao escopo da metodologia desenvolvida em amostras comercializadas. As amostras de frutos abacaxi foram adquiridas no mercado local da cidade de Fortaleza e região metropolitana, sendo oriundas de estabelecimentos localizados em diferentes bairros: São Gerardo, Monte Castelo, Tabapuá (região metropolitana), São João do Tauapé.

As amostras foram preparadas conforme o método QuEChERS-citrato modificado descrito na seção 4.4.1 e os agrotóxicos identificados e quantificados conforme o método cromatográfico descrito na seção 4.5. As análises de cada amostra foram executadas em triplicata para posterior tratamento estatístico dos resultados.

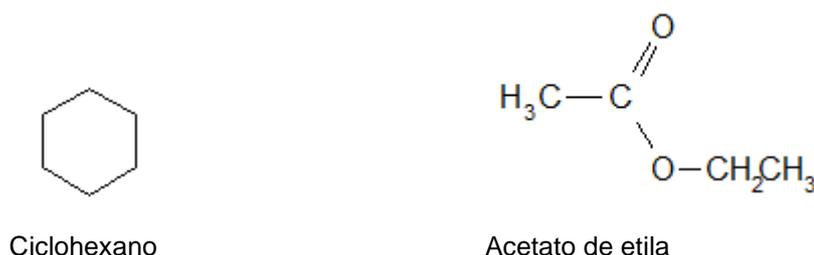
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Aplicação do Método QuEChERS-Citrato Modificado – (Preparo da amostra)

O preparo das amostras empregando-se o método QuEChERS-citrato modificado demonstrou-se eficiente mesmo com a etapa adicional de rota- evaporação do solvente acetonitrila e posterior ressuspensão do extrato com solvente ciclohexano/ acetato de etila 1:1. A inclusão desta etapa foi necessária devido à incompatibilidade do solvente acetonitrila com o sistema para cromatografia gasosa (CG-EM), tendo em vista seu elevado volume de expansão durante a vaporização no sistema injetor do cromatógrafo (MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004 *apud*, PRESTES *et al.*, 2009).

Porém, a acetonitrila foi aplicada como solvente para a obtenção do extrato da amostra até a etapa de limpeza (*clean up*), em virtude do seu maior poder de extração de agrotóxicos de diferentes polaridades, e da extração de menores quantidades de coextrativos lipofílicos como ceras e pigmentos (MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004 *apud*, PRESTES *et al.*, 2009). O solvente misto ciclohexano/ acetato de etila 1:1 empregado para solubilizar o extrato após rota-evaporação da acetonitrila é compatível com o sistema cromatográfico, como também possui uma polaridade adequada para solubilizar bem compostos com variadas polaridades, devido a característica apolar do ciclohexano e a característica relativamente polar do acetato de etila que agem simultaneamente sobre os compostos.

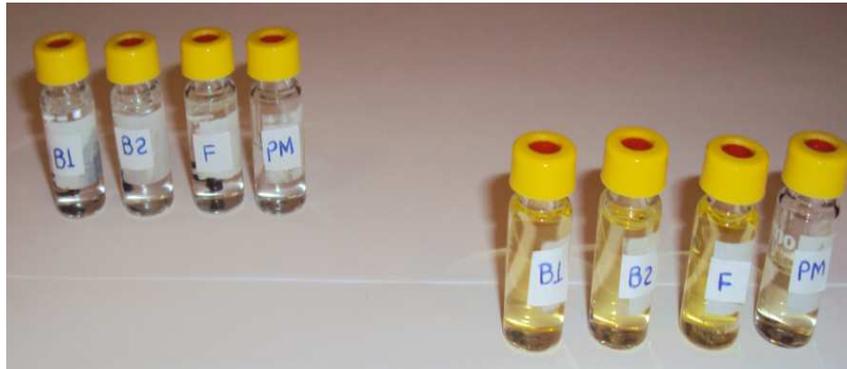
Figura 19 – Estruturas do ciclohexano e do acetato de etila.



O PSA, fase sorvente empregada na etapa de limpeza do extrato, é muito eficiente na remoção de ácidos orgânicos e alguns outros compostos polares presentes na matriz da amostra, porém, pouco eficiente na remoção de pigmentos e esteróis presentes nos extratos vegetais (PRESTES *et al.*, 2009). O uso do carbono

grafitado na etapa de limpeza possibilitou remoção adicional de coextrativos, em especial dos pigmentos presentes no extrato do abacaxi, havendo redução total da coloração amarelada do extrato.

Figura 20 – Extratos de abacaxi obtidos com uso de carbono grafitado (à esquerda) e sem o uso de carbono grafitado (à direita).



A obtenção de extratos mais limpos além de contribuir para redução do efeito de matriz sobre os resultados analíticos ainda evita possíveis danos na instrumentação analítica devido a menor inserção de componentes da matriz no sistema injetor, na coluna cromatográfica e no detector, como também nas interfaces entre essas partes do sistema (PINHO *et al.*,2009).

5.2 Identificação e Quantificação dos Agrotóxicos por CG-EM

A condição de corrida cromatográfica empregada nas análises mostrou-se viável para a separação e detecção da maioria dos compostos estudados. A injeção no modo *63plitless*, sem divisão de fluxo, foi empregada por ser mais adequada para a determinação de compostos em níveis traço de concentração, que compreende concentrações abaixo de 0,01 % na amostra (MCNAIR; MILLER, 1997; SKOOG *et al.*, 2005).

A programação de temperatura estabelecida possibilitou separação conveniente dos compostos num tempo de corrida relativamente baixo (aproximadamente 45 minutos), considerando a quantidade de analitos determinados simultaneamente.

O detector espectrômetro de massas (EM) operando no modo SIM (*Selected Ion Monitoring*), monitoramento de íons selecionados, com método de

ionização por impacto de elétrons (EI), apresentou significativa sensibilidade aos compostos, possibilitando a detecção e quantificação dos mesmos a níveis de concentração próximos aos LMRs (Limites Máximo de Resíduo) estabelecidos pela legislação, tanto para os agrotóxicos aplicáveis a cultura de abacaxi, como para os agrotóxicos não recomendados para esta cultura.

Os fragmentos de quantificação foram selecionados no processamento do método SIM (*Selected Ion Monitoring*) levando-se em consideração a abundância relativa de formação dos fragmentos de cada composto no processo de ionização no detector espectrômetro de massas (EM). Os fragmentos escolhidos como base para quantificação dos agrotóxicos foram os que apresentaram maior abundância relativa, ou seja, os picos base dos espectros de massa de cada composto, possibilitando maior sensibilidade do detector aos analitos.

A avaliação mais fundamentada dos níveis de detecção e quantificação, e sua relação com os limites máximos de concentração estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para os agrotóxicos estudados, é abordada na seção 5.3.3. Na tabela 4 são reportados os tempos de retenção (t_R) obtidos para os compostos, como também algumas propriedades físico-químicas relevantes.

Figura 21 – Cromatograma de amostra padrão da mistura dos agrotóxicos 0,5 mg/L em extrato de abacaxi obtido por CG-EM, modo SIM de monitoramento.

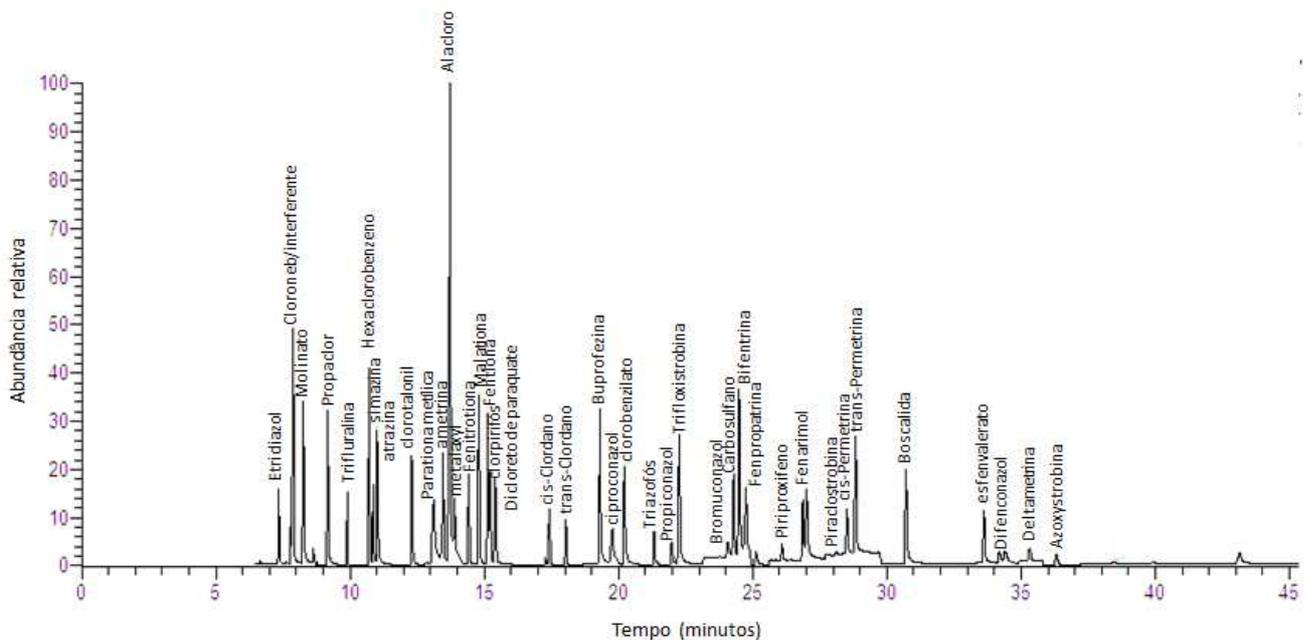


Tabela 6 – Estruturas dos agrotóxicos, tempos de retenção e propriedades físico-químicas, P.E. = ponto de ebulição; P.D. = ponto de degradação térmica; K_{ow} = constante de partição octanol-água e pK_a . (IUPAC, 2012). (Continua)

Agrotóxico	Estrutura	t_R (min)	P.E.(°C)	P.D.(°C)	K_{ow}	pK_a
Alacloro		13,73	100	105	$1,23 \times 10^3$	0,62
Ametrina		13,70	337	-	$4,27 \times 10^2$	10,07
Atrazina		11,03	d.a.e	-	$5,01 \times 10^2$	1,7
Azoxistribina		36,31	d.a.e	-	$3,98 \times 10^4$	-
Bifentrina		24,50	d.a.e	280	$3,98 \times 10^8$	-
Boscalida		31,71	d.a.e.	300	$9,12 \times 10^2$	-
Bromuconazol		24,07	d.a.e	194	$1,74 \times 10^3$	2,75
Buprofezina		19,31	252	177	$8,51 \times 10^4$	-
Cloroneb		7,87	268	268	$3,80 \times 10^3$	-

Tabela 6 – Estrutura química dos agrotóxicos, tempos de retenção e propriedades físico-químicas, P.E. = ponto de ebulição; P.D. = ponto de degradação térmica; Kow = constante de partição octanol-água e pKa. (IUPAC, 2012). (Continuação).

