



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DANIEL BARBOSA ALCÂNTARA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE  
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS EM SAPOTI (*Manilkara  
zapota*) POR CG-EM EMPREGANDO QuEChERS**

**FORTALEZA**

**2016**

DANIEL BARBOSA ALCÂNTARA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE  
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS EM SAPOTI (*MANILKARA  
ZAPOTA*) POR CG-EM EMPREGANDO QuEChERS

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.

Coorientador: Pesq. Dr. Guilherme Julião  
Zocolo.

FORTALEZA

2016

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

---

A318d Alcântara, Daniel Barbosa.

Desenvolvimento e validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos organofosforados em sapoti (*Manilkara zapota*) por CG-EM empregando QuEChERS / Daniel Barbosa Alcântara. – 2018.  
87 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.

Coorientação: Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo.

1. Sapoti. 2. QuEChERS. 3. CG-EM. 4. Organofosforados. I. Título.

CDD 540

---

DANIEL BARBOSA ALCÂNTARA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE  
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS EM SAPOTI (*MANILKARA  
ZAPOTA*) POR CG-EM EMPREGANDO QuEChERS

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.

Coorientador: Pesq. Dr. Guilherme Julião  
Zocolo.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

BANCA EXAMINDORA

---

Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Pesq. Dr. Guilherme Julião Zocolo (Coorientador)  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Wladiana Oliveira Matos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Pesq. Dr. Edy Sousa de Brito  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

A todas as pessoas que acompanharam e que torceram pela realização do mesmo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado paciência, serenidade, conhecimento e saúde para a realização de mais uma etapa da vida.

Aos meus pais, Ana Cristina e Roberto, pelo amor, carinho e dedicação nos ensinamentos da vida; por terem me dado a oportunidade de estudar e me fazer acreditar que sou capaz. Ao meu irmão, Davi, pela intercessão junto a Deus e nossa senhora, que sempre estarão junto a mim nos momentos mais difíceis.

A minha namorada Janylle, pelo amor, carinho e compreensão de minha ausência em dias de estudo. Agradeço pela força e incentivo ao longo do curso, sem ela tudo poderia ser mais difícil.

A toda minha família que sempre foi meu alicerce, em especial minhas avós Valquiria e Olga pelo amor e zelo dispensados a mim como um filho e minhas tias (Sônia, Cirliane, Mary, Silvia e Elis) pela força que sempre me deram.

Aos meus amigos Carlos, Hélio, Wander, Carol e Luanne que sempre têm me proporcionado momentos de descontração e com os quais vivi momentos de extrema felicidade.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento pela orientação e ensinamentos fundamentais para minha formação profissional e científica, e pela oportunidade concedida para realização deste trabalho.

Ao Pesq. Dr. Guilherme Julião Zocolo, pela coorientação, ensinamentos e por sempre estar disponível para ajudar valiosamente com seus conhecimentos durante o tempo de trabalho realizado.

Ao Mário Paz por ter feito grandes contribuições e por ter cedido o projeto de pesquisa.

Aos colegas do grupo de pesquisa, Vitor, Pablo, Fátima, Edmilson, Rouse, Jhonyson, Tamires, Diego, Juliene, Maysa, Raquel, Jefferson, André Gadelha, Carla, Mario, entre

outros, pelos agradáveis momentos de descontração no LAT e pelos conhecimentos compartilhados.

A Profa. Dra. Wladiana Oliveira Matos e ao Pesq. Dr. Edy Sousa de Brito, pela disponibilidade e por terem aceitado participar da banca examinadora deste trabalho, contribuindo para melhoria do mesmo.

Aos membros da banca do Exame geral de conhecimento, Profa. Dra. Helena Becker e Profa. Dra. Gisele Simone, pelas contribuições e disponibilidade de participação.

Aos coordenadores do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (LMQPN/Embrapa) por disponibilizar o espaço físico e toda infraestrutura para realização deste trabalho.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que colaboraram de forma direta ou indiretamente para execução deste trabalho.

“A quem muito foi dado, muito será pedido; a quem muito foi confiado, muito mais será exigido. (Lc 12, 32 – 48 ou 35 – 40)”.



## RESUMO

O desenvolvimento de métodos analíticos visando o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos é fundamental para assegurar que a concentração destes estejam dentro dos limites considerados seguros para a saúde. O presente trabalho descreve uma metodologia analítica baseada no método de preparo de amostra QuEChERS e detecção por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa para análise de oito agrotóxicos organofosforados (diclorvos, dissulfotom, etoprofos, metil paratiom, fenclorfos, clorpirifos, gutiom e protiofos). Por ser uma fruta que tem conquistado a preferência dos consumidores brasileiros, apresentando um mercado consumidor em expansão, a matriz do sapoti foi a utilizada para realizar o estudo. O método foi validado através da avaliação da seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão em termos da porcentagem recuperada. Os testes estatísticos t de student e F foram aplicados para verificar as significâncias dos parâmetros e da regressão das curvas analíticas obtidas na matriz do sapoti. Devido à complexidade da amostra, o estudo do efeito matriz foi realizado, onde sete dos oito compostos avaliados tiveram efeito matriz positivo. Todos os agrotóxicos estudados apresentaram boa linearidade com coeficientes de correlação superior a 0,99. Os LD's e LQ's variaram de 0,01 a 0,07 mg kg<sup>-1</sup> e 0,017 a 0,14 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, na matriz do sapoti. Os estudos de recuperação com a amostra dopada em seis níveis de concentração (0,08; 0,10; 0,14; 0,17; 0,35 e 1,17 mg kg<sup>-1</sup>) apresentaram-se satisfatórios (entre 70 – 120% com CV < 20%) em pelo menos três níveis de fortificação (baixo, médio e alto) para todos os analitos. A análise em amostras comerciais de sapoti, revelaram a presença do ingrediente ativo clorpirifós em 70,0% das amostras de frutas e 33,3% das amostras de polpas, mesmo não sendo permitido para uso em culturas da fruta pela ANVISA.

**Palavras-chave:** Sapoti. QuEChERS. CG-EM. Organofosforados.

## ABSTRACT

The development of analytical methods to monitoring pesticide residues in food is crucial to ensure that the concentration of these are within of the limits considered safe for health. This work describes an analytical methodology based in the QuEChERS sample preparation method and gas chromatography coupled to mass spectrometry for analysis of eight organophosphorus pesticides (dichlorvos, disulfoton, ethoprophos, methyl parathion, fenclorphos, chlorpyrifos, methyl azinphos and prothiofos). As the sapodilla fruit has won the preference of brazilian consumers, presenting an expanding market, this matrix was used to the studs. The methodology was validated by evaluating the selectivity, linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), precision and accuracy in terms of percentage of recovery. Statistical tests (*t-student and F*) were applied to verify the significance of the parameters and the regression of analytical curves in sapodilla matrix. Due to the complexity of the sample, study the effect matrix was performed, where seven of the compounds evaluated had a positive effect matrix. All pesticides studied showed good linearity with correlation coefficient greater than 0.99. LODs and LOQs ranged from 0.01 to 0.07 mg kg<sup>-1</sup> and 0.017 to 0.14 mg kg<sup>-1</sup>, respectively in the sapodilla matrix. Recovery studies with sapodilla samples spiked in six concentration levels (0.08, 0.10, 0.14, 0.17, 0.35 and 1.17 mg kg<sup>-1</sup>) showed satisfactory results (between 70 – 120% with RSD < 20%) in at least three levels of fortification (low, medium and high) for all pesticides. Analysis of commercial sapodilla samples revealed the presence of chlorpyrifos pesticide in 70.0% of the fruit samples and 33.3% of sapodilla pulps samples, even not permitted for use in sapodilla crops by brazilian agences – ANVISA.

**Keywords:** Sapodilla. GC-MS. QuEChERS. Organophosphorus.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Quantidade de publicações envolvendo as principais classes de agrotóxicos em diferentes frutas utilizando métodos cromatográficos durante o período de 2005 a 2015-----	23
Figura 2 – Quantidade de publicações envolvendo os principais métodos de preparo de amostra em diferentes matrizes de frutas durante o período de 2005 a 2015, na determinação de resíduos de agrotóxicos por cromatografia-----	30
Figura 3 – Representação das etapas das principais versões do método QuEChERS: a) original; b) acetato; e c) citrato -----	31
Figura 4 – Estrutura química do sorvente PSA (etilenodiamino-N-propil) -----	33
Figura 5 – Representação esquemática do acoplamento CG-EM-----	38
Figura 6 – CG-EM utilizado no estudo-----	52
Figura 7 – Programação de temperatura utilizado no estudo-----	52
Figura 8 – Pontos de amostragem da fruta do sapoti -----	53
Figura 9 – Ilustração do procedimento de extração da amostra pelo método QuEChERS citrato -----	54
Figura 10 – Ilustração do procedimento de clean up-----	55
Figura 11 – (a) aparelho speedvac utilizado nos experimentos; (b) Interior do equipamento, com os tubos eppendorf posicionados; (c) Resíduo obtido após evaporação ----	55
Figura 12 – Esquema ilustrando a obtenção da concentração do analito no extrato em $\mu\text{g L}^{-1}$ 59	
Figura 13 – Cromatograma obtido através do gradiente de eluição linear de 2 a 98 % durante 20 minutos com 0,1 % (v/v) ác. fórmico em água e 0,1 % (v/v) de ác. fórmico em acetonitrila como fase móvel -----	60
Figura 14 – Cromatograma obtido utilizando 38,5 mg de Ac. de amônio em água e em acetonitrila como fase móvel-----	61
Figura 15 – Cromatograma obtido após injeção do mix de $1 \text{ mg L}^{-1}$ preparado apartir do mix de $100 \text{ mg L}^{-1}$ em clorofórmio:metanol. Fase móvel utilizada 0,1% de Ac. Fórmico em água e em acetonitrila-----	62
Figura 16 – Cromatograma obtido utilizando TI a $240^{\circ}\text{C}$ , após injeção de $5 \mu\text{L}$ do mix de $1 \text{ mg L}^{-1}$ no modo TIC-----	63
Figura 17 – Cromatograma obtido utilizando TI a $170^{\circ}\text{C}$ , após injeção de $1 \mu\text{L}$ do mix de $1 \text{ mg L}^{-1}$ no modo TIC-----	63