Agrotóxico	Estrutura	t_R (min)	P.E.(°C)	P.D.(°C)	K_{ow}	pK_a
Clorpirifós		15,22	d.a.e	170	$5,01 \times 10^4$	-
Clorobenzilato		20,23	-	-	$3,8 \times 10^4$	-
Clordano		18,04	-	-	-	-
Carbosulfano		24,27	219,3	219,5	$2,63 \times 10^7$	-
Ciproconazol		19,78	d.a.e	299	$1,23 \times 10^3$	-
λ -cialotrina		26,42	d.a.e	-	$7,94 \times 10^6$	-
Dicloreto de Paraquate		15,41	d.a.e	340	-	-
Difenconazol		34,41	101	337	$2,29 \times 10^4$	1,07

Tabela 6 – Estrutura química dos agrotóxicos, tempos de retenção e propriedades físico-químicas, P.E. = ponto de ebulição; P.D. = ponto de degradação térmica; Kow = constante de partição octanol-água e pKa. (IUPAC, 2012). (Continuação).

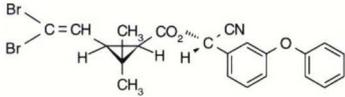
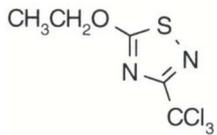
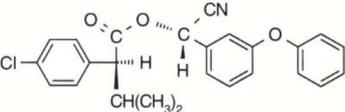
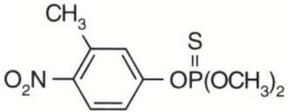
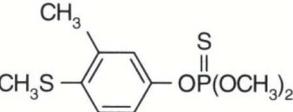
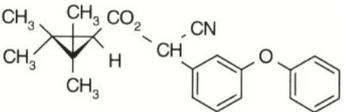
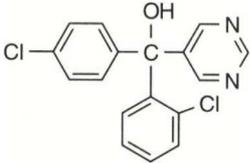
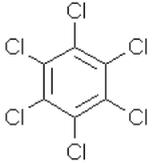
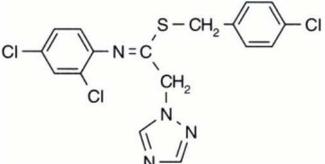
Agrotóxico	Estrutura	t_R (min)	P.E.(°C)	P.D.(°C)	K_{ow}	pK_a
Deltametrina		35,33	d.a.e	-	$3,98 \times 10^4$	-
Etridiazol		7,33	133	-	$2,34 \times 10^3$	-
Esfenvalerato		33,62	360	-	$1,74 \times 10^6$	-
Fenitrotiona		14,44	d.a.e	206	$2,09 \times 10^3$	-
Fentiona		15,13	90	d.a.e	$6,92 \times 10^4$	-
Fenpropatrina		24,76	-	-	-	-
Fenarimol		27,00	-	240	$4,9 \times 10^3$	-
Hexaclorobenzeno		10,77	325	-	$8,51 \times 10^3$	-
Imibenconazol		38,48	-	-	$8,71 \times 10^4$	-

Tabela 6 – Estrutura química dos agrotóxicos, tempos de retenção e propriedades físico-químicas, P.E. = ponto de ebulição; P.D. = ponto de degradação térmica; Kow = constante de partição octanol-água e pKa. (IUPAC, 2012) - (Continuação).

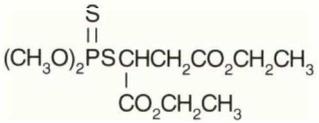
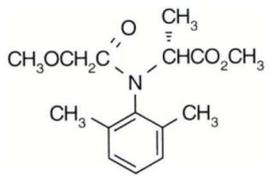
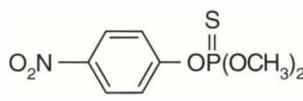
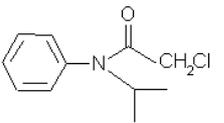
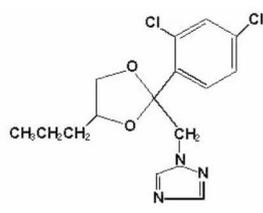
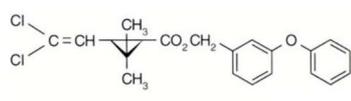
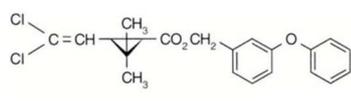
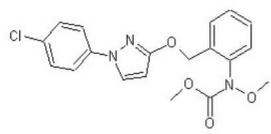
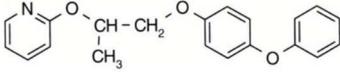
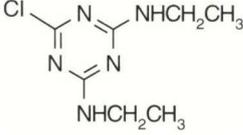
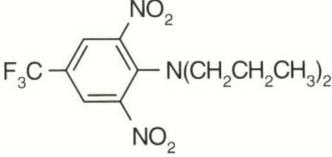
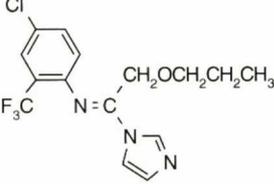
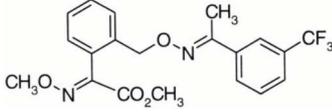
Agrotóxico	Estrutura	t_R (min)	P.E.(°C)	P.D.(°C)	K_{ow}	pK_a
Malationa		14,80	d.a.e	174	$5,62 \times 10^2$	-
Metalaxyl		13,90	d.a.e	-	51,3	-
Molinato		8,26	278	-	$7,24 \times 10^2$	-
Parationa Metílica		13,47	-	-	1000	-
Propaclor		9,16	-	-	39,4	-
Propiconazol		21,99	d.a.e	355	$5,25 \times 10^3$	1,09
<i>cis</i> -Permetrina		28,52	200	-	$1,26 \times 10^6$	-
<i>trans</i> -Permetrina		28,83	200	-	$1,26 \times 10^6$	-
Piraclostrobina		28,14	d.a.e.	200	$9,77 \times 10^3$	-

Tabela 6 – Estrutura química dos agrotóxicos, tempos de retenção e propriedades físico-químicas, P.E. = ponto de ebulição; P.D. = ponto de degradação térmica; Kow = constante de partição octanol-água e pKa. (IUPAC, 2012) - (Continuação).

Agrotóxico	Estrutura	t_R (min)	P.E.(°C)	P.D.(°C)	K_{ow}	pK_a
Piriproxifeno		26,09	318	318	$2,34 \times 10^5$	6,87
Simazina		10,80	d.a.e	226	$2,00 \times 10^2$	-
Trifluralina		9,90	d.a.e	202	$1,86 \times 10^5$	-
Triflumizol		17,30	d.a.e	150	$5,89 \times 10^4$	3,7
Trifloxistrobina		22,27	d.a.e	285	$3,16 \times 10^4$	-

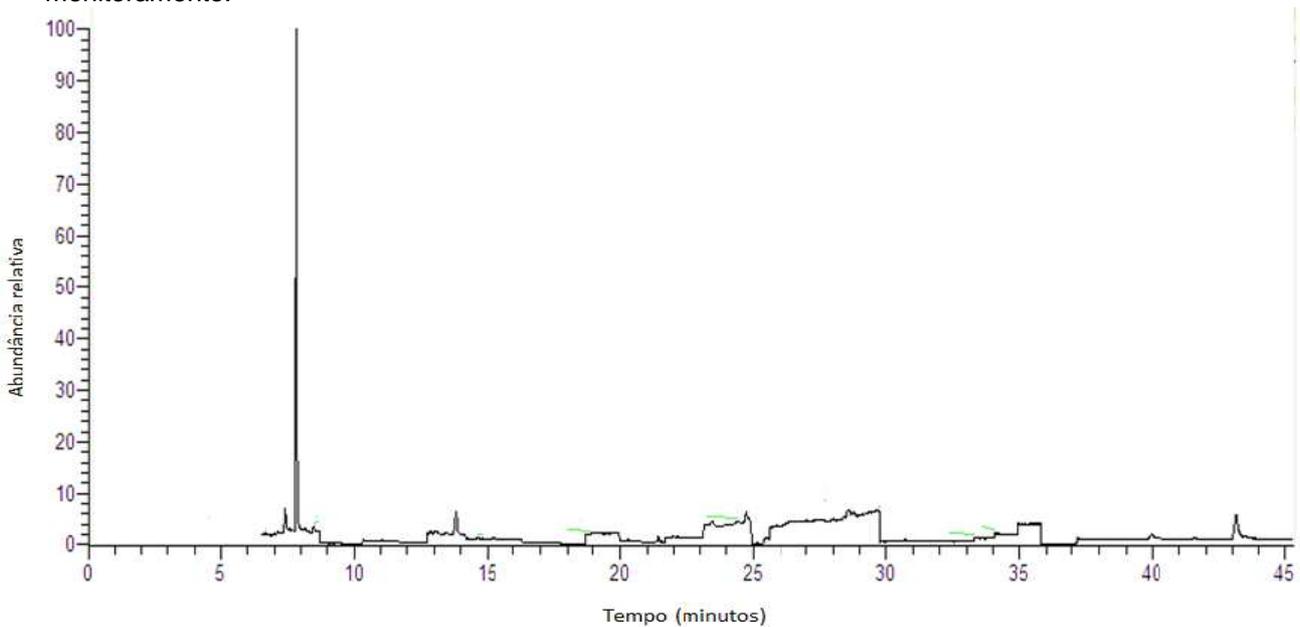
d.a.e. = degrada-se antes da ebulição.

5.3 Validação do Método

5.3.1 Seletividade

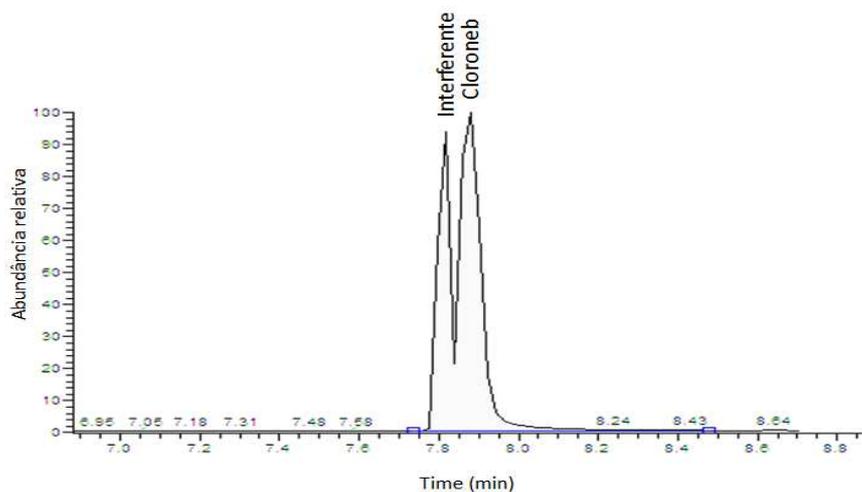
Conforme orientação da resolução ANVISA RE nº 899, que dispõe sobre validação de métodos analíticos, a seletividade do método para os compostos foi avaliada pela comparação entre os cromatogramas do branco da amostra (extrato de abacaxi isento dos analitos) e da amostra fortificada com os compostos, figura 21 e figura 22 respectivamente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

Figura 22 – Cromatograma do branco da amostra (extrato de abacaxi) obtido por CG-EM, modo SIM de monitoramento.