Figura 18 – Cromatograma obtido utilizando TI a 240°C, após injeção de 3 µL do mix de 1 mg L <sup>-1</sup> no modo TIC-----	64
Figura 19 – Extratos obtidos pelo método QuEChERS sem a adição de GCB na etapa de clean up (à esquerda) e preparados com a adição de GCB (à direita) -----	65
Figura 20 – (A) Cromatograma no modo TIC dos agrotóxicos na matriz do sapoti em concentração de 1 mg L <sup>-1</sup> , (B) Cromatograma de IE para o etoprofós obtida apartir do modo TIC e (C) Espectro de massa do etoprofós -----	66
Figura 21 – Espectros de massa e cromatogramas de IE de cada agrotóxico. Obs: Os cromatogramas de IE estão indicados por setas ou círculos -----	67
Figura 22 – Curva no solvente e na matriz com seus respectivos valores de R <sup>2</sup> , EM e equação da reta para cada agrotóxico-----	70
Figura 23 – Cromatogramas no modo TIC de algumas amostras. Em destaque é apresentado o cromatograma de íon extraído para o clorpirifós -----	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação toxicológica dos agrotóxicos -----	21
Tabela 2 – Propriedades Físico-Químicas dos agrotóxicos em estudo e culturas autorizadas pela Comissão Européia -----	24
Tabela 3 – Estrutura química, classificação, frutas autorizadas para uso segundo a Anvisa e IDA dos analitos em estudo -----	25
Tabela 4 – Uso do método QuEChERS para análise de diferentes classes de agrotóxicos em diferentes frutas relatados na literatura durante os últimos quatro anos -----	35
Tabela 5 – Uso de CG-EM para análise de diferentes classes de agrotóxicos em diferentes frutas relatados na literatura -----	40
Tabela 6 – Tempo de retenção e fragmentos utilizados para obtenção do IE de cada agrotóxico -----	67
Tabela 7 – Teste de linearidade das curvas analíticas preparadas na matriz, considerando um nível de significância de 95% para o valor de $F_{tab}$ -----	71
Tabela 8 – Resultados do teste estatístico de significância dos parâmetros das curvas de calibração preparadas na matriz, considerando um nível de significância de 95% para o valor de $t_{tab}$ -----	73
Tabela 9 – Limites de detecção e quantificação do método para os agrotóxicos estudados com os respectivos LMR's -----	74
Tabela 10 – Percentuais de recuperação dos agrotóxicos em seis níveis de fortificação com seus respectivos desvios padrão e precisão em termos do CV -----	77
Tabela 11 – Resultados das análises das amostras de frutas e polpas de sapoti -----	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Coeficiente linear
Ache	Acetilcolinesterase
AERU	Unidade de Pesquisa de Agricultura e Meio Ambiente
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
B	Coeficiente angular
CAS	Chemical Abstracts Service
CE	Comissão Européia
Ceagesp	Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo
Ceasa	Centro de Abastecimento e Logística
CFS	Cromatografia de Fluido Supercrítico
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa
CL	Cromatografia Líquida
CV	Coeficiente de Variação
UPLC-QTOF-MS	Cromatografia Líquida de Ultrapformance Acoplada ao Híbrido Espectrômetro de Massa Quadrupolo-Tempo de Vôo
DAD	Detector de arranjo de dinodos
DAPE	Decompõem antes do PE
DCE	Detector de captura de elétrons
DL <sub>50</sub>	Dose Letal para 50 % da população exposta
EFS	Extração em Fase Sólida
EFS-D	Extração em Fase Sólida Dispersiva
ELL	Extração Líquido-Líquido
EM	Efeito Matriz
EM	Espectrometria de Massa
EM/EM	Espectrômetro de massa com triplo quadrupolo
EM/ionTrap	Espectrômetro de massa com ionTrap
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária
EM-TOF	Espectrômetro de massa com tempo de vôo ( <i>time of light</i> )
FAO	Food and Agriculture Organization
g	gramas
GCB	Carbono Grafitizado

IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IE	Íons Extraídos
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade
Kow	Constante de partição octanol-água
LAT	Laboratório de Análises de Traços
LD	Limites de Detecção
LMQPN	Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais
LMR	Limites Máximos de Resíduos
LQ	Limite de Quantificação
<i>m/z</i>	massa/carga
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEFS	Micro Extração em Fase Sólida
MLL	Micro Extração Líquido Líquido
MIP	Manejo Integrado de Pragas
p.c	Peso Corpóreo
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos
PD	Ponto de Decomposição
PE	Ponto de Ebulição
PIB	Produto Interno Bruto
PSA	Amina Primária Secundária
PV	Pressão de Vapor
R	Coefficiente de correlação
SIM	Monitoramento Seletivo de Íons
T	Tonelada
TI	Temperatura do Injetor
TIC	Cromatograma de Íons Totais
T <sub>r</sub>	Tempo de Retenção
UFC	Universidade Federal do Ceará
VI	Volume de Injeção
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LIERATURA</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Agrotóxicos</b>	<b>19</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Classificação dos agrotóxicos</b>	<b>20</b>
<b>2.1.1.1</b>	<i>Classificação toxicologia</i>	<i>20</i>
<b>2.1.1.2</b>	<i>Classificação química e agrotóxicos organofosforados</i>	<i>21</i>
<b>2.2</b>	<b>A cultura do Sapoi (<i>Manilkara zapota</i>)</b>	<b>26</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Pragas e tratos culturais no sapotizeiro</b>	<b>27</b>
<b>2.3</b>	<b>Métodos de preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos</b>	<b>28</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Método QuEChERS</b>	<b>30</b>
<b>2.3.1.1</b>	<i>Extração</i>	<i>31</i>
<b>2.3.1.2</b>	<i>Partição</i>	<i>32</i>
<b>2.3.1.3</b>	<i>Clean up</i>	<i>32</i>
<b>2.3.1.4</b>	<i>Aplicações do método QuEChERS na determinação de agrotóxicos em frutas</i>	<i>34</i>
<b>2.4</b>	<b>Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) e aplicações na determinação de resíduos de agrotóxicos em frutas</b>	<b>38</b>
<b>2.5</b>	<b>Validação de métodos analíticos</b>	<b>42</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Seletividade</b>	<b>43</b>
<b>2.5.1.1</b>	<i>Efeito Matriz</i>	<i>43</i>
<b>2.5.2</b>	<b>Linearidade</b>	<b>43</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>44</b>
<b>2.5.4</b>	<b>Precisão</b>	<b>45</b>
<b>2.5.5</b>	<b>Exatidão</b>	<b>46</b>
<b>2.5.6</b>	<b>Robustez</b>	<b>47</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b>	<b>48</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>48</b>
<b>4</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>Reagentes, solventes e materiais utilizados</b>	<b>49</b>
<b>4.2</b>	<b>Limpeza das vidrarias</b>	<b>49</b>
<b>4.3</b>	<b>Teste utilizando o UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup></b>	<b>50</b>



4.4	Preparo da solução estoque para análise em CG-EM-----	50
4.4.1	<i>Preparo das soluções padrão para obtenção das curvas analíticas no solvente e na matriz-----</i>	<i>50</i>
4.5	Condições cromatográficas-----	51
4.6	Amostragem -----	52
4.7	Preparo de amostra para os estudos de validação-----	53
4.7.1	<i>Procedimento de extração e limpeza pelo método QuEChERS citrato -----</i>	<i>54</i>
4.8	Efeito matriz-----	56
4.9	Parâmetros de validação do método CG-EM -----	56
4.9.1	<i>Seletividade-----</i>	<i>56</i>
4.9.2	<i>Linearidade-----</i>	<i>56</i>
4.9.3	<i>Exatidão e precisão -----</i>	<i>58</i>
4.9.4	<i>Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) -----</i>	<i>58</i>
4.10	Conversão da relação massa/volume ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) para relação massa/massa ( $\text{mg kg}^{-1}$ )-----	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	60
5.1	Análise cromatográfica por UPLC-QTOF-MS <sup>E</sup> -----	60
5.2	Análise cromatográfica por CG-EM-----	62
5.3	Aplicação do método QuEChERS -----	64
5.4	Seletividade -----	65
5.5	Efeito Matriz e Linearidade-----	69
5.5.1	<i>Teste de validação da análise de regressão linear (significância da regressão) 71</i>	
5.5.2	<i>Teste de significância dos parâmetros de calibração -----</i>	<i>72</i>
5.6	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)-----	74
5.7	Exatidão e precisão -----	75
5.8	Análises qualitativas e quantitativas de amostras de sapoti da cidade de Fortaleza-CE -----	78
6	CONCLUSÕES-----	81
	REFERÊNCIAS -----	82

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento do comércio mundial de alimentos tem deixado a agricultura cada vez mais vulnerável à introdução de espécies exóticas de pragas, estima-se perdas mundiais na agricultura de US\$ 1,4 trilhão nas últimas décadas (AGROLINK FITO, 2015). O uso de agrotóxicos é uma prática convencional para manter um elevado rendimento de produção agrícola, cuja perspectiva é triplicar nos próximos 40 anos, devido ao aumento populacional, exigindo demandas cada vez maiores desses insumos (CHRISTIA, 2015).

Apesar dos benefícios, os agrotóxicos são potencialmente tóxicos não só para as pragas, mas também para o homem, os animais e recursos naturais. Os resíduos desses insumos permanecem nos segmentos bióticos e abióticos dos ecossistemas (água, ar, solo, sedimentos, dentre outros), podendo gerar danos ambientais e à saúde de maneira irreversível (AKOTO *et al*, 2015). O uso de boas práticas agrícolas e a técnica do manejo integrado de pragas (MIP) são estratégias que auxiliam na redução do uso de agrotóxicos, tais como, o cultivo consorciado, rotação de cultivos, dentre outros (BRASIL, 2005).

No Brasil o uso de agrotóxicos está associado principalmente às culturas de exportação (algodão, cana-de-açúcar, tabaco e outras culturas), mesmo assim, o uso feito na agricultura familiar não deve ser subestimado, sendo responsável por grande parte das frutas e hortaliças que consumimos (Edição Especial – Agrotóxicos, 2012). Desde 2009, o país tem se tornado o maior consumidor mundial de insumos agrícolas, consumindo mais de 1 milhão de toneladas por ano, representando 20% de todos os venenos utilizados no mundo (Edição Especial – Agrotóxicos, 2012).

Tendo em vista o aumento do uso de agrotóxicos no Brasil, a partir de 1970 criou-se a necessidade de regulamentar o uso dessas substâncias (BRASIL, 2005). Agências governamentais, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelecem limites máximos de resíduos (LMR's) para diversos agrotóxicos nas culturas em que são utilizados, além de denunciarem agrotóxicos com uso proibido nestas culturas (QUEIROZ, FERRACINI e ROSA, 2011).