Pela avaliação visual dos cromatogramas do branco e da amostra fortificada pode-se observar que o método é seletivo para todos os agrotóxicos, com exceção do cloroneb. Em torno do tempo de retenção de 7,82 min há a presença de um pico oriundo de um interferente da matriz que não é removido na etapa de limpeza da amostra. Este interferente afeta de maneira significativa o pico cromatográfico relativo ao cloroneb, que possui tempo de retenção de 7,87 min, não havendo resolução satisfatória no sinal analítico deste agrotóxico, como mostra a figura 23.

Figura 23 - Cromatograma dos picos cromatográficos do cloroneb e do composto interferente da matriz.

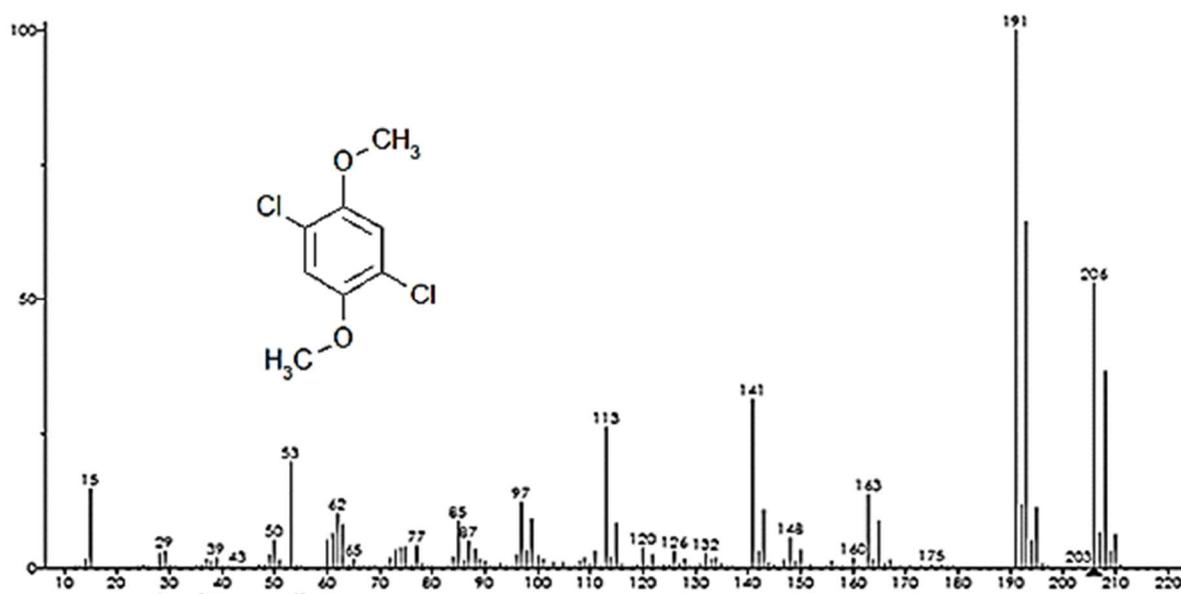


No processamento do método de monitoramento por íons seleccionados (Selected Ion Monitoring-SIM), como apresentado na tabela 3, o fragmento 191 m/z, foi seleccionado como íon de quantificação para o cloroneb (pico base do cloroneb), como pode ser visto no espectro de massas do composto na figura 24, sendo que observado o composto interferente também gera este fragmento.

A possibilidade do composto interferente ser o próprio cloroneb, oriundo de contaminações da amostra devido ao uso deste agrotóxico no cultivo do abacaxi do orgânico não pode ser confirmada, já que não há similaridade dos tempos de retenção dos picos, tendo em vista que o pico relativo ao interferente aparece em todos os cromatogramas das análises tanto de branco da matriz e das amostras fortificadas, como também nos cromatogramas obtidos das análises das amostras de abacaxi do mercado local.

É observado um pico em torno de 13,73 min, muito próximo ao tempo de retenção da ametrina ($t_R = 13,70$ min), de forma que pela avaliação do espectro de massas relativo a este pico, pode-se afirmar a possibilidade de presença de resíduos deste composto ou de um metabólito na amostra de abacaxi orgânico, já que há a detecção significativa dos fragmentos m/z 227 (íon de quantificação) e m/z 185 (um dos íons de confirmação).

Figura 24 – Espectro de massas do cloroneb obtido por ionização por impacto de elétrons 70 eV.



5.3.2 Linearidade e faixa Linear

A linearidade do método para os compostos foi avaliada através do coeficiente de correlação (R) obtido por regressão linear dos coeficientes de regressão das curvas de calibração. A linearidade mostrou-se adequada para a maioria dos compostos, considerando que os valores de R variaram na faixa de 0,9593 a 0,9996 (tabela 5), com exceção da λ -cialotrina, difenconazol e metalaxyl, que não apresentaram nenhuma correlação linear na faixa de concentração estudada, sendo excluídos do método, assim como o cloroneb, para o qual o método não apresentou seletividade.

Para os demais analitos, a faixa de concentração avaliada, na qual se obteve melhor linearidade foi de 0,01 a 0,5 mg/kg, sendo considerada como faixa linear adequada para a quantificação dos agrotóxicos. Com base na avaliação dos coeficientes de correlação, pode-se afirmar que neste intervalo existe relação de proporcionalidade linear significativa entre a concentração e o sinal analítico do detector (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; RIBANI *et. al.*, 2004).

Tabela 7 – Curvas de calibração dos analitos e coeficientes de correlação.

Agrotóxico	Curva Analítica	R
Alacloro	$y = 11.800.125x - 13.586$	0,9982
Ametrina	$y = 6.476.643x - 133.092$	0,9985
Atrazina	$y = 1.802.548x - 23.689$	0,9978
Azoxistrobina	$y = 384.817x - 12.115$	0,9966
Bifentrina	$y = 3.388.131x - 58.816$	0,9969
Boscalida	$y = 2.263.134x - 47.882$	0,9957
<i>cis</i> -Bromuconazol	$y = 231.359x + 3.156$	0,9778
<i>trans</i> -Bromuconazol	$y = 293.950x - 6.923$	0,9950
Buprofezina	$y = 2.174.089x - 40.277$	0,9974
Carbosulfano	$y = 982.252x - 15.706$	0,9970
Ciproconazol	$y = 435.640x - 39.009$	0,9546
Clorobenzilato	$y = 2.332.108x - 58.027$	0,9963
Clorotalonil	$y = 2.241.670x - 33.180$	0,9990
<i>cis</i> -Clordano	$y = 927.771x - 18.872$	0,9953

Tabela 7 -- Curvas de calibração dos analitos e coeficientes de correlação. (Conclusão)

Agrotóxico	Curva Analítica	R
<i>trans</i> -Clordano	$y = 789.643x - 16.285$	0,9958
Clorpirifós	$y = 1.168.280x - 21.282$	0,9979
Deltametrina	$y = 309.019x - 9.664$	0,9966
DCPA	$y = 1.736.156x - 30.951$	0,9976
Esfenvalerato	$y = 797.848x - 26.200$	0,9958
Etridiazol	$y = 807.127x - 6.740$	0,9998
Fenarimol	$y = 1.220.766x - 16.985$	0,9966
Fenitrotiona	$y = 868.033x - 19.289$	0,9972
Fenpropatrina	$y = 1.093.369x - 6.225$	0,9956
Fentiona	$y = 1.860.305x - 33.102$	0,9973
Hexaclorobenzeno	$y = 2.309.966x - 14.709$	0,9996
Malationa	$y = 1.257.435x - 15.680$	0,9983
Molinato	$y = 3.544.138x + 7.436$	0,9948
Parationa metílica	$y = 1.726.299x - 22.366$	0,9978
<i>cis</i> -Permetrina	$y = 1.834.125x - 42.104$	0,9940
<i>trans</i> -Permetrina	$y = 4.643.914x - 119.721$	0,9932
Piraclostrobina	$y = 198.201x - 7296$	0,9958
Piriproxifem	$y = 408.983x - 8.219$	0,9964
Propaclor	$y = 4.312.207x - 8.626$	0,9994
Propanil	$y = 2.146.760x - 24.025$	0,9977
Propiconazol	$y = 314.481x - 7.026$	0,9957
Simazina	$y = 1.020.814x - 10.640$	0,9976
Triazofós	$y = 440.001x + 12.638$	0,9954
Trifloxistrobina	$y = 1.431.270x - 28.490$	0,9964
Triflumizol	$y = 132.381x - 1.750$	0,9947
Trifluralina	$y = 846.319x - 16.289$	0,9980

Idealmente, as linhas de regressão obtidas para as curvas de calibração deveriam passar pela origem, ou seja, com intercepto da curva passando pelo ponto (0,0) dos eixos cartesianos (LIGIERO, 2009; NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002). Como pode ser observado na tabela 5, a maioria das curvas obtidas possuem desvios negativos em seus coeficientes lineares (interceptos), com exceção das curvas para *cis*-bromuconazol, molinato e triazofós que possuem desvios positivos.

Devido aos desvios observados, foi realizado teste estatístico de significância dos parâmetros das curvas de calibração, para avaliar a magnitude de significância desses parâmetros para as equações das curvas de calibração utilizadas nos cálculos de concentração dos analitos (LIGIERO, 2009; NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002).

5.3.2.1 Teste de Significância dos Parâmetros de Calibração

O teste de significância dos parâmetros de calibração das curvas é baseado num teste de hipótese aplicando o parâmetro t de Student. Para avaliar a significância estatística de um parâmetro foram obtidos os desvios para os coeficientes angulares e lineares das equações de regressão. O valor de t_{calc} (valor de t calculado) foi obtido da razão entre o valor de cada parâmetro e o seu respectivo desvio (BARROS NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002).

O valor de t calculado (t_{calc}) para os parâmetros foi comparado com o valor de t crítico tabelado (t_{crit}), para o nível de confiança de 99 % e 4 graus de liberdade ($GL = N - 2$), para $N = 6$, sendo N o número de pontos das curvas, com $t_{crit} = 4,78$. Quando t_{calc} é menor do que t_{crit} , a hipótese de que o desvio é insignificante estatisticamente é aceita, sendo o parâmetro de calibração excluído da equação da curva para o cálculo das concentrações dos analitos (LIGIERO, 2009; BARROS NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002). Os resultados são expressos na tabela 8.

Tabela 8 – Resultados do teste estatístico de significância dos parâmetros das curvas de calibração. a = coeficiente angular; s_a = desvio do coeficiente angular; b = coeficiente linear; s_b = desvio do coeficiente linear; $t_{calc,a}$ = valor de t calculado para coef. angular ; $t_{calc,b}$ = valor de t calculado para coef. linear.

Agrotóxico	a	s_a	$t_{calc,a}$	b	s_b	$t_{calc,b}$	Teste t	Curva final
Alacloro	11.800.125	34.864	33,8	-13.586	7.841	1,73	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 11.800.125x$
Ametrina	6.476.643	177.526	36,4	- 133092	39.927	3,33	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 6.476.643x$
Atrazina	1.802.548	59.868	30,1	- 23.689	13.465	1,76	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 1.802.548x$
Azoxistrobina	384.817	22.382	17,2	- 23.689	5.034	2,41	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 384.817x$
Bifentrina	3.388.131	133.835	25,3	- 58.816	30.100	1,95	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 3.388.131x$

Tabela 8 (continuação) – Resultados do teste estatístico de significância dos parâmetros das curvas de calibração. a = coeficiente angular; s_a = desvio do coeficiente angular; b = coeficiente linear; s_b = desvio do coeficiente linear; $t_{calc,a}$ = valor de t calculado para coef. angular ; $t_{calc,b}$ = valor de t calculado para coef. linear.

Agrotóxico	a	s_a	$t_{calc,a}$	b	s_b	$t_{calc,b}$	Teste t	Curva final
Boscalide	2.263.134	105.055	21,5	- 47.882	23.628	2,03	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 2.263.134x$
<i>cis</i> -Bromuconazol	231.359	24.797	9,3	3.156	5.577	0,57	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 231.359x$
<i>trans</i> -Bromuconazol	293.950	14.678	20,0	- 6.923	3.301	2,10	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 293.950x$
Buprofezina	2.174.089	78.213	27,8	- 40.277	17.591	2,29	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 2.174.089x$
Carbosulfano	982.252	37.790	26,0	- 15.706	8.499	1,85	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 982.252x$
Ciproconazol	435.640	78.455	5,55	- 39.009	32.632	1,19	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 435.640x$
Clorobenzilato	2.332.108	100.033	23,3	- 58.027	24.498	2,37	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 2.332.108x$
Clorotalonil	2.241.670	49.520	45,3	- 33.180	11.137	2,98	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 2.241.670x$
<i>cis</i> -Clordano	927.771	44.982	20,6	- 18.872	10.117	1,86	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 927.771x$
<i>trans</i> -Clordano	789.643	36.059	21,9	- 16.285	8.110	2,01	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 789.643x$
Clorpirifós	1.168.280	37.952	30,8	- 21.282	8.535	2,49	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 1.168.280x$
Deltametrina	309.019	14.805	20,9	- 9.664	3.647	2,65	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 309.019x$
DCPA	1.736.156	59.440	29,2	- 30.951	13.369	2,32	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 1.736.156x$
Esfenvalerato	797.848	42.446	18,8	- 26.200	10.456	2,50	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 797.848x$
Etridiazol	807.127	8.487	95,1	- 6.740	1.909	3,53	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 807.127x$
Fenarimol	1.220.766	50.652	24,1	- 16.985	11.372	1,49	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 1.220.766x$
Fenitrotiona	868.033	32.603	26,6	- 19.289	7.333	2,02	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 868.033x$
Fenpropatrina	1.093.369	51.437	21,3	- 6.225	11.568	0,54	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 1.093.369x$
Fentiona	1.860.305	68.243	27,3	- 33.102	15.248	2,15	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 1.860.305x$

Tabela 8 (continuação) – Resultados do teste estatístico de significância dos parâmetros das curvas de calibração. a = coeficiente angular; s_a = desvio do coeficiente angular; b = coeficiente linear; s_b = desvio do coeficiente linear; $t_{calc,a}$ = valor de t calculado para coef. angular ; $t_{calc,b}$ = valor de t calculado para coef. linear.

Agrotóxico	a	s_a	$t_{calc,a}$	b	s_b	$t_{calc,b}$	Teste t	Curva final
Hexaclorobenzeno	2.309.966	32.843	70,3	-14.709	7.387	2,00	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 2.309.966x$
Malationa	1.257.435	36.780	34,2	-15.680	8.272	1,89	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 1.257.435x$
Molinato	3.544.138	181.091	19,6	7.436	40.729	0,1	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 3.544.138x$
Parationa metílica	1.726.299	57.465	30,0	-22.366	12.924	1,73	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 1.726.299x$
<i>cis</i> -Permetrina	1.834.125	100.462	18,3	-42.104	22.595	1,86	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 1.834.125x$
<i>trans</i> -Permetrina	4.643.914	271.722	17,1	-119.721	61.112	1,96	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 4.643.914x$
Piraclostrobina	198.201	36.780	34,2	-7.296	8.272	1,89	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 198.296x$
Piriproxifeno	408.983	17.451	23,4	-8.219	3.925	2,09	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 408.983x$
Propaclor	4.312.207	75.301	57,3	-8.626	16.936	0,51	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 4.312.207x$
Propiconazol	314.481	14.642	21,5	-7026	3.293	2,13	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 314.481x$
Propanil	2.146.760	72.458	29,6	-24025	16.296	1,47	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 2.146.760x$
Simazina	1.020.814	34.930	29,2	-10.640	7.856	1,35	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 1.020.814x$
Triazofós	440.001	21.201	20,8	12.638	4.768	2,65	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 440.001x$
Trifloxistrobina	1.431.270	60.437	23,7	-28.490	13.593	2,10	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 1.431.270x$
Triflumizol	132.381	6.860	19,3	-1.750	1.543	1,13	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 132.381x$
Trifluralina	846.319	26.913	31,4	-16.289	6.053	2,69	$t_{calc,a} > t_{crit}$ $t_{calc,b} < t_{crit}$	$y = 846.319x$

Como pode ser observado na tabela 8, os resultados da análise estatística de significância dos parâmetros mostrou que todos os coeficientes angulares das curvas de calibração são significativos, enquanto todos os coeficientes lineares não são significativos, já que $t_{calc,a} > t_{crit}$ e $t_{calc,b} < t_{crit}$ para todas as equações das curvas.

Desta forma, os coeficientes lineares de todas as curvas foram desconsiderados em todas as equações, já que de acordo com o teste estatístico, esses parâmetros se mostraram não significativos, ou seja, podendo ser considerados zero nos cálculos das concentrações dos analitos (LIGIERO, 2009; NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002).

5.3.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método para os compostos, determinados pela análise de amostras com concentrações decrescentes dos analitos (métodos das diluições sucessivas), considerando a relação sinal/ruído aproximadamente 3 para a concentração estimada como LD e relação sinal/ruído próxima de 10 para a concentração estimada como LQ, para cada composto, com os valores expressos na tabela 9 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; RIBANI, M. *et. al.*, 2004).

Tabela 9 – Limites de detecção e quantificação do método para os agrotóxicos e respectivos LMR's.(Continua).

Agrotóxico	LD (mg/kg)	LQ (mg/kg)	LMR (mg/kg) abacaxi	LMR (mg/kg) outras matrizes
Alacloro	0,005	0,015	NA	0,02 (amendoim); 0,05 (milho)
Ametrina	0,005	0,015	0,020	-
Atrazina	0,005	0,015	0,020	-
Azoxistrobina	0,010	0,030	NA	0,2 (banana); mamão (0,3); 0,05 (melão)
Bifentrina	0,010	0,030	NA	0,1 (manga); 0,3 (mamão); 0,05 (melão)
Boscalide	0,005	0,015	NA	0,05 (melão); 0,05 (pepino); 3,0 (uva)
<i>cis</i> -Bromuconazol	0,010	0,030	NA	0,05 (goiaba); 0,05 (manga); 0,1 (tomate)

Tabela 9 – Limites de detecção e quantificação do método para os agrotóxicos e respectivos LMR's.(Continuação)

Agrotóxico	LD (mg/kg)	LQ (mg/kg)	LMR (mg/kg) abacaxi	LMR (mg/kg) outras matrizes
Buprofezina	0,005	0,015	NA	0,3 (melão); 0,05 (feijão); 0,3 (pepino)
Carbosulfano	0,010	0,030	NA	0,1 (mamão); 0,05 (manga); 0,05 (tomate)
Ciproconazol	0,050	0,150	NA	0,4 (Maçã); 0,2 (figo)
Clorobenzilato	0,005	0,015	NA	-
Clorotalonil	0,005	0,015	NA	3,0 (banana); 3,0 (mamão); 0,5 (melão)
<i>cis</i> -Clordano	0,005	0,015	NA	-
<i>trans</i> -Clordano	0,005	0,015	NA	-
Clorpirifós	0,005	0,015	NA	1,0 (batata); 1,0 (maçã); 2,0 (feijão)
Deltametrina	0,03	0,09	0,01	-
DCPA	0,005	0,015	0,050	-
Esfenvalerato	0,020	0,060	NA	1,0 (milho); 1,0 (arroz)
Etridiazol	0,010	0,030	NA	-
Fenarimol	0,005	0,015	NA	0,05 (melancia); 0,05 (melão); 0,05 (uva)
Fenitrotiona	0,005	0,015	NA	0,5 (Maça); 0,05 (cebola); 0,2 (milho)

Tabela 9 – Limites de detecção e quantificação do método para os agrotóxicos e respectivos LMRs(Continuação).

Agrotóxico	LD (mg/kg)	LQ (mg/kg)	LMR (mg/kg) abacaxi	LMR (mg/kg) outras matrizes
Fenpropatrina	0,005	0,015	NA	2,0 (Mamão); 0,4 (milho); 1,0 (maçã)
Fentiona	0,005	0,015	NA	0,05 (goiaba); 0,05 (manga); 0,05 (melão)
Hexaclorobenzeno	0,005	0,015	NA	-
Malationa	0,005	0,015	NA	8,0 (alface); 2,0 (maçã); 3,0 (pepino)
Molinato	0,005	0,015	NA	0,1 (arroz)
Parationa metílica	0,005	0,015	NA	0,1 (milho); 0,1 (batata)
<i>cis</i> -Permetrina	0,005	0,015	NA	0,1 (couve); 0,3 (tomate); 0,1 (milho)
Piraclostrobina	0,015	0,03	NA	-
Piriproxifeno	0,010	0,030	NA	0,5 (pimentão); 0,1 (tomate); 5,0 (uva)
Propaclor	0,005	0,015	NA	-
Propiconazol	0,005	0,015	NA	0,1 (arroz); 0,1 (banana); 0,1 (tomate)
Simazina	0,005	0,015	0,020	-
Triazofós	0,005	0,015	NA	0,05 (batata); 0,5 (tomate); 0,1 (repolho)
Trifloxistrobina	0,005	0,015	NA	0,05 (banana); 0,05 (goiaba); 0,05 (mamão)

Tabela 9 – Limites de detecção e quantificação do método para os agrotóxicos e respectivos LMRs. (Conclusão)

Agrotóxico	LD (mg/kg)	LQ (mg/kg)	LMR (mg/kg) abacaxi	LMR (mg/kg) outras matrizes
Triflumizol	0,005	0,015	NA	0,1 (melancia); 0,1 (melão); 0,1 (pepino)
Trifluralina	0,005	0,015	NA	0,05 (cenoura); 0,05 (pimentão); 0,05 (tomate)

NA = não aplicável.