Nativo do sul do México e da América Central, o sapotizeiro teve adaptação muito boa em praticamente todo o Brasil (BANDEIRA *et al*, 2003). Devido às condições propícias do clima e pela vantagem relativa associada à irrigação, o Nordeste é a região que mais tem se destacado na produção do sapoti (Coleção Plantar – Sapoti, 2005). Por muitos anos, o seu cultivo foi influenciado pela extração do látex do tronco, importante matéria prima para produção de goma de mascar. Contudo, atualmente, o sapotizeiro é cultivado

principalmente para produção de sorvetes, pudins, polpas, doces, além de seu fruto ser bastante consumido em sua forma *in natura*. (JUNIOR *et al*, 2014).

Devido ao sapatizeiro ser cultivado, na maioria dos países, em pequena escala, o número de espécies de pragas que causam prejuízos é relativamente pequeno quando comparado a outras espécies de frutíferas. Contudo já foram relatadas em Pernambuco as pragas brocas-do-caule, broca-dos-ramos e a mosca-das-frutas; na Flórida (Estados Unidos) é relatada a lagarta-minadora; na Costa Rica a larva do bicudo-das-sapotáceas e o gorgulho-das-sementes já foram encontrados; além de outras pragas menos graves que são frequentes em folhas, ramos e frutos do sapatizeiro (JANYANTHI e VERGHESE, 2010).

Diversas técnicas de preparo de amostra têm sido reportadas na literatura com o intuito de extrair agrotóxicos de amostras complexas levando ao aumento de sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão. O método QuEChERS tem sido o mais amplamente utilizado por ser um método rápido, simples, barato e utilizar menores quantidades de solvente orgânico quando comparado com os demais (PRESTES, ADAIME e ZANELLA, 2011). Tal método apresenta altos percentuais de recuperações (>85%) e possibilita a extração em uma mesma amostra compostos de diferentes polaridades (AMÁLIA *et al*, 2010). Após a extração, os agrotóxicos são quantificados por meio de técnicas cromatográficas como a Cromatografia Líquida (CL) e a Cromatografia Gasosa (CG).

A validação de métodos analíticos determina o desempenho característico de um método, partindo-se da avaliação de parâmetros como exatidão, precisão, seletividade, linearidade, limite de detecção e limite quantificação (RIBANI *et al*, 2004). Este trabalho visa desenvolver e validar uma metodologia analítica para determinação multirresíduo de oito agrotóxicos organofosforados em sapatiti utilizando o método QuEChERS empregando Cromatografia a Gás (CG) acoplada a espectrometria de massa (EM).

## 2 REVISÃO DA LIERATURA

### 2.1 Agrotóxicos

A World Health Organization (WHO) conceitua agrotóxicos como qualquer substância utilizada para prevenir, destruir, atacar, repelir ou controlar pragas, incluindo espécies de plantas ou animais que devem estar presentes durante a produção, estocagem, transporte, distribuição ou processamento de alimentos e rações animais para o controle de parasitas (WHO, 2014). Impulsionado pelo anseio do homem em manter um elevado rendimento de produção agrícola, muitos desses compostos foram sintetizados no final do século XIX a fim de controlar os diferentes tipos de pragas (RODRIGUES DA SILVA, 2013). Atualmente, estima-se que as perdas mundiais na agricultura devido aos ataques de pragas cheguem a US\$ 1,4 trilhão, correspondendo a quase 5% do PIB (produto interno bruto) mundial (AGROLINK FITO, 2015).

Os agrotóxicos podem ter origem biológica ou química, suas formulações são constituídas de princípios ativos (ingrediente ativo) que são responsáveis por intervir na atividade biológica normal dos seres vivos alvos de controle (BRAIBANTE e ZAPPE, 2012). Portanto, esses insumos podem ser classificados quanto à natureza de praga combatida em: inseticidas (controle de insetos), fungicidas (controle de fungos), herbicidas (combate às plantas invasoras), fumigantes (combate às bactérias do solo), algicida (combate a algas), avicidas (combate a aves), nematicidas (combate aos nematoides), moluscicidas (combate aos moluscos), acaricidas (combate aos ácaros), entre outros (ANVISA, 2014).

No entanto esses compostos são potencialmente tóxicos não apenas para as pragas que devem controlar, mas também para o homem, os animais e os recursos naturais. O uso demasiado juntamente com a falta de informação dos agricultores sobre a escolha correta do produto, modo de aplicação, transporte, armazenamento e descarte, geram resíduos que permanecem nos segmentos bióticos e abióticos dos ecossistemas (água, ar, solo, sedimentos, dentre outros) (BRASIL, 2005). Estimativas mostram que dos agrotóxicos efetivamente aplicados nas lavouras, apenas 0,1% alcançam as pragas, os outros 99,9% têm potencial para se translocarem para outros compartimentos ambientais (SABIK *et al*, 2000), podendo gerar danos ambientais e à saúde de maneira irreversível.

Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization) o Brasil destaca-se por ser o maior produtor agrícola do mundo, em consequência, desde 2009 tem sido o país que mais consome agrotóxico, estima-se que cerca de 84% do volume de agrotóxicos da América Latina são consumidos no país (Edição Especial – Agrotóxicos, 2012). Por essa razão, a

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

A ANVISA, através do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA), monitora periodicamente diversos alimentos *in natura* a fim de investigar a presença de agrotóxicos como forma de prevenção à saúde da população brasileira. Além disso, este órgão também é responsável por estabelecer Limites de Resíduo Máximo (LMR's) permitido e o Índice de Ingestão Diária Aceitável (IDA) de cada ingrediente ativo de agrotóxico para cada cultura (QUEIROZ, FERRACINI e ROSA, 2011).

### **2.1.1 Classificação dos agrotóxicos**

No Brasil existe uma grande variedade de produtos comerciais utilizados, cerca de 300 princípios ativos em duas mil formulações diferentes (CARDOSO DA SILVA, 2010). Dessa forma, torna-se viável a classificação em função de alguns aspectos que os diferenciam. De maneira geral, os agrotóxicos podem ser classificados quanto ao organismo alvo de controle, ao grau de toxicidade ao homem e ao meio ambiente e ao grupo químico ao qual suas moléculas pertencem.

#### **2.1.1.1 Classificação toxicológica**

A classificação dos agrotóxicos segundo seu grau de toxicidade para o ser humano é fundamental, estes podem ser classificados em quatro classes de acordo com os resultados de estudos feitos em laboratórios que objetivam estabelecer o parâmetro DL<sub>50</sub> (Dose Letal para 50 % da população exposta) (ORSO, 2011). O DL<sub>50</sub>, expresso em miligramas da substância por quilograma da massa corporal do indivíduo, representa a quantidade do ingrediente ativo (administrado por via oral ou injetado) necessária para matar 50 % dos animais testados nas condições experimentais utilizadas.

Além disso, através de estudos físico-químicos e eco toxicológicos, também é possível classificar os agrotóxicos de acordo com sua periculosidade ambiental em classes que variam de I a IV: produtos altamente perigosos ao meio ambiente (classe I); produtos muito perigosos ao meio ambiente (classe II); produtos perigosos ao meio ambiente (classe III); e produtos pouco perigosos ao meio ambiente (classe IV). Segundo Peres e Moreira (2003), os rótulos de todos os produtos comerciais de agrotóxicos devem conter uma faixa

colorida indicativa de sua classificação toxicológica. A classificação toxicológica dos agrotóxicos está resumida na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação toxicológica dos agrotóxicos.

Classe toxicológica	Toxicidade	DL <sub>50</sub> /(mg kg <sup>-1</sup> )	Faixa colorida
I	Extremamente tóxico	≤ 5	Vermelha
II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50	Amarela
III	Mediamente tóxico	Entre 50 e 500	Azul
IV	Pouco tóxico	Entre 500 e 5000	Verde

Fonte: Peres e Moreira (2003), modificado pelo autor.

Os pesticidas das classes III e IV são os menos tóxicos, sendo, portanto de uso mais recomendável. Já as classes I e II representam os de toxicidade mais elevada e só devem ser utilizados em casos onde não houver produtos das classes III e IV para a mesma praga ou doença e que não exista nenhuma outra maneira de combate. É importante ressaltar que dentre as substâncias de classe I encontram-se aquelas comprovadamente carcinogênicas e mutagênicas (MARTINS, 2010).

#### 2.1.1.2 Classificação química e agrotóxicos organofosforados.

Na classificação química, os agrotóxicos se agrupam em classes de substâncias cujo princípio ativo é formado por estruturas moleculares semelhantes. Dentre os grupos de agrotóxicos existentes, os compostos orgânicos constituem a classe mais importante, e são divididos em sintéticos e naturais. Dos compostos orgânicos sintéticos, os principais representantes são, organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (SANCHES *et al*, 2003).

Comumente utilizados como inseticidas, acaricidas, nematicidas e fungicidas, o grupo dos organofosforados merece destaque (SAVOY, 2011). Estes agrotóxicos, derivados do ácido fosfórico, tiosfosfórico ou ditiosfosfórico, são os mais extensivamente utilizados devido ao seu baixo custo, alta eficiência e amplo espectro de utilização (TANG, 2014). Segundo Seebunrueng, Santaladchaiyakit e Srijaranai (2015), o amplo uso dessa classe química também pode estar associado ao fato de serem utilizados em substituição aos

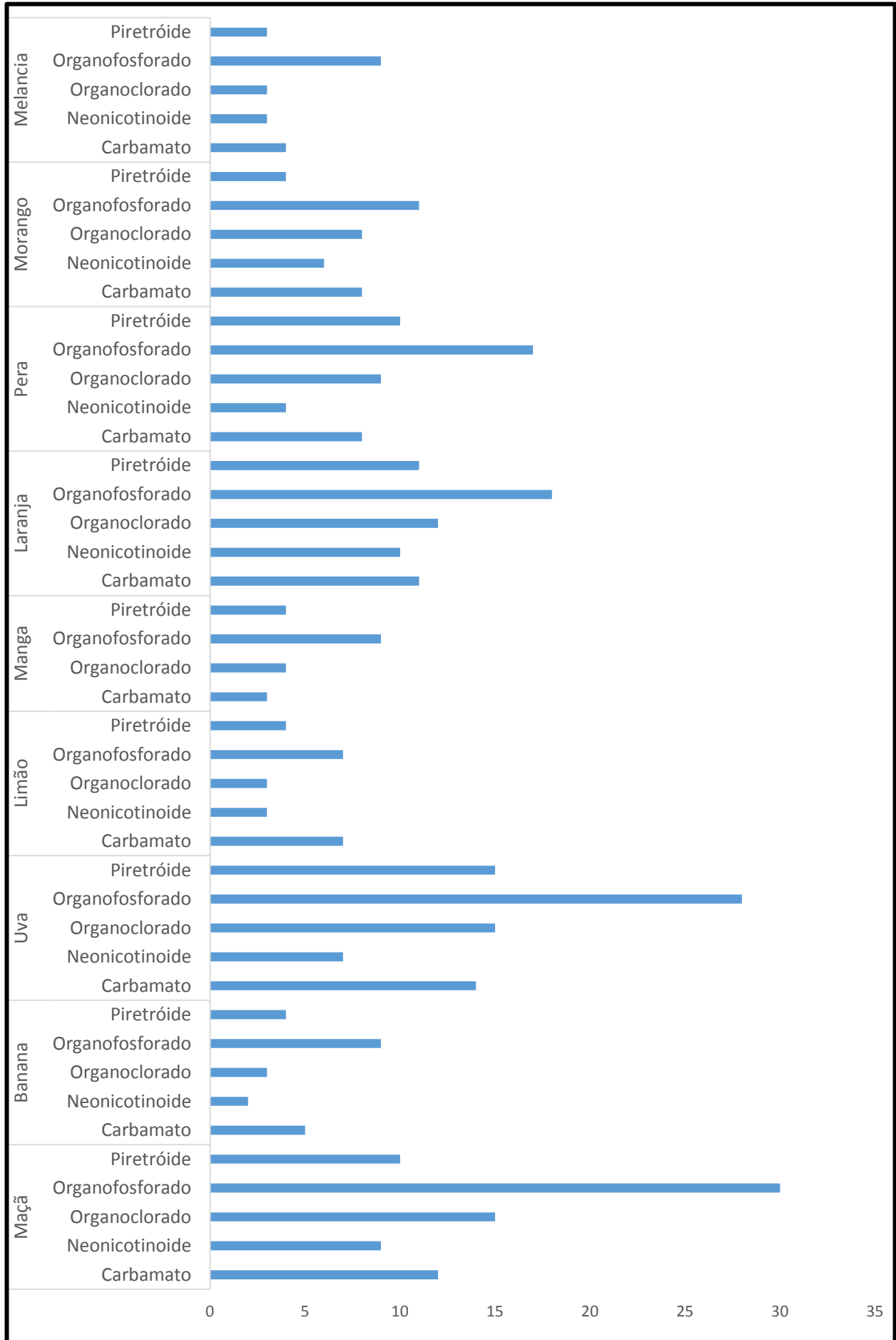
organoclorados, que pelo seu caráter persistente no meio ambiente tem sido banido em diversos países. Em consequência, o grupo dos organofosforados tem sido o mais abordado nos estudos de resíduos de agrotóxicos em frutas por métodos cromatográficos nos últimos anos, como ilustrado na Figura 1.

Para obtenção desses dados utilizou-se a ferramenta SciFinder do *Chemical Abstracts Service* (CAS), onde os termos *pesticides in fruits*, *analysis of pesticides in fruits* e ‘nome da fruta em inglês’ *pesticide analyses* foram utilizados no campo de pesquisa para obtenção das referências, este último foi realizado para cada uma das frutas pesquisadas.

Os organofosforados apresentam elevada toxicidade aguda, em mamíferos atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase (Ache) aumentando o nível do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses, responsável pela transmissão de impulsos nervosos no sistema nervoso central, esse efeito manifesta-se principalmente por lacrimejamento, salivação, sudorese, diarreia, tremores e distúrbios cardiorrespiratórios (CAVALIERE, 1996).

Nesse estudo foram investigados oito agrotóxicos organofosforados, a Tabela 2 fornece suas propriedades físico-químicas e as culturas autorizadas para uso segundo a Comissão Européia (EC). E a Tabela 3 fornece suas respectivas estruturas químicas, classe quanto a natureza da praga combatida, classificação toxicológica, as frutas autorizadas para uso segundo a ANVISA e seu índice de ingestão diária aceitável (IDA).

Figura 1 – Quantidade de publicações envolvendo as principais classes de agrotóxicos em diferentes frutas utilizando métodos cromatográficos durante o período de 2005 a 2015.



Fonte: Autor, 2016.



Tabela 2 – Propriedades Físico-Químicas dos agrotóxicos em estudo e culturas autorizadas pela Comissão Européia.

<b>Agrotóxicos Organofosforados</b>	<b>PE/°C</b>	<b>PD/°C</b>	<b>PV/mPa a 25 °C</b>	<b>Log Kow (pH = 7 a 20°C)</b>	<b>Culturas autorizadas pela EC (LMR/(mg Kg<sup>-1</sup>))</b>
Clorpirifós	DAPE	170	1,43	4,7	Maçã (0,5), Pera (0,5), Uva (0,5), Abacaxi (0,3), Banana (3,0), Morango (0,5) e Manga (0,05)
Diclorvós	DAPE	190	2100	1,9	Citros (0,01), Maçã (0,01), Uva (0,01) e Morango (0,01)
Dissulfotom	-*	-	7,2	3,95	-
Etoprofós	244,3	244,3	78	2,99	Banana (0,03) e Abacaxi (0,03)
Fenclofós	-	-	110	4,88	-
Gutiom	DAPE	200	5 x 10 <sup>-4</sup>	2,96	Cajú (0,5)
Parationa-metílica	-	-	0,2	3	-
Protiofós	-	-	0,3	5,67	-

Fonte: Unidade de Pesquisa de Agricultura e Meio Ambiente (AERU) da Universidade de Hertfordshire, modificado pelo autor (2016). \*(-) Não informado; PE: Ponto de Ebulição; PD: Ponto de Decomposição; PV: Pressão de Vapor; DAPE: Decompõem antes do PE e Kow: Constante de partição octanol-água.

Tabela 3 – Estrutura química, classificação, frutas autorizadas para uso segundo a Anvisa e IDA dos analitos em estudo (*Continua*).

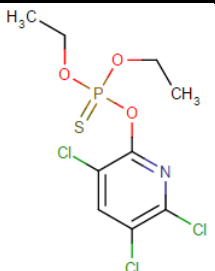
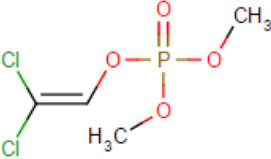
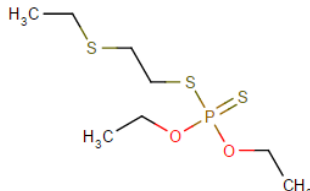
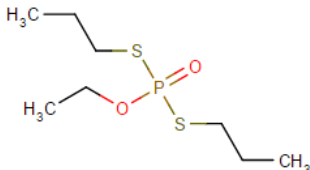
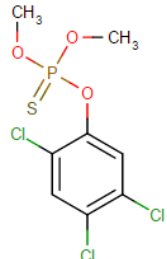
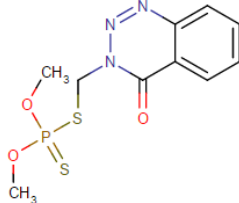
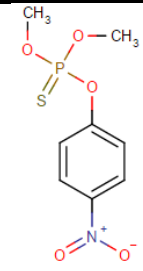
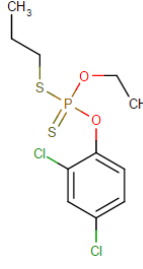
Agrotóxico Organofosforados	Estrutura química	Classe	Classificação toxicológica	Culturas	
				autorizadas pela ANVISA (LMR/(mgkg <sup>-1</sup> ))	IDA/(mg/kg p.c)
Clorpirifós		Inseticida, Formicida e Acaricida	II	Citros (2,00), Maçã (1,00), Tomate (0,5), Feijão (0,1), Café (0,05)	0,01
Diclorvós		Inseticida	II	.*	-
Dissulfotom		Inseticida, Acaricida e Fungicida	I	Algodão (0,2), Café (0,1)	0,0003
Etoprofós		Nematicida e Inseticida	I	Batata (0,05)	0,0004
Fenclorfós		Inseticida	III	-	-
Gutiom		-	-	-	-

Tabela 3 – Estrutura química, classificação, frutas autorizadas para uso segundo a Anvisa e IDA dos analitos em estudo (*Conclusão*).

Agrotóxico	Estrutura química	Classe	Classificação toxicológica	Culturas	
				autorizadas pela ANVISA (LMR/(mgkg <sup>-1</sup> ))	IDA/(mg/kg p.c)
Parationa-metílica		Inseticida e Acaricida	I	Algodão (0,3), Soja (0,1)	0,003
Protiofós		Inseticida e Acaricida	II	Algodão (0,04), Soja (0,03), Tomate (1,0)	-

Fonte: ANVISA, modificado pelo autor (2016).

\*(-): Não informado pela ANVISA; IDA: Ingestão Diária Aceitável; p.c: peso corpóreo.

## 2. 2 A cultura do Sapoti (*Manilkara zapota*)

Nativo do Sul do México e da América Central, o sapotizeiro (*Manilkara zapota*) teve uma adaptação muito boa em praticamente todo o Brasil, sendo cultivado desde o Sul do estado de São Paulo até a Região Amazônica (Coleção Plantar – Sapoti, 2005).

Considerada o ‘mel dos trópicos em forma de fruta’ pelos pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (Embrapa), o sapoti tem conquistado a preferência dos consumidores, sendo sua comercialização impulsionada pela busca por produtos diversificados onde o aroma, sabor e valor nutritivo são valorizados (QUEIROZ *et al*, 2012). Para Júnior *et al* (2014), apesar de exótica, o sapoti tem apresentado um mercado consumidor em expansão, sendo o fruto utilizado como matéria prima para a agroindústria para obtenção de sorvetes, pudins, doces, polpas, além de serem bastantes consumidas em sua forma *in natura*. Ainda para Nascimento *et al* (2008), dentre as frutas exóticas brasileiras, esta é a que apresenta maior potencial para exploração econômica.

Por ser uma fruta tipicamente tropical, tem seu desenvolvimento e produção favorecidos pelo clima da região Nordeste do país, onde ocorre a maior parte da produção

brasileira e onde as pesquisas sobre a fruta têm sido conduzidas com maior frequência (BANDEIRA, 2003). A maior parte de sua produção encontra-se em pequenas propriedades e é principalmente para abastecimento do mercado interno (MIRANDA *et al*, 2008). Contudo, segundo Morais *et al* (2006), tem-se observado uma demanda crescente para outros países, principalmente, na Europa, América do Norte, Oriente Médio e Sudeste Asiático.