Dos compostos estudados, a ametrina, atrazina, deltametrina e simazina são os únicos que possuem aplicação permitida nas culturas de abacaxi, conforme orientação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012 a). Destes compostos, apenas a deltametrina (LQ = 0,09 mg/kg) não apresentou um limite de quantificação viável, considerando que seu LQ apresentou-se num nível de concentração acima do Limite Máximo de Resíduo (LMR = 0,01 mg/kg) recomendado, como pode ser observado na tabela 9.

Os demais agrotóxicos não aplicáveis à cultura de abacaxi, englobados pela validação, apresentaram limites de quantificação significativamente baixos, se considerados os LMRs definidos para outros frutos e hortaliças. Portanto o método também pode ser aplicado na determinação desses agrotóxicos não recomendados à cultura de abacaxi, a níveis de concentração análogos aos limites máximos de resíduo permitidos (LMR) para muitos outros frutos e hortaliças. A percepção desta característica de desempenho do método é importante, pois credencia o método para análise de amostras reais que porventura possam apresentar esses agrotóxicos não permitidos pelas instituições fiscalizadoras.

5.3.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada através da repetitividade e da precisão intermediária, com os resultados para as estimativas dos coeficientes de variação (CV) relativos a cada analito, para ambos os testes, expressos na tabela 10. O limite máximo para o coeficiente de variação (CV), para que o método seja considerado preciso para um dado analito, é de 20 %, para o nível de concentração de 0,1 mg/kg,

nível que foi testado neste estudo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007).

Tabela 10 – Parâmetros de precisão intermediária do método. (Continua)

Agrotóxico	Repetitividade	Precisão Intermediária
	CV (%)	CV (%)
Alacloro	6,8	25,0
Ametrina	6,0	19,3
Atrazina	5,4	23,1
Azoxistrobina	26,4	34,4
Bifentrina	21,0	26,7
Boscalide	25,1	29,5
<i>cis</i> -Bromuconazol	24,7	30,7
<i>trans</i> -Bromuconazol	24,5	30,4
Buprofezina	10,0	19,1
Carbosulfano	24,8	28,5
Ciproconazol	15,9	15,9
Clorobenzilato	33,9	37,0
Clorotalonil	5,8	29,6
<i>cis</i> -Clordano	11,0	29,1
<i>trans</i> -Clordano	11,0	30,0
Clorpirifós	6,8	31,5
Deltametrina	28,9	28,7
Dicloreto de paraquate	9,3	30,1
Esfenvalerato	28,4	27,1
Etridiazol	4,2	36,6
Fenarimol	28,4	37,7
Fenitrotona	10,0	26,4
Fenpropatrina	34,2	39,5
Fentiona	6,5	27,3
Hexaclorobenzeno	5,4	31,5
Malationa	7,2	25,8
Molinato	3,1	24,0
Parationa metílica	8,1	27,8
<i>Cis</i> -Permetrina	40,0	41,6
<i>Trans</i> -Permetrina	41,5	41,3
Piraclostrobina	27,0	41,0
Piriproxifeno	28,9	28,1
Propaclor	4,8	28,3

Tabela 10 – Parâmetros de precisão intermediária do método (Conclusão).

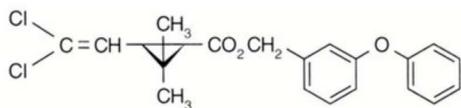
Agrotóxico	Repetitividade	Precisão Intermediária
	CV (%)	CV (%)
Propanil	14,6	16,5
Propiconazol	24,6	29,4
Simazina	5,4	18,4
Triazofós	24,3	30,7
Trifloxistrobina	20,1	67,0
Triflumizol	17,1	29,0
Trifluralina	6,2	26,2

Os compostos avaliados no desenvolvimento do método que apresentaram repetitividade adequada foram: alacloro (CV = 6,8%), ametrina (CV= 6,0%), atrazina (CV= 5,4%), buprofezina (10,0 %), ciproconazol (CV = 15,9%) , clorotalonil (CV = 5,8%), *cis*-clordano (CV = 11,0 %), *trans*-clordano (CV = 11,0 %) , clorpirifós, (CV = 6,8 %), dicloreto de paraquate (CV = 9,3 %), etridiazol (CV = 4,2%), fenitrotiona (CV = 10,0 %), fentiona (CV = 6,5 %), hexaclorbenzeno (CV = 5,4 %), malationa (CV = 7,2%), molinato (CV = 3,1 %), parationa metilica (CV = 8,1 %), propaclor (CV = 4,8 %), propanil (CV = 14,6%), simazina (CV = 5,4%), triflumizol (CV = 6,2 %). O método apresenta precisão intra-corrída adequada para os compostos acima citados, tendo em vista que os mesmos apresentaram coeficientes de variação abaixo do limite máximo aceitável de 20 %, para o nível de fortificação avaliado (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007).

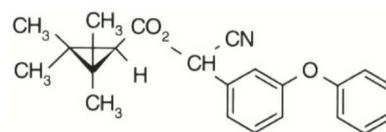
Pode-se observar que os compostos *cis*-permetrina (CV = 40,0 %), *trans*-permetrina (CV = 41,5 %), fenpropatrina (CV = 34,2 %), deltametrina (CV = 28,9 %), piriproxifem (CV = 28,9 %) apresentaram as menores precisões intra-corrída, sendo importante salientar que todos possuem similaridades estruturais em suas moléculas, sendo todos eles da classe dos piretróides, com exceção do piriproxifeno, que é um éter piridilóxiopropílico.

A elevada variabilidade dos resultados relativos a esses compostos pode estar relacionada com a elevada massa molar dos mesmos, que dificulta sua volatilização no sistema de injeção, de maneira que uma dada fração das moléculas fica retida no injetor e apenas uma menor quantidade dos analitos efetivamente chega à coluna cromatográfica e conseqüentemente ao detector, produzindo menores respostas analíticas, comprometendo a precisão (PINHO *et al*,2009).

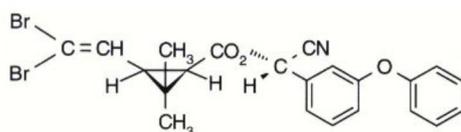
Figura 25 – Estrutura da cipermetrina, fenpropatrina, deltametrina e piriproxifeno.



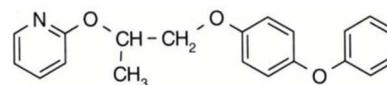
Permetrina ($M = 391,9$ g/mol)



Fenpropatrina ($M = 349,4$ g/mol)



Deltametrina ($M = 505,2$ g/mol)



Piriproxifeno ($M = 321,7$ g/mol)

5.3.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da estimativa do percentual de recuperação dos compostos, como forma de quantificar o erro médio associado à determinação de cada agrotóxico na amostra, através do método proposto.

5.3.5.1 Estudos de Recuperação

Os ensaios de recuperação foram executados conforme descrito na subseção 4.6.6.1, sendo os resultados dos percentuais de recuperação médios associados aos seus respectivos desvios padrão apresentados na tabela 11. A faixa de recuperação tradicionalmente recomendada para métodos analíticos de determinação de resíduos (análise a nível traço) compreende valores de 70 a 120% com precisão aceitável de ± 20 %. É importante considerar que a exatidão dos métodos analíticos é bastante dependente do nível de concentração dos analitos na amostra, de forma que, geralmente, a variabilidade dos resultados é mais significativa em níveis de concentração mais baixos (RIBANI *et. al.*, 2004).

Tabela 11 – Recuperações médias dos agrotóxicos e seus desvios padrão em três níveis de concentração.

Agrotóxico	Níveis		
	0,05 (mg kg ⁻¹)	0,10 (mg kg ⁻¹)	0,25 (mg kg ⁻¹)
	Rec(%)		
Alacloro	220 ± 28,3	220 ± 14,0	216 ± 5,7
Ametrina	120 ± 28,3	105 ± 35,4	120 ± 5,7
Atrazina	199 ± 1,4	195 ± 7,1	188 ± 0,0
Azoxistrobina	81 ± 4,2	71 ± 3,5	73 ± 5,4
Boscalide	83 ± 12,7	81 ± 2,1	76,4 ± 5,1
cis-bromuconazol	273 ± 63,6	271 ± 6,4	258 ± 10,7
Buprofezina	177 ± 2,8	171,2 ± 9,9	162 ± 0,3
Clorobenzilato	146 ± 17,0	184 ± 7,8	202 ± 40,2
Clorotalonil	5 ± 1,4	2,2 ± 0,7	11 ± 6,8
Clorpirifós	149 ± 15,9	180 ± 0,7	220 ± 49,2
cis-clordano	186 ± 14,1	226 ± 0,7	277,4 ± 61,9
trans-clordano	208 ± 11,3	236 ± 4,2	268 ± 50,1
Ciproconazol	97 ± 4,2	101 ± 3,5	91 ± 1,7
Dicloreto de paraquate	173 ± 7,1	203 ± 4,9	233 ± 46,4
Deltametrina	102 ± 28,3	107 ± 1,4	101 ± 14,4
Etridiazol	16 ± 4,2	9 ± 1,4	23,8 ± 17,3
Esfenvalerato	122 ± 8,5	117 ± 13,4	113 ± 2,5
Fenitrotona	156 ± 2,8	157 ± 9,9	157 ± 4,0
Fentiona	8,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	8,0 ± 1,7
Fenpropatrina	222 ± 31,1	209 ± 12,0	178 ± 1,1
Fenarimol	109 ± 15,6	120 ± 8,5	113 ± 0,6
Hexaclorobenzeno	31 ± 9,0	30 ± 2,1	63 ± 34,2
Malationa	184 ± 1,4	189 ± 0,7	185 ± 1,4
Molinato	16 ± 0,0	27 ± 3,5	64 ± 17,5
Parationa metílica	172 ± 0,0	181 ± 10,0	160 ± 9,1
Propaclor	143 ± 16,0	160 ± 7,8	194 ± 65,3
Propiconazol	166 ± 28,3	181 ± 6,4	158 ± 0,6
cis-permetrina	150 ± 14,1	173 ± 7,1	177 ± 37,6
trans - permetrina	137 ± 21,2	160 ± 5,7	169 ± 35,6
Piraclostrobina	164 ± 5,7	160 ± 7,8	158 ± 5,4
Piriproxifeno	88 ± 34	108 ± 9,9	110 ± 6,2
Simazina	81 ± 1,4	87 ± 0,7	94,2 ± 5,9
trifluralina	84 ± 2,8	99 ± 14,8	159 ± 68,7
Triflumizol	204 ± 0,0	109 ± 11,3	112 ± 5,1
Triazofós	174 ± 38,3	197 ± 19,8	105 ± 8,2
Trifloxistrobina	186 ± 17,0	189 ± 14,1	175,2 ± 3,4

Em casos onde haja certa complexidade analítica e/ou da amostra, uma faixa de valores de recuperação mais ampla pode ser considerada aceitável, de forma que valores que variem entre 50 e 120%, com precisão de $\pm 15\%$, podem ser considerados adequados (RIBANI *et. al.*, 2004). Excepcionalmente, em casos onde a recuperação encontra-se abaixo de 50 %, porém, é reprodutível, demonstrando boa precisão, pode ser considerada viável, sendo convenientemente fundamentada. Em situações que são obtidos baixos níveis de recuperação, porém, reprodutíveis em diferentes níveis de fortificação, pode se considerar a ocorrência de processos específicos com o analito em questão, que se reproduzem durante a execução do método, de forma semelhante, como por exemplo, a baixa partição das moléculas de

um determinado agrotóxico para o solvente de extração, durante o preparo da amostra (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007).

5.4 Análises de Amostras de Abacaxi do Mercado Local

As análises das amostras de frutos de abacaxi obtidas no mercado local, oriundas de diferentes bairros da cidade de Fortaleza, mostram que a grande maioria dos agrotóxicos não foi detectada nas amostras analisadas, apresentando níveis abaixo do limite de detecção (LD) ou abaixo do limite de quantificação (LQ), conforme tabela 9.

Na amostra obtida na região de Monte Castelo foram detectados os agrotóxicos fenproprina e piraclostrobina em níveis acima dos seus respectivos LQs. Na amostra oriunda do bairro Tabapuá também foram detectados os agrotóxicos piraclostrobina e fenproprina, como também, o triflumizol, estando este último e a fenproprina em níveis acima dos seus LQs. Na amostra coletada na região de São Gerardo, foi detectado o agrotóxico ametrina ($t_R = 13,70$ min), em um nível de concentração próximo ao limite máximo de resíduo (LMR) para este composto conforme tabela 9.

Tabela 12 – Resultados das análises das amostras de abacaxi obtidas no mercado de Fortaleza. (Continua)

Agrotóxico	LMR (mg/kg)	LQ (mg/kg)	Amostra SG (mg/kg)	Amostra SJT (mg/kg)	Amostra MC (mg/kg)	Amostra TAB (mg/kg)
Alacloro	NA	0,015	< LD	< LD	< LD	< LD
Ametrina	0,02	0,015	0,02 ± 0,003	< LD	< LQ	< LQ
Atrazina	0,02	0,015	< LD	< LD	< LD	< LD
Azoxistrobina	NA	0,03	< LD	< LD	< LD	< LD
Bifentrina	NA	0,03	< LD	< LD	< LD	< LD
Boscalide	NA	0,015	< LD	< LD	< LD	< LD
cis-bromuconazol	NA	0,03	< LD	< LD	< LD	< LD
trans-bromuconazol	NA	0,03	< LD	< LD	< LD	< LD
Buprofezina	NA	0,015	< LQ	< LD	< LD	< LD
Clorobenzilato	NA	0,015	< LQ	< LD	< LQ	< LD
Clorotalonil	NA	0,015	< LD	< LD	< LD	< LD
Clorpirifós	NA	0,015	< LD	< LD	< LD	< LD
cis-Clordano	NA	0,015	< LD	< LD	< LD	< LD
trans-Clordano	NA	0,015	< LD	< LD	< LD	< LD

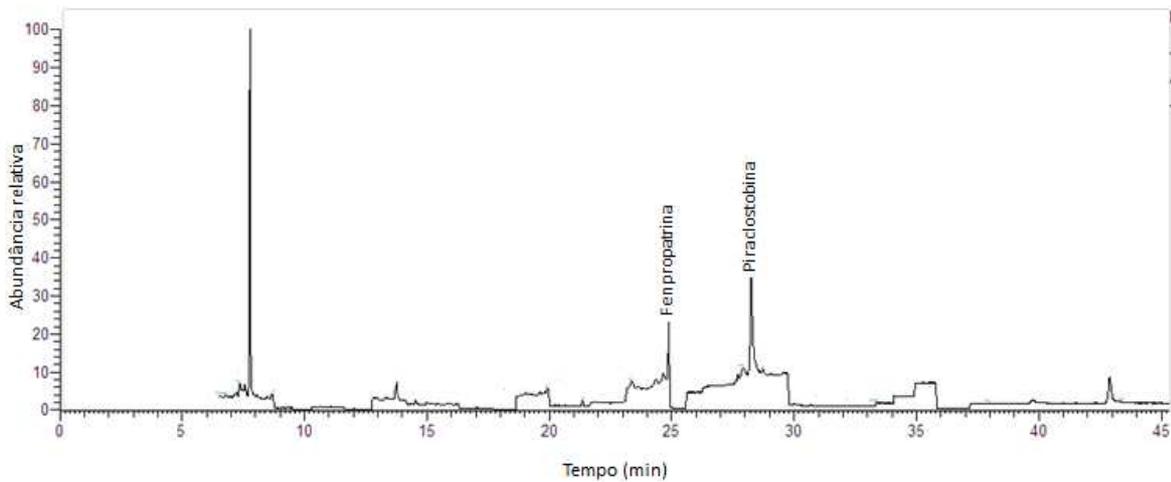
Tabela 12 – Resultados das análises das amostras de abacaxi obtidas no mercado de Fortaleza. (Conclusão)

Agrotóxico	LMR (mg/kg)	LQ (mg/kg)	Amostra SG (mg/kg)	Amostra SJT (mg/kg)	Amostra MC (mg/kg)	Amostra TAB (mg/kg)
Carbosulfano	NA	0,03	< LD	< LQ	< LD	< LQ
Ciproconazol	NA	0,15	< LD	< LD	< LD	< LD
Dicloreto de paraquate	0,05	0,015	< LD	< LD	< LD	< LD
Deltametrina	0,01	0,09	< LD	< LD	< LD	< LD
Etridiazol	NA	0,03	< LD	< LD	< LD	< LD
Esfenvalerato	NA	0,06	< LD	< LD	< LD	< LD
Fenitrotona	NA	0,015	< LD	< LD	< LQ	< LD
Fentiona	NA	0,015	< LD	< LD	< LQ	< LD
Fenpropratrina	NA	0,015	< LD	< LD	0,04 ± 0,014	0,05 ± 0,004
Fenarimol	NA	0,015	< LD	< LD	< LD	< LD
Hexaclorobenzeno	NA	0,015	< LD	< LD	< LD	< LD
Malationa	NA	0,015	< LD	< LD	< LD	< LD
Molinato	NA	0,015	< LD	< LD	< LD	< LD
Parationa metílica	NA	0,015	< LD	< LD	< LQ	< LQ
Propaclor	NA	0,015	< LD	< LD	< LD	< LD
Propanil	NA	0,015	< LD	< LD	< LD	< LD
Propiconazol	NA	0,015	< LD	< LD	< LD	< LD
cis-Permetrina	NA	0,015	< LD	< LD	< LQ	< LD
trans-Permetrina	NA	0,015	< LD	< LD	< LD	< LD
Piraclostrobina	NA	0,03	< LD	< LQ	0,37 ± 0,200	0,25 ± 0,03
Piriproxifem	NA	0,03	< LD	< LD	< LD	< LD
Simazina	0,02	0,015	< LD	< LD	< LD	< LD
Trifluralina	NA	0,015	< LD	< LD	< LD	< LD
Triflumizol	NA	0,015	< LD	< LQ	< LQ	0,04 ± 0,01
Triazofós	NA	0,015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Trifloxistrobina	NA	0,015	< LD	< LD	< LD	< LD

SG = São Gerardo; SJT = São João do Tauape; MC = Monte Castelo; TAB = Tabapuá

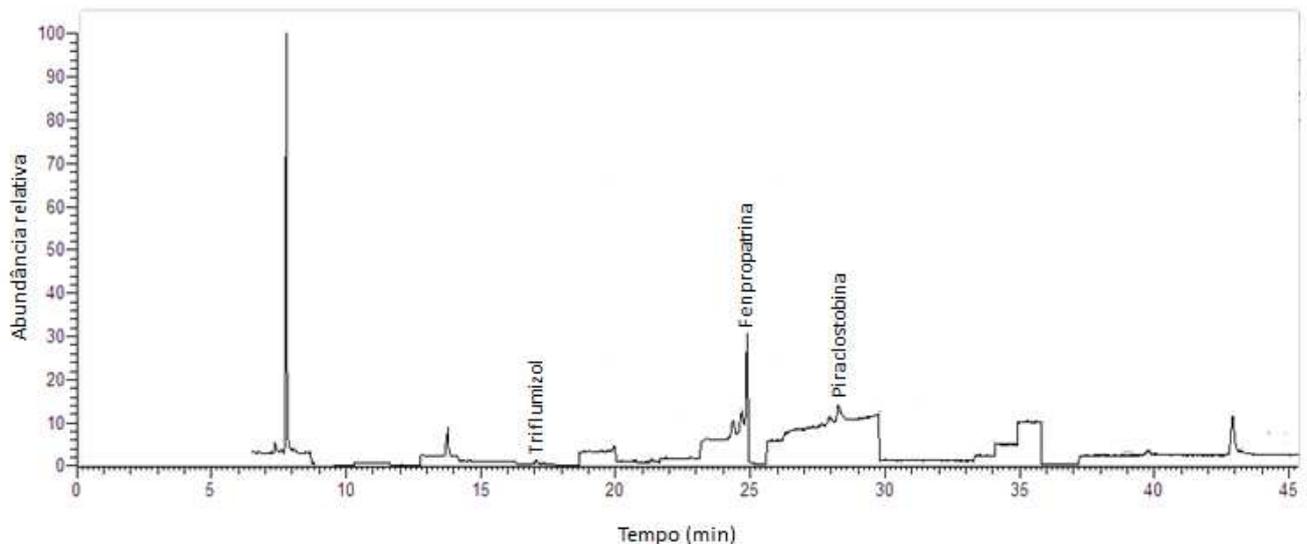
Do cromatograma obtido da análise da amostra adquirida na região do bairro Monte Castelo (figura 23), pode-se observar os picos da fenpropratrina ($t_R = 24,76$ min) e piraclostrobina ($t_R = 28,14$ min). A confirmação da detecção dos agrotóxicos citados nesta amostra foi executada pela avaliação do perfil do espectro de massas gerado pelo detector para cada pico cromatográfico, que denotam a presença de fragmentos de quantificação e confirmação para os compostos. Também pode ser observado o pico relativo à ametrina ($t_R = 13,70$ min), porém apresentando-se em níveis abaixo do limite de quantificação (LQ) e LMR estabelecido

Figura 23- Cromatograma da análise por CG/EM da amostra adquirida na região de Monte Castelo.