Pernambuco é o estado que se sobressai como produtor nacional, a quantidade da fruta ofertada no Centro de Abastecimento e Logística (Ceasa) de Recife, em média, é de 39,8 toneladas (t) por ano (média de 2008-2012); na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (Ceagesp), foram comercializadas em 2012, 34 t de sapoti, provenientes dos estados da Bahia, Sergipe e São Paulo; na Ceasa do Ceará (CE) foram comercializadas também em 2012, 7,5 t de sapoti provenientes de Cascavel, Baixo Jaguaribe e de Fortaleza (JUNIOR *et al*, 2014).

A fruta sapoti apresenta sabor bastante doce e aroma característico, contém vitaminas A, B1, B2, B5 e C, seu valor calórico é de 96 calorias para 100 gramas (g) da fruta, além de apresentar os nutrientes fósforo, cálcio, ferro, potássio, magnésio, entre outros (SANTOS DE OLIVEIRA, AFONSO e CORREIA DA COSTA, 2011).

### **2.2.1 Pragas e tratamentos culturais no sapotizeiro**

Devido ao sapotizeiro ser cultivado em pequena escala e em pomares dispersos, são poucas as pragas observadas no Brasil, assim como os trabalhos técnico-científicos sobre o assunto. As principais pragas já relatadas no nordeste brasileiro são brocas-do-caule, broca-dos-ramos e a mosca-das-frutas. Esta última, por sua grande capacidade reprodutiva e extraordinária habilidade de adaptação, é conhecida como a praga mais devastadora da fruticultura em todo mundo, principalmente as do gênero *Anastrepha*, podendo causar danos em mais de 200 espécies de frutas e hortaliças (Coleção Plantar – Sapoti, 2005).

Uma doença bastante corriqueira que traz sérios efeitos danosos sobre as plantas jovens do sapotizeiro tem como agente causal o fungo *Septoria sapotae* muito comum no nordeste brasileiro (JUNIOR *et al*, 2014). Outras pragas menos importantes como pulgões e diversas espécies de cochonilhas são frequentes em folhas, ramos e frutos do sapotizeiro (BANDEIRA *et al*, 2003).

Para reduzir possíveis perdas causadas pelas pestes são aplicados métodos culturais (como o coroamento) ou químicos (como o uso de agrotóxicos) de controle. O controle químico por meio de iscas tóxicas é o mais recomendado para se evitar moscas das frutas, nesse método se faz uso do agrotóxico organofosforado malatim, sendo aplicado

quando os frutos ainda estiverem verdes (Coleção Plantar – Sapoti, 2005). Entretanto, o uso de agrotóxicos pode causar vários impactos ambientais, afetando os segmentos bióticos e abióticos do ecossistema.

Um método alternativo para o controle de moscas das frutas se faz uso do inseticida ‘Spinoad’, como se trata de um produto biológico a base de microorganismos, pouca preocupação o produtor irá ter com relação a problemas de resíduos em frutos (Coleção Plantar – Sapoti, 2005). De maneira geral, devem ser utilizados agrotóxicos com baixo poder residual e seletivo quanto aos inimigos naturais da cultura (QUEIROZ *et al*, 2012).

### **2. 3 Métodos de preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos**

Na determinação de resíduos de agrotóxicos, os analitos apresentam-se normalmente em baixos níveis de concentração, isso somado à complexidade das matrizes ambientais e à existência de coextrativos que possam interferir na análise instrumental, fazem dos procedimentos de preparo de amostra um requisito essencial para o estabelecimento de um método cromatográfico sensível e seletivo destinado a análise de traços (TUAN *et al*, 2009). O preparo prévio da amostra tem por objetivo isolar e concentrar os analitos de interesse a níveis adequados e remover possíveis interferentes provenientes da matriz da amostra.

Esses métodos devem, idealmente, ser de fácil manipulação, de baixo custo, envolver poucas etapas e promover uma recuperação quantitativa sem perdas de analito (SKOOG *et al*, 2010). Segundo Dionísio *et al* (2010), os métodos de preparo de amostra têm evoluído para atender as demandas analíticas e acompanhar o aumento da eficiência cromatográfica.

Dentre os métodos tradicionais, destaca-se a extração em fase líquida ou extração líquido-líquido (ELL), apesar da simplicidade, este método possui a desvantagem de empregar elevadas quantidades de solventes orgânicos, sendo potencialmente tóxico ao meio ambiente (CHEN *et al*, 2008). Além disso, segundo os mesmos autores, a possibilidade de formação de emulsões pode resultar em várias etapas para separar as fases imiscíveis.

Visando suprir essas desvantagens foi desenvolvida a técnica extração em fase sólida (EFS), devido ao menor consumo de solvente orgânico, não formação de emulsões, facilidade de automação e menor número de etapas envolvidas, esta pode ser utilizada como um método alternativo a ELL (BORGES, FIGUEIREDO e QUEIROZ, 2015). Para Zhang *et al* (2012) a técnica EFS é bastante empregada para extração e/ou pré-concentração dos analitos em matrizes complexas, contudo tem sido um método bastante utilizado em

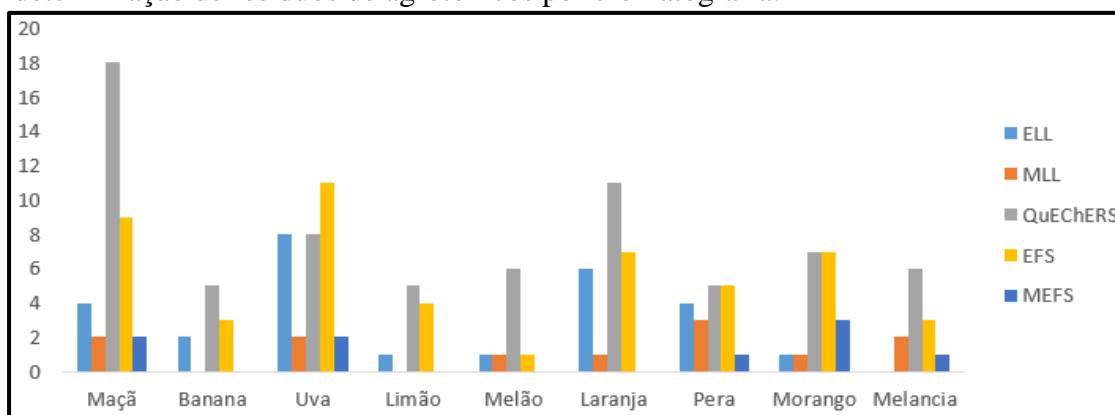
combinação com outros métodos de extração, sendo seu principal uso na etapa de limpeza. Os tempos de análises relativamente elevados, os inúmeros sorventes existentes que dificultam a escolha adequada para a aplicação desejada e o alto custo dos cartuchos são algumas desvantagens inerentes a esta técnica (JARDIM, 2010).

Como uma alternativa à EFS tradicional, sua miniaturização a micro extração em fase sólida (MEFS) tem ganhado o interesse da comunidade científica, pois combina em um único procedimento a amostragem, extração, concentração e injeção da amostra (BLASCO *et al*, 2011). Suas principais vantagens são bom desempenho analítico e simplicidade. No entanto, a MEFS é trabalhosa, pois precisa de condições rigorosas para promover a extração, o equilíbrio entre a solução da amostra e a fibra pode levar um longo período de tempo para ser estabelecido, além disso, as fibras são caras e frágeis (ZHANG *et al*, 2012).

Visando superar as desvantagens dos principais métodos de preparo de amostra já mencionados, em 2003 Anastassiades *et al* introduziram um novo procedimento para extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos denominado QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*). Para Costa *et al* (2014) esse método consiste em uma nova tendência, tornando-se o método mais comum para análise de agrotóxicos em alimentos, especialmente frutas e legumes.

A Figura 2 ilustra a utilização dos principais métodos de preparo de amostra na determinação de resíduos de agrotóxicos em frutas nos últimos anos, utilizando-se o SciFinder como ferramenta de pesquisa e as mesmas palavras-chave mencionadas no subitem 2.1.1.2, o método QuEChERS destaca-se por ser o mais empregado na maioria das matrizes estudadas. Para Zhang *et al* (2012), esse método destaca-se por ser robusto, possuindo excelentes valores de recuperações para um amplo número de agrotóxicos de polaridades variadas; é simples, minimizando a introdução de erros aleatórios comuns em procedimentos de preparo de amostra; além de rápido e barato.

Figura 2 – Quantidade de publicações envolvendo os principais métodos de preparo de amostra em diferentes matrizes de frutas durante o período de 2005 a 2015 na determinação de resíduos de agrotóxicos por cromatografia.



Fonte: Autor, 2016.

Nota: MLL: Micro extração líquido-líquido.

### 2.3.1 Método QuEChERS

O método QuEChERS omite muitas etapas analíticas complicadas que são habitualmente empregadas em métodos de extração multirresíduos tradicionais. Dessa maneira, o método fornece resultados de alta qualidade com um número mínimo de etapas analíticas e com baixo consumo de solventes orgânicos (PRESTES *et al*, 2009). Além disso, segundo Lehotay *et al* (2007), ensaios de proficiência empregando o método QuEChERS evidenciam que o mesmo é altamente robusto, sendo transferidos com sucesso entre os laboratórios participantes.