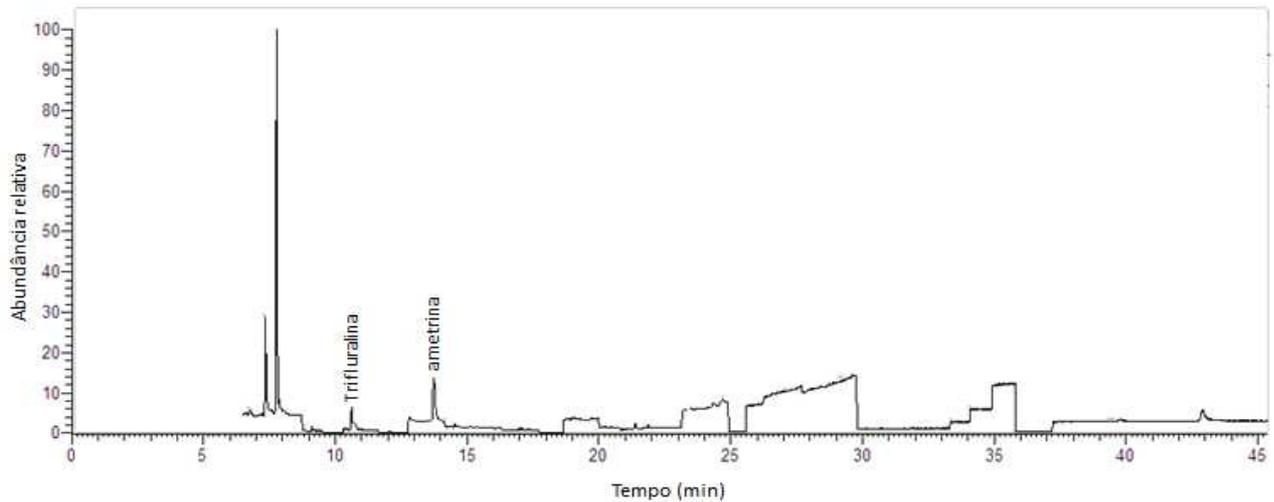
No cromatograma obtido da análise da amostra adquirida na região de Tabapuá (figura 24) pode-se observar também os picos relativos à fenpropatrina e a piraclostobina, como também do triflumizol. A ametrina também foi detectada em níveis abaixo do seu LQ e LMR.

Figura 24 – Cromatograma da análise por CG-EM da amostra adquirida na região de Tabapuá.



No cromatograma da amostra adquirida na região de São Gerado é clara a presença dos picos relativos à ametrina como também à trifluralina, salientando-se que esta última apresenta-se em níveis abaixo do LD e conseqüentemente do LMR estabelecido para este composto. Como observado da tabela 9, a ametrina foi quantificada nesta amostra em um nível de concentração equivalente ao LMR de 0,02 mg/kg.

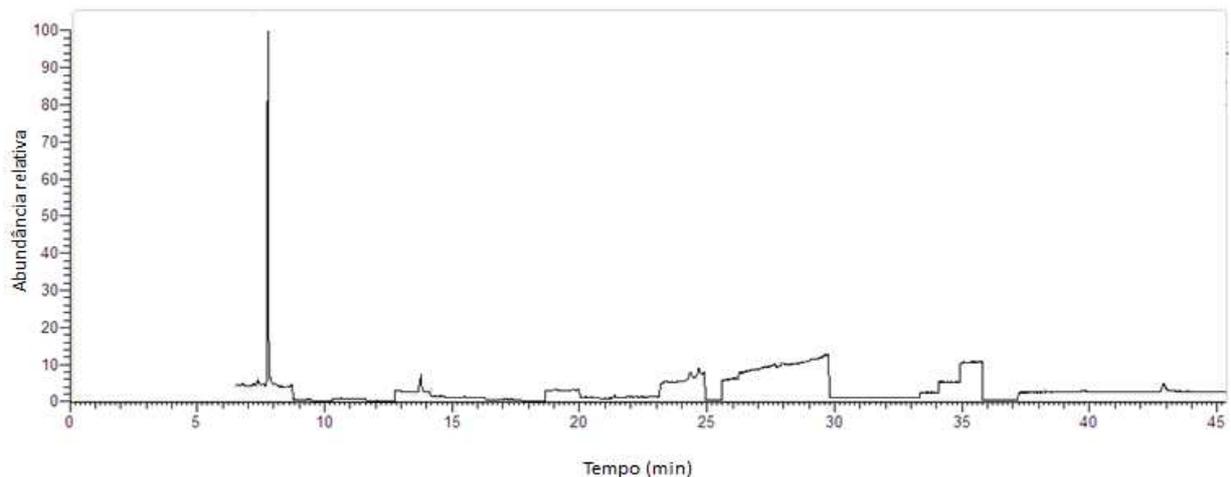
Figura 25 – Cromatograma da análise por CG-EM para a amostra coletada na Região de São Gerardo.



Pode-se observar no cromatograma da figura 26, apenas a presença do pico relativo à ametrina, também em um nível de concentração abaixo do limite de quantificação. A presença de resíduos de ametrina em todas as amostras pode ser explicada pelo fato de este princípio ativo ser tradicionalmente empregado como herbicida nas culturas de abacaxi em virtude de sua ampla ação contra diferentes espécies de ervas daninhas (DE ANDRADE, 2008). Deve-se salientar a possibilidade de o pico cromatográfico ser oriundo da presença de resíduos de metabólito do agrotóxico em questão.

A detecção de resíduos de fenpropatria, piraclostrobina, triflumizol e trifluralina nas amostras analisadas, revela a aplicação, por parte dos produtores de abacaxi que fornecem este produto para o mercado local, de princípios ativos não recomendados pelos órgãos de fiscalização para este tipo de cultura.

Figura 26 – Cromatograma da análise por CG-EM de amostra coletada na região de S.J. do Tauapé.



6. CONCLUSÕES

O método analítico multirresíduo desenvolvido, baseado nas técnicas QuEChERS-citrato modificado e CG-EM, apresentou desempenho analítico razoável para 40 dos 45 agrotóxicos alvo avaliados, não sendo incluídos em seu escopo de aplicação de maneira satisfatória os compostos: cloroneb, λ – cialotrina, metalaxyl-M, imibenconazol e difenconazol.

A substituição do solvente acetonitrila, após etapa de limpeza (*clean up*), pelo solvente misto ciclohexano/acetato de etila 1:1, apesar de agregar uma etapa adicional ao método QuEChERS-citrato tradicional, possibilita uma análise mais segura através de cromatografia gasosa, tendo em vista o problema da elevada expansão da acetonitrila durante a vaporização no sistema injetor.

Com relação as amostras de abacaxi analisadas, observa-se que houve a presença de resíduos de ingredientes ativos não recomendados, como fenpropatria, piraclostrobina, triflumizol e trifluralina, em níveis significativos, o que sugere não adequabilidade toxicológica desses frutos no que tange a segurança alimentar da população. A presença de resíduos de ametrina em níveis próximos ao seu LMR, apesar de ser um ingrediente ativo recomendado, sugere também certo risco, tendo em vista que idealmente os resíduos devem estar bem abaixo dos limites máximos estabelecidos.

REFERÊNCIAS

ABAD, F. C. **Determinação multirresíduo de pesticidas em cenouras utilizando extração com líquido pressurizado e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

ABANORTE. **O abacaxi no mundo, no Brasil e no ETSP da CEAGESP**. Disponível em: < <http://www.abanorte.com.br/noticias/o-abacaxi-no-mundo-no-brasil-e-no-etsp-da-ceagesp>>. Acesso em: 12 set. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA: **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.

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

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Monografias de agrotóxicos**. Disponível<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>>. Acesso em: 10 set. de 2012 a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Legislação agrotóxicos componentes e afins**. Disponível em: 21.< <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Legislacao/Legislacao+de+Agrotoxicos+Componentes+e+Afins/Decretos>> Acesso em: 17 set. 2012 b.

ALVES, F. A. O. V. **Pesquisa de pesticidas e organoclorados em sedimentos e rizo-sedimentos do estuário do rio Douro**. 2005. Dissertação (Mestre em Química) – Faculdade de Ciências do Porto, Porto, 2005.

AMARAL, E. H. **Resíduos de agrotóxicos organofosforados: validação de método de cromatografia a gás e quantificação em produtos agrícolas**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

ANASTASSIADES, M; LEHOTAY, S. J.; ŠTAJNBAHER, D.; SHENCK, F. J. **Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticides residues in produce**. *J. AOAC Int.* [S. l.], v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

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

BAIRD, Collin. **Química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.621 p.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. **Recomendações para calibração em química analítica – parte I. Fundamentos e calibração com um componente.** Quím. Nova. São Paulo, v. 25, n. 5 p. 856 – 865, 2002.

BASTOS, L. H. P.; GOUVÊA, A. V.; MÁLAGA, F.; CARDOSO, M. H. W. M.; JACOB, S. C.; DA NÓBREGA, A. W. **Implementação de método analítico para a determinação de resíduos de organofosforados em leite por cromatografia a gás com detector fotométrico de chama.** Quím. Nova, São Paulo, v.35, n. 8, p.1657-1663, 2012.

BRASIL. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Regulamentada no âmbito federal, que dispõe sobre a pesquisa, experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.** Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm >. Acesso em: 17 set. 2012.

BOGIALLI, S.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; LAGANÀ, A.; NAZZARI, M.; TONCI, M. **Simple and rapid assay for analyzing residues of carbamate insecticides in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry.** J. Chromatogr. A., [Amsterdã], n.1054, p-351-357, 2004.

CARVALHO, N. L.; PIVOTO, T. S. **Ecotoxicologia: conceitos, abrangência e importância agrônômica.** Revista Eletrônica do Programa de Pós-graduação em Educação Ambiental da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, v. 2, n.2, p 176-192, 2011. Disponível em: < <http://www.cascavel.ufms.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/remoa/article/view/2315/1598> >. Acesso em: 20 set. 2012.

CHEN, Z. M.; WANG, Y. H. **Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticides residues in crops, foods and environmental samples.** J. Chromatogr. A,[Amsterdã], n.754, p 367-395, 1996.

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

COOPERCITRUS REVISTA AGROPECUÁRIA. **Agrotóxicos: implicações legais.**, 15 de setembro de 2012. Disponível em: < <http://www.revistacoopercitrus.com.br/?pag=materia&codigo=6204> > Acesso em: 15 set. 2012.

DA COSTA, E. H. **Análise multirresíduo de agrotóxicos em abacaxi por CG/DCE.** 2010. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

DE ANDRADE, D. C. **Processo de oxidação avançada por radiação ionizante na degradação do herbicida ametrina em embalagens de pead descartadas.** 2011. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2011.