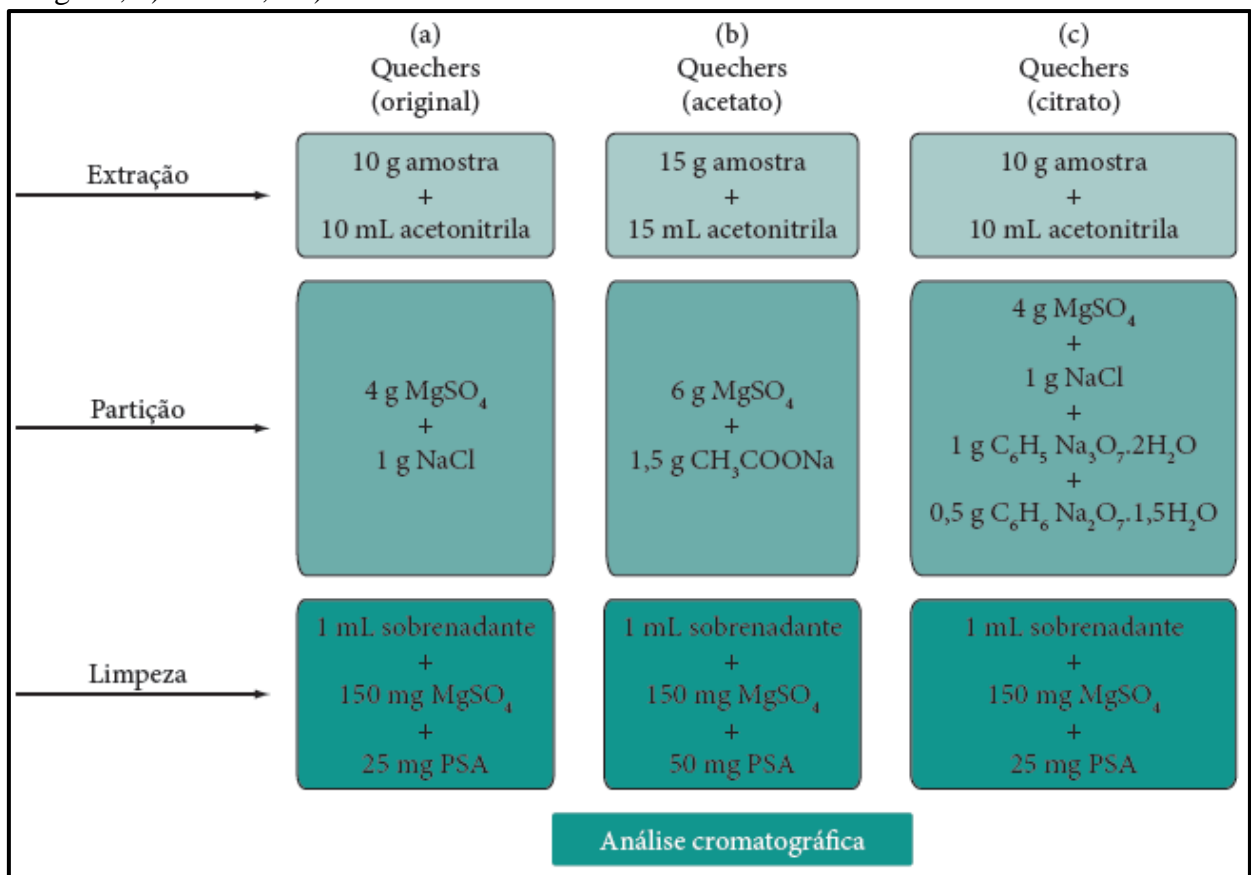
O método original envolve extração com acetonitrila, seguida de partição provocada pela adição da mistura de sais  $MgSO_4$  e  $NaCl$ . Contudo, otimizações da primeira versão do método foram realizadas no sentido de melhorar a extração de compostos que apresentam problemas de estabilidade de acordo com o pH da matriz. Segundo Lehotay *et al* (2014) o QuEChERS acetato (adição de acetato de sódio) e citrato (adição de citrato de sódio dihidratado e hidrogenocitrato sesquihidratado) são empregados em matrizes que apresentam elevada acidez, proporcionando efeito de tamponamento (pH 4,9 no acetato e 5,0-5,5 no citrato), permitindo melhores recuperações de analitos que apresentam instabilidades em função do pH.

Um novo método de clean up denominado extração em fase sólida dispersiva (EFS-D) foi sugerido juntamente com o método QuEChERS, onde é adicionado ao extrato a mistura de amina primária secundária (PSA) e  $MgSO_4$  anidro (PRESTES, ADAIME e

ZANELLA, 2011). A Figura 3, ilustra as etapas de execução das principais versões do método QuEChERS.

Andrascikova e Hrouzkova (2013) analisaram 35 agrotóxicos de diferentes classes em limões utilizando as três metodologias do QuEChERS. Os autores concluíram que a escolha do método QuEChERS é dependente da interação analito/matriz, não havendo um único método adequado para todos os pesticidas no que diz respeito a recuperação e sensibilidade. No entanto, segundo os autores, o método citrato mostrou ser o mais adequado em termos de linearidade.

Figura 3 – Representação das etapas das principais versões do método QuEChERS: a) original; b) acetato; e c) citrato.



Fonte: Prestes, Adaime e Zanella (2011).

### 2.3.1.1 Extração

Um dos pontos fundamentais no desenvolvimento de um método de extração multirresíduo é a escolha adequada do solvente de extração e da menor quantidade de amostra que garanta representatividade estatística ao resultado final. No desenvolvimento do método QuEChERS o tamanho escolhido para a amostra foi de 10 g, sendo considerada ideal quando



comparada a quantidades de 15 a 100 g normalmente utilizadas em outros métodos (LEHOTAY *et al*, 2007). Quanto ao solvente de extração, a acetonitrila foi o solvente escolhido, pois possibilita a extração de uma menor quantidade de coextrativos lipofílicos provenientes da amostra, tais como, ceras, gorduras e pigmentos; proporciona a extração de uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades e pode ser facilmente separado da água presente na amostra por meio de *salting out* e centrifugação (ANASTASSIADES *et al*, 2003).

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

#### 2.3.1.2 Partição

A adição de sais para promover o efeito *salting out* tem sido utilizada em vários métodos multirresíduo com o objetivo de diminuir a solubilidade de compostos polares na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica. Dessa forma, tal procedimento promove a partição dos analitos mais polares que estariam solubilizados na água da amostra para a fase menos polar (acetonitrila) (ANASTASSIADES *et al*, 2003).

No método QuEChERS são utilizados os sais cloreto de sódio (NaCl) e sulfato de magnésio anidro ( $\text{MgSO}_4$ ). O  $\text{MgSO}_4$  oferece papel fundamental, pois apresenta elevada capacidade de remover água quando comparado com outros sais, além de sua hidratação ser um processo exotérmico tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C da amostra durante a etapa de partição, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares (PRESTES, ADAIME e ZANELLA, 2011).

#### 2.3.1.3 Clean up

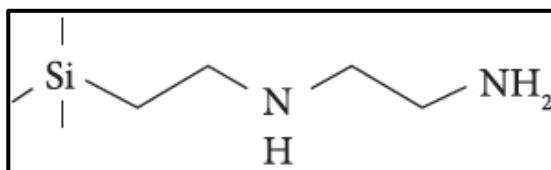
A etapa de clean-up é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico, uma vez que reduz a presença de compostos interferentes da matriz, deixando a amostra mais adequada à análise. Além disso, garante uma maior vida útil ao sistema analítico.

A extração em fase sólida dispersiva (EFS-D) foi desenvolvida juntamente com o método QuEChERS com o objetivo de obter um extrato final com menor quantidade de interferentes (PRESTES, ADAIME e ZANELLA, 2011). O uso de uma menor quantidade de sorvente e solventes, refletindo em menor custo, além de não haver a necessidade de trabalhar no formato de cartucho são algumas das vantagens desse método quando comparado com os métodos tradicionais (PRESTES *et al*, 2009). Além disso, a EFS-D permite que a remoção de água residual seja realizada de forma simultânea com a limpeza do extrato, sendo empregado sais secantes juntamente com o sorvente, no método QuEChERS faz-se uso do sulfato de magnésio anidro ( $MgSO_4$ ) para esta finalidade (CABRERA *et al*, 2012).

O sorvente empregado na EFS-D é o etilenodiamino-N-propil que é uma amina primária secundara (PSA), onde atua como trocador aniônico e pode interagir com os compostos da matriz através de pontes de hidrogênio ou interações dipolo-dipolo. A Figura 4 ilustra a estrutura química do sorvente. Devido sua estrutura bidentada, com a presença de grupos amino primário e secundário, o PSA tem um elevado efeito quelante, que lhe confere o poder de remover com elevada eficiência interferentes da matriz como ácidos gráxos livres, açúcares e outros compostos polares (PRESTES *et al*, 2009; CABRERA *et al*, 2012).

O PSA pode ser usado em associação com carbono ativo ou carbono grafitizado (GCB). Segundo Wilkowska e Biziuk (2011), devido à grande área superficial e a presença de grupos altamente polares na superfície, o GCB é eficiente na remoção de pigmentos. No entanto deve-se ter cuidado com analitos com sistemas cíclicos planares, que podem ser fortemente retidos resultando em baixas recuperações.

Figura 4 – Estrutura química do sorvente PSA (etilenodiamino-N-propil).



Fonte: Cabrera et al, 2012.

#### 2.3.1.4 Aplicações do método QuEChERS na determinação de agrotóxicos em frutas

O método QuEChERS tem sido o método de preparo de amostra mais comumente empregado na determinação de resíduos de agrotóxicos em frutas ao longo dos anos devido à simplicidade nas etapas de execução e a confiabilidade de seus resultados quando utilizada com uma eficiente técnica de detecção. A Tabela 4 fornece as aplicações desse método ao longo dos últimos quatro anos em várias matrizes de frutas, bem como os níveis de diferentes classes de agrotóxicos encontrados e a faixa de recuperação obtida para determinada técnica de detecção. Pode-se destacar o trabalho de Paz *et al* (2015), que otimizou e validou diferentes condições do método QuEChERS para análise de resíduos de agrotóxicos organoclorados em polpas e frutas de tamarindo.

Tabela 4 – Uso do método QuEChERS para análise de diferentes classes de agrotóxicos em diferentes frutas relatados na literatura durante os últimos quatro anos (Continua).

Classes de agrotóxicos estudados	Frutas	Níveis/(mg kg <sup>-1</sup> )	Recuperação/%	Método de extração	País	Referência
Imidazol, Carbamatos, Triazol, Organofosforados, Neonicotinóides, Dinitroanilinas e Outros agrotóxicos não classificados	Maçã, Pera, Uva, Morango e Banana	nd – 0,173	-	CL-EM/EM	Grécia	Christia, (2015)
Organofosforados	Banana e Mamão	-	75,7 – 118,9	CL-EM/EM	Brasil	Lemos et al, (2015)
Organofosforados, Carbamatos, Fenilaminas e Outros agrotóxicos não classificados	Melancia	-	-	CG-EM/EM	Tailândia	Wanwimolruk et al, (2015)
Organofosforados, Carbamatos, Imidazol, Neonicotinóides	Goiaba e Mamão	nd – 3,4	64 – 153	CL-EM/EM	Colômbia	Bottero-Coy et al, (2015)
Organofosforados, Triazol e Carbamatos	Mamão e Abacate	-	50 – 94,6	CFS-DAD	México e Espanha	Pano-Farias, (2015)
Organofosforados, Triazol e Dinitroanilinas	Maçã, Morango	-	70,5 – 114,9	CG-DCE	Brasil	Lorenz et al, (2014)
Neonicotinóides	Maçã, Laranja, Morango, Melancia e Melão	nd – 0,142	-	CL-EM	Estados Unidos e Nova Zelândia	Chen et al, (2014)

Tabela 4 – Uso do método QuEChERS para análise de diferentes classes de agrotóxicos em diferentes frutas relatados na literatura durante os últimos quatro anos (Continua).

<b>Classes de agrotóxicos estudados</b>	<b>Frutas</b>	<b>Níveis/(mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação/%</b>	<b>Método de extração</b>	<b>País</b>	<b>Referência</b>
Organofosforados e Piretróides	Maçã, Uva	0,031 – 0,045	75,8 – 99,8	CG-EM/ionTrap	Índia	Chandra, Mahndrakar e Shndl, (2014)
Organofosforados, Carbamatos, Fenilamidas, Organoclorados e Piretróides	Melão	-	77,4 – 107,8	CG-EM	Irã	Shoeibi et al, (2014)
Organofosforados, Neonicotinóides, Triazol, Imidazol, Estrobilurinas, Fenilamidas e Outros agrotóxicos não classificados	Cajú	-	67 – 114	CL-EM/EM	Brasil	Silva et al, (2014)
Piretróides, Organofosforados, Organoclorados, Estrobilurinas, Dicarboximidas e Outros agrotóxicos não classificados	Maçã, Laranja	nd – 1,3	-	CG-EM/EM	Espanha e Holanda	Cherta et al, (2013)
Organofosforados, Organoclorados, Piretróides, Triazol, phenylurea e Outros agrotóxicos não classificados	Laranja	nd – 0,529	-	CG-EM	Portugal	Andrascikovaab, Hrouzkova, Cunha, (2013)

Tabela 4 – Uso do método QuEChERS para análise de diferentes classes de agrotóxicos em diferentes frutas relatados na literatura durante os últimos quatro anos (Conclusão).

Classes de agrotóxicos estudados	Frutas	Níveis/(mg kg <sup>-1</sup> )	Recuperação/%	Método de extração	País	Referência
Triazol, Imidazol, Piretróides, Organofosforados e Outros agrotóxicos não classificados	Limão, Tangerina	nd – 2,79	71 – 120	CG-EM	Eslováquia	Andrascikovaab, Hrouzkova, (2013)
Organofosforados, Organoclorados, Carbamatos, Triazol, Cabamato e Piretróides	Maçã, Laranja	nd – 0,03	53,0 – 118,0	GC/TOF-EM	Espanha	Cevera et al, (2012)
Organofosforados, Neonicotinóides e Imidazol	Uva, Laranja, Morango, Banana, Limão e Tangerina	nd – 5,1	73 – 88	CL-DAD	Rússia	Amelin, et al (2012)
Organoclorados	Morango	nd – 0,013	51 – 121	GC-DCE	Portugal	Domingues et al, (2012)

Fonte: Autor (2016). Nota: CL – Cromatografia Líquida; CG – Cromatografia a Gás; CFS – Cromatografia de Fluido Supercrítico; EM/EM – Espectrômetro de massa com triplo quadrupolo; EM – Espectrômetro de massa com simples quadrupolo; EM/ionTrap – Espectrômetro de massa com ionTrap; EM-TOF – Espectrômetro de massa com tempo de voo (*time of light*); DAD – Detector de arranjo de dinodos; DCE – Detector de captura de elétrons.

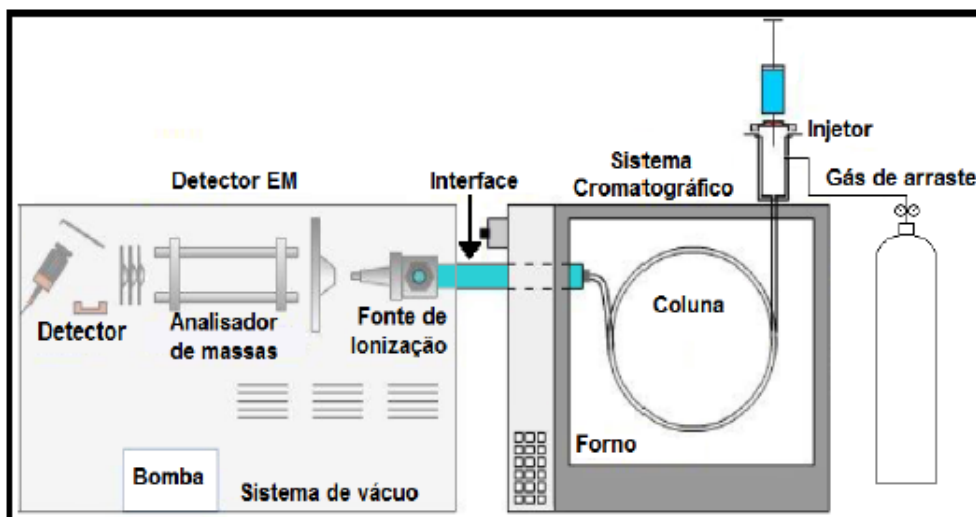
## 2.4 Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e aplicações na determinação de resíduos de agrotóxicos em frutas

A cromatografia em fase gasosa (CG) é uma técnica de separação para substâncias voláteis (ou passiva de volatilização) que envolve a percolação de um gás de arraste (fase móvel), cuja função é transportar a amostra até o detector, através de uma fase estacionária, normalmente um filme líquido colocado diretamente nas paredes da coluna (SKOOG *et al.*, 2010). A interação diferenciada dos analitos entre a fase móvel e estacionária, no interior da coluna, irá separá-los (CHIARADIA *et al.*, 2008). Os componentes básicos de um CG incluem a fase móvel, o sistema de injeção da amostra, a coluna cromatográfica, o forno para controle de temperatura da coluna e o sistema de detecção (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

Vários detectores podem ser utilizados em CG para acusar a presença dos componentes da amostra que são eluídos da coluna. Contudo, a espectrometria de massas tem sido bastante utilizada em conjunto com a cromatografia, mostrando-se ser a mais poderosa técnica de detecção, oferecendo informações qualitativas e quantitativas, possuindo alta sensibilidade e capacidade de distinção entre diferentes substâncias com o mesmo tempo de retenção (LI *et al.*, 2014). Para Lanças (2009), o acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas (EM) combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional de seletividade).

O espectrômetro de massas é basicamente constituído de três partes: uma fonte de ionização (normalmente por impacto de elétrons), um analisador de massas e um detector de íons (normalmente dinodos multiplicadores de elétrons). A Figura 5 ilustra de forma esquemática o acoplamento GC-EM, bem como seus componentes básicos.

Figura 5 – Representação esquemática do acoplamento CG-EM.



Fonte: CHROMAcademy (2014).

O quadrupolo simples, ou espectrômetro de massas quadrupolar de transmissão, é o analisador mais comum utilizado no acoplamento cromatografia a gás/espectrometria de massas (CG-EM) devido ao baixo custo e possibilidade em se trabalhar no modo monitoramento seletivo de íons (SIM) ou no modo monitoramento de íons extraídos (IE) (PAVIA *et al*, 2010).

Ao se trabalhar no modo SIM, o espectrômetro de massas é ajustado para monitorar apenas alguns poucos valores de massa/carga ( $m/z$ ) (no máximo até cinco valores). O que se faz é primeiramente gerar o cromatograma de íons totais (TIC), em que toda a faixa de íons (todas as razões  $m/z$ ) de cada composto que elui da coluna são detectadas, gerando assim o espectro de massas para cada substância, só então pode-se escolher os valores de  $m/z$  que serão monitorados no modo SIM para o analito de interesse (HARRIS, 2013).

Contudo, nos espectrômetros de massas mais modernos, escolhe-se uma faixa ampla de íons que serão monitorados no modo TIC, exemplo ( $m/z$  de 50-500), e todo o espectro de massas de cada composto é registrado separadamente durante a corrida cromatográfica. Assim, alguns valores de  $m/z$ , dentro da faixa monitorada, podem ser selecionados, para apenas o espectro que os contém apareça na tela, gerando o cromatograma de IE (HARRIS, 2013). Por exemplo, ao selecionar  $m/z$  de 109, 185 e 220, apenas a intensidade do analito que apresenta essas três massas será mostrada, apesar de todos os valores dentro da faixa de 50 a 500 serem medidas. O modo SIM e o IE aumentam a seletividade e melhoram a sensibilidade, diminuindo a resposta do instrumento a tudo que possa interferir na medida.

De maneira geral, diversos trabalhos têm sido reportados na literatura sobre a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos por CG-EM. Guedes *et al* (2016), por exemplo, analisou 21 multiclases de agrotóxicos em goiaba utilizando o método QuEChERS e detecção por CG-EM. E Fernandes *et al* (2011), utilizou o método QuEChERS no preparo de amostra para análise de 14 organoclorados em morangos por GC-EM. A Tabela 5 fornece aplicações do CG-EM como técnica de separação e detecção, para análise de diferentes classes de agrotóxicos em várias matrizes de frutas. A Tabela 5 também traz os níveis encontrados dos analitos estudados, bem como a faixa de recuperação obtida.



Tabela 5 – Uso de CG-EM para análise de diferentes classes de agrotóxicos em diferentes frutas relatados na literatura (*Continua*).

<b>Classes de agrotóxicos estudados</b>	<b>Frutas</b>	<b>Níveis/(mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação/%</b>	<b>Método de extração</b>	<b>País</b>	<b>Referência</b>
Organofosforados, Carbamatos, Fenilamina, Organoclorados e Piretróides	Melão	-	77,4 – 107,8	QuEChERS	Irã	Shoeibi et al, (2014)
Organofosforados, Organoclorados, Piretróides, Triazoles, Feniluréia e outros agrotóxicos não classificados	Laranja	nd – 0,529	-	QuEChERS	Portugal	Andrascikovaab, Hrouzkova, Cunha, (2013)
Triazoles, Imidazoles, Piretróides, Organofosforados e Outros agrotóxicos não classificados	Limão, Tangerina	nd – 2,79	71 – 120	QuEChERS	Eslováquia	Andrascikovaab, Hrouzkova, (2013)
Organoclorados	Morango	nd – 3,2	-	MESD	Portugal	Domingues et al, (2012)
Organofosforados, Triazoles, Carbamatos e Organoclorados	Uva, Morango	-	68 – 126	EFS	Cihna	Yang et al, (2011)
Organofosforados, Triazoles e Imidazoles	Mango	-	97 - 144	EFS	Brasil e Portugal	Barreto et al, (2011)
Organoclorados	Maçã, Pera	-	84,0 – 158,0	QuEChERS	Polônia	Cieslik et al, (2011)
Organofosforados, Piretróides, Organoclorados, Triazoles, Imidazoles e Dicarboximida	Uva	nd – 1,33	79,2 – 100,0	QuEChERS	Turquia	Turgut, Ornek, Cutright, (2011)

Tabela 5 – Uso de CG-EM para análise de diferentes classes de agrotóxicos em diferentes frutas relatados na literatura (*Conclusão*).