DEAN, J. R. **Extraction techniques in analytical sciences**. Chichester: John Wiley & Sons, 2009. 279 p.

DE CARVALHO, P. H. V. **Desenvolvimento de método para determinação de resíduos de pesticidas em planta medicinal *cordia salicifolia* utilizando as técnicas de MSPD, GC/MS e HPLC-UV**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão/SE, 2009.

DEL GRANDE, M.; REZENDE, M. O. O. **Distribuição de compostos organoclorados nas águas e sedimentos na bacia do rio Piracicaba/SP-Brasil**. *Quím. Nova*, São Paulo, v.26, n. 5, p 678-686, 2003.

DÖMÖTÖROVÁ, M.; KICHNER, M.; MATISOVÁ, E.; ZEEUW, J. **Possibilities and limitations of fast GC with narrow-bore columns**. *J. Sep. Sci.* v.29, p. 1051-1063.2006.

DOPICO, M. S.; GONZÁLEZ, M. V.; CASTRO, J. M.; PÉREZ, J.; RODRÍGUEZ, M.; CALLEJA, A. **Determination of triazines in water samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection**. *J. Chromatogr. Sci.*, [S.l.] , v. 40, p. 523-528, 2002.

DOS SANTOS, I. P. **Parâmetros de qualidade na produção de abacaxi desidratado**. 2011. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Abacaxi produção - aspectos técnicos**. Brasília, 2010.

ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY. **Regulating pesticides, pyrethroids and pyrethrins**. Disponível em: < <https://www.epa.gov/oppsrrd1/reeevaluation/pyrethroids-pyrethrins.html>>. Acesso em: 17 set. 2012.

EURACHEM/CITAC. **Guia determinando a incerteza na medição analítica**. 2 ed. 2002.

FERMAM, R. K. S.; ANTUNES, A. M. S. **Uso de defensivos agrícolas, limites máximos de resíduos e impactos no comércio internacional: estudo de caso**. *Economia e Agronegócio*, [Rio de Janeiro], v.7, n.2, p. 197-214, 2009.

FLORES, A. V.; RIBEIRO, J. N.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, E. L. R. **Organoclorados: um problema de saúde pública**. *Ambiente & Sociedade*, [S. l.], v. 2, n. 2, p.111-124, 2004.

FUNDAÇÃO JORGE DUPRAT FIGUEIREDO DE SEGURANÇA E MEDICINA DO TRABALHO. **Manual para interpretação de informações sobre substâncias químicas**. São Paulo, 2011.

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L.H.; AVACA, L. A.; MACHADO, L. A. S. **Utilização de técnicas eletroanalíticas na**

determinação de pesticidas em alimentos. Quím. Nova, São Paulo, v.29, n.1, p. 105-112, 2006.

GARBELLINI, G. S.; PEDROSA, V. A.; SALAZAR-BANDA, G. R.; AVACA, L. A. **Metodologias eletroanalíticas para a determinação de herbicidas triazínicos por voltametria de onda quadrada e técnicas de deconvolução. Quím. Nova, São Paulo, v.30, n.8, p. 2025-2034, 2007.**

GONÇALVES, A. A.; BLUME, A. R. **Efeito da desidratação osmótica como tratamento preliminar na secagem de abacaxi. Estudos Tecn., [S.l.] v. 4, n. 2, p 124-134, 2008.**

GOULART, S. M. **Avaliação da técnica de extração com partição em baixa temperatura na análise de carbamatos em bebidas e alimentos. 2010. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.**

HAJŠLOVÁ, J.; HOLADOVÁ, K.; KOCOUREK, V.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; CUHRA, P.; KEMPNÝ, M. **Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatography analysis of pesticides residues. J. Chromatogr. A, [Amsterdã], v. 800, p. 283-295, 1998.**

HAJŠLOVÁ, J.; ZROSTLÍKOVÁ, J. **Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticides residues in food and biotic matrices. J. Chromatogr. A, [Amsterdã], v.1000, p. 181-197, 2000.**

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. **BOLETIM CIENTÍFICO 16 - Efeito de sulfoniluréias no desenvolvimento da parte aérea e na tuberação da batata, 2011.**

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola fevereiro de 2011. Rio de Janeiro, 2011.**

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão 01, 2003.**

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Vocabulário internacional de metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012). Duque de Caxias, RJ: INMETRO, 2012.**

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. DE A. **Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global- um enfoque às maçãs. Quím. Nova, São Paulo, v.32, p.996-1012, n.4, 2009.**

KOLBERG, D.I.S. **Desenvolvimento e validação de método multirresíduo empregando GC-MS (NCI-MS) para determinação de pesticidas em grãos de trigo e seus produtos processados.2008. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.**

LIGIERO, C. B. P.; REIS, L. A.; PARRILHA, G. L. FILHO, M. B.; CANELA, M. C. **Comparação entre métodos de quantificação em cromatografia gasosa: Um**

experimento para cursos de química. *Quím. Nova*, São Paulo, v.32, n. 5, p. 1338 – 1341, 2009.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: AS-PTA Assessoria de Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011. 190 p.

MACIEL, E. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica de multiresíduos para a quantificação de resíduos de pesticidas em manga (*mangifera indica*)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MCNAIR, H.; MILLER, J. M. **Basic gas chromatography**. New York: Wiley-VHC, 1997. 200 p.

MORAIS, C. M. Q. de J. **Avaliação de método enzimático para monitorar a presença de agrotóxicos organofosforados em leite bovino**. 2009. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

PEREIRA, A. B.; PUTZKE, J. **Dicionário brasileiro de botânica**. Curitiba: CRV, 2010. 437 p.

PERES, T. B. **Efeito da aplicação de pesticidas na atividade microbiológica do solo e na dissipação do ¹⁴C-paration metílico**. 2000. Dissertação (Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear- Aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Autarquia Associada a Universidade de São Paulo), São Paulo, 2000.

PICÓ, Y.; BLASCO, C.; FONT, G. **Environmental and food applications of LC-espectrometria de massas tandem em análise de resíduos de pesticidas: uma visão geral**. *Mass Spectrom Rev*, v.23, p. 45-85, 2003.

PIMENTEL, R. V. **Desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de pesticidas em medicamentos à base de plantas**. 2007. Dissertação (Mestrado em Controle da Qualidade em Tecnologia dos Alimentos) – Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Lisboa, 2007.

PINHEIRO, D. M.; PORTO K. R. A.; MENEZES, M. E. S. **Química dos alimentos: carboidratos, lipídeos, proteínas e minerais**. Maceió: EDUFAL, 2005. 52 p.

PINHO, G. P. **Extração de pesticidas em amostras de tomate pelas técnicas: extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) e dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) para análise por cromatografia gasosa**. 2007. Dissertação (Mestre em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. **Análise de resíduos de agrotóxicos em tomates empregando dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa**. *Quim Nova*, São Paulo v. 32, n. 1, p.92-98, 2009.

PRESTE, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. **QuEChERS- Um método de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticida em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas.** *Quím. Nova*, São Paulo, v. 32, p. 1620-1634, n. 6, 2009.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. **Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados e fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica.** *Quim Nova*, São Paulo, v. 24, n.1, p. 68-76, 2001.

REIGART, J. R.; ROBERTS, J. R. **Recognition and management of pesticides poisonings.** 5 ed. Washington DC: Environmental Protection Agency, 1999. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/safety/healthcare>>. Acesso em: 16 set. 2012.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** *Quim. Nova*, São Paulo, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

RISSATO, S. R.; LIBÂNIO, M.; GIAFFERIS, G. P.; GERENUTTI, M. **Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP).** *Quím. Nova*, São Paulo, v.27, n.5, p. 739-743, 2004.

RODRIGUES, N. R. **Agrotóxicos: análise de resíduos e monitoramento.** *Multiciência*, Campinas, n. 7, out. 2006.

ROHR, P. **Influência de polimorfismo em genes de reparo no risco ocupacional de viticultores do Rio Grande do Sul.** 2008. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SALMAZO, P. B. **Efeito de subdoses de sulfonilurêias e qualidade de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L.).** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

SCHENCK, F. J.; CALLERY, P.; GANNETT, P. M.; DAFT, J. R.; LEHOTAY, S. J. **Comparison of magnesium sulfate and sodium sulfate for removal of water from pesticides extracts of foods.** *J. AOAC Int.*[S. l.], v.85, n. 5, 2002.

SCHENCK, F. J.; HOBBS, J. E. **Evaluation of quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) approach to pesticide residue analysis.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, New York, v. 73, p. 24-30, 2004.

SCHENCK, F. J.; LEHOTAY, S. J. **Does further clean-up reduce matrix enhancement effect in gas chromatography analysis of pesticide residue in food?** *J. Chromatogr. A*, [Amsterdã], v. 868, p. 51-61, 2000.

SKOOG, D. A. *et. al.* **Fundamentos de química analítica.** São Paulo: Cengage Learning, 2005. 1124 p.

SILVA, V. M. **Development of a green microwave assisted extraction method for triazines herbicides determination in soils samples.** *J. Braz. Chem. Soc.*, [São Paulo], v. 21, n.6, p 1045-1051, 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 490 p.

SOARES, C. E. dos S. **Extração sólido líquido com partição a baixa temperatura e seu emprego na análise multirresíduo em agrotóxicos em uva e derivados**. 2011. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

SODERLUND, D. M.; CLARK, J. M.; SHEETS, L. P.; MULLIN, L. S.; PICCIRILLO, V. J.; SARGENT, D.; STEVENS, J. T.; WEINER, M. L. **Mechanism of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative assessment**. *Toxicol.* [Amsterdã], n. 171, p 3-59, 2002.

SORENSEN, S.R.; BENDING, G. D.; JACOBSEN, C. S.; WALKER, A.; AAMAND, J. **Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields**. *Microbio. Ecol.*, [Amsterdã], n. 45, p 1-11, 2003.

SPADOTTO, C. A. **Abordagem interdisciplinar na avaliação de agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.fmr.edu.br/npi/003.pdf>>. Acesso em 15 set. de 2012.

THÉ, P. M. P. et al. **Características físicas, físico-químicas, químicas e atividade enzimática de abacaxi cv. smooth cayenne recém colhido**. *Alim. Nutri.* , Araraquara, v.21, p. 273-271, n. 2, 2010.

TADEO, J. L.; SANCHÉZ-BRUNETE, C.; PÉREZ, R. A.; FÉRNANDEZ, M. D. **Analisis of herbicides residues in cereals, fruits and vegetables**. *J. Chromatogr. A*, [Amsterdã], v. 882, p.175-191, 2000.

U.S. CONGRESS OFFICE OF TECHNOLOGY ASSESMENT. **Pesticides residues in food: technologies for detection**. Washington DC: U.S. Government Printing Office, 1988. 230 p.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. **Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG**. *Quim. Nova*, v.30, n. 3, p 535-540, 2007.

VARGAS, L. **Circular técnica: sintomas de diagnose de toxicidade e herbicida e cultura da maçã**. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, 2003.