<b>Classes de agrotóxicos estudados</b>	<b>Frutas</b>	<b>Níveis/(mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação/%</b>	<b>Método de extração</b>	<b>País</b>	<b>Referência</b>
Triazoles, carboximides e Estrobilurinas	Uva	nd – 0,01	68 - 120	MESD	Espanha	Lagunas-Allue, Sanz-Asensio, Martínez-Soria, (2010)
Organofosforados, Triazoles, Carbamatos, imidazoles e Estrobilurinas	Mango	nd – 0,55	71,64 – 117,52	MEFS	Brasil	Menezes Filho, Neves dos Santos, Pereira, (2010)
Organofosforados, Triazoles e Piretróides	Maçã, Pera, Uva e Laranja	-	62 – 113	MESD	Espanha	Ramos, Gozalez, Ramos, (2009)
Carbamatos, Triazoles e Anilidas	Banana	nd	72 – 103	MEFD	Brasil	Aquino, Navickiene, (2009)

Fonte: Autor (2016). Nota: MESD – Micro extração em fase sólida dispersiva; EFS – Extração em fase sólida.

## 2.5 Validação de métodos analíticos

A necessidade de se mostrar medições químicas com qualidade e confiabilidade está sendo cada vez mais exigida, uma vez que dados analíticos não conformes podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Portanto, para garantir que um método gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (LANÇAS, 2009).

A validação de determinado procedimento analítico objetiva demonstrar que o mesmo é adequado aos objetivos propostos, ou seja, que os parâmetros de desempenho avaliados atendem aos critérios de aceitação preconizados (RIBANI *et al*, 2004). Segundo a resolução número 899 da ANVISA, a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a qualidade metrológica dos resultados (ANVISA, 2003).

De acordo com o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade (INMETRO), a validação é necessária sempre que um método existente for modificado ou quando um método totalmente novo for desenvolvido (INMETRO, 2003). No Brasil há duas agências credenciadas para verificar a competência dos laboratórios de ensaios, a ANVISA e o INMETRO, que disponibilizam guias e manuais para o procedimento de validação.

Os parâmetros analíticos normalmente determinados para validação de métodos de separação são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito (RIBANI *et al*, 2004).

### 2.5.1 Seletividade

A seletividade de um procedimento analítico é a capacidade em identificar o analito em misturas ou matrizes complexas sem interferência de outros componentes de comportamento semelhante (BRITO *et al*, 2003). Se o método produz respostas para vários compostos, mas pode distinguir a resposta do analito da de outros, é chamado de seletivo (INMETRO, 2003). Portanto, em cromatografia, esse parâmetro garante que o pico de resposta, seja exclusivamente do composto de interesse.

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental, se não corretamente assegurada comprometerá seriamente as outras figuras de mérito como linearidade, exatidão e precisão (RIBANI, 2004). Uma maneira de se avaliar a seletividade é por comparação da resposta instrumental obtida após tratamento da matriz

isenta das substâncias de interesse com a resposta da matriz na presença das substâncias (padrão), onde nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção do analito alvo (MAPA, 2011). No entanto, a utilização de detectores modernos (arranjo de diodos ou espectrômetro de massa) permitem avaliar a seletividade através da comparação do espectro do pico obtido na separação com o de um padrão, garantindo uma identificação inequívoca do analito através do grau de similaridade obtido (MAPA, 2011; RIBANI *et al*, 2004).

#### *2.5.1.1 Efeito Matriz*

Os possíveis efeitos matriz nos resultados das análises devem ser avaliados durante o processo de validação. Na prática o efeito matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar as possíveis interferências causadas por diversas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando fenômenos de superestimação ou subestimação do sinal instrumental (MAPA, 2011). Esse efeito se torna mais pronunciado em análises de amostras complexas, como é o caso de frutas, vegetais, vinhos, etc (PINHO *et al*, 2009).

Para Pinho *et al* (2009), um método que minimize os efeitos de matriz é de extrema importância para que haja uma quantificação exata, uma vez que nenhum é eficiente em eliminá-lo por completo. Um dos meios de se avaliar o efeito matriz é por comparação da inclinação da reta da curva de calibração preparado em solvente puro com a inclinação da reta da curva preparada com os analitos no extrato da matriz branca (SANTIAGO DA SILVA *et al*, 2012).

#### *2.5.2 Linearidade*

A linearidade pode ser definida como a capacidade de o procedimento fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (INMETRO, 2003; MAPA, 2011 e ANVISA, 2014). Esse parâmetro é avaliado através de uma relação matemática entre o sinal e a concentração da espécie química de interesse. Essa relação muitas vezes pode ser expressa como uma equação de reta chamada curva analítica ou curva de calibração, obtida a partir de sinais medidos para diferentes concentrações já conhecida da espécie química (BRITO *et al*, 2003).

A curva analítica pode ser construída por padronização externa, padronização interna, superposição da matriz ou adição de padrão. Na prática, recomenda-se que no mínimo cinco pontos, que não incluam o ponto zero devido aos possíveis erros associados, formem a curva (INMETRO, 2003; ANVISA, 2015).

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculados a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (INMETRO, 2003). Dessa forma, a partir dos pontos experimentais, pode-se obter os valores dos coeficientes de regressão (coeficiente linear – a e coeficiente angular – b) e do coeficiente de correlação (R). Este último, permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo da unidade, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al*, 2004).

Como os desvios da linearidade são muitas vezes difíceis de serem detectados visualmente e o R pode muitas vezes fornecer uma medida superficial da correlação, pode-se verificar a adequação da linearidade por meio de testes estatísticos de significância da regressão linear através do teste F de Hartley e dos parâmetros de calibração por meio do teste t de student (INMETRO, 2003; RIBANI *et al*, 2004).

### 2.5.3 Sensibilidade

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, como por exemplo análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração que pode ser detectado e quantificado pelo método (INMETRO, 2003). Segundo Harris (2013), a sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, de forma confiável e mensurável, às variações de concentração do analito.

Dessa forma, define-se limite de detecção (LD) a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental; e limite de quantificação (LQ) a menor concentração da substância que pode ser medida com veracidade e precisão (RIBANI *et al*, 2004).

Para Ribani *et al* (2004), uma das maneiras de se estimar os valores de LD e LQ é por meio da utilização dos parâmetros da curva de calibração segundo as equações abaixo:

$$LD = 3. \frac{S_a}{b} \quad \text{e} \quad LQ = 10. \frac{S_a}{b}$$

Onde:

$S_a$  = desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica;

b = coeficiente angular da curva analítica.

No entanto, em métodos sensíveis, como os cromatográficos acoplado a espectrometria de massa, a substância alvo passa por inúmeras etapas desde que é injetado até

chegar ao detector, e uma pequena diferença na concentração do analito causa grandes variações no valor do sinal analítico medido, dando elevados valores de desvio padrão (BRITO *et al*, 2003). Uma maneira mais eficiente de se estimar esses parâmetros em cromatografia consiste no método das diluições sucessivas através da relação sinal/ruído.

Nesse método é feita a comparação entre a medição dos sinais obtidos em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e de um branco (matriz isenta do composto de interesse) (MAPA, 2011). Quando o sinal é 3 vezes maior que o ruído ele é prontamente detectável, apesar de ainda ser pequeno demais para uma medida exata, correspondendo, portanto, ao LD; só quando a relação sinal/ruído é igual a 10, tem-se a menor quantidade que pode ser medida com determinada exatidão, correspondendo ao LQ (MAPA, 2011; Harris, 2013). Dessa forma, quanto menor o nível de concentração que representa o LQ, mais sensível é o método e mais precisa torna-se a medição (RIBANI *et al*, 2004).

#### 2.5.4 Precisão

A precisão é a reprodutibilidade de um resultado determinado em circunstâncias específicas de medição, avaliando a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra (HARRIS, 2013). Normalmente é expresso em termos do coeficiente de variação (CV) de diversas medidas de acordo com a equação abaixo (BRITO *et al*, 2003):

$$CV/\% = \frac{S}{M} \times 100$$

Onde:

S = desvio padrão das várias medidas;

M = média das várias medidas.

O INMETRO (2003) sugere no mínimo 7 repetições para o cálculo do desvio padrão. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitáveis CV de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI *et al*, 2004). Uma das formas de estimar a precisão é por meio do método da repetitividade.

Repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade que são: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e com repetições em curto espaço de tempo (INMETRO, 2003).

### 2.5.5 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre o valor de referência do analito aceito como verdadeiro na amostra e o estimado pelo processo analítico (RIBANI *et al*, 2004). Os quatro métodos principais, propostos para avaliar a exatidão de um método, são baseados no uso de material de referência certificado, na comparação entre o método proposto com um de referência, no uso de ensaios de recuperação na matriz e através da construção de uma curva de calibração pelo método da adição padrão (BRITO *et al*, 2003).

Como nem sempre materiais de referência encontram-se disponíveis devido a abrangência limitada de matrizes e de analitos, e muitas vezes o método analítico de referência não está prontamente acessível, os ensaios de recuperação constituem os mais usados para validação de processos analíticos (HARRIS, 2013).

A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (RIBANI *et al*, 2004). De acordo com o MAPA (2011), este ensaio tem por objetivo corrigir o resultado suscetível aos erros sistemáticos oriundos de todas as etapas da marcha analítica até a realização da leitura da resposta instrumental.

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas (fortificadas) com quantidades conhecidas do mesmo. As amostras devem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes níveis de concentrações considerados alto, médio e baixo, da faixa de uso do método (ANVISA, 2014). A limitação deste procedimento é que a substância alvo muitas vezes é adicionada em uma forma mais facilmente detectável que a presente na amostra, podendo ocasionar em avaliações excessivamente otimistas da recuperação (INMETRO, 2003).

O intervalo aceitável de recuperação para análise de resíduos, geralmente são entre 70 e 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$  (ANVISA, 2014). Porém é importante considerar que a eficiência do método pode variar em função da concentração da substância na amostra, de maneira que a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações de fortificações, portanto, dependendo da complexidade analítica e da matriz, e quando se trabalha a níveis traços, uma faixa mais ampla (entre 50 e 120%, com precisão de  $\pm 15\%$ ) pode ser aceita (RIBANI *et al*, 2004).

### 2.5.6 Robustez

O estudo de robustez de um procedimento analítico procura avaliar o quão suscetível o resultado analítico é às variações nas condições experimentais (MAPA, 2011). Portanto, diz-se que um método é robusto se ele não é afetado por pequenas modificações

deliberadas em seus parâmetros (RIBANI *et al*, 2004). Nos testes de robustez são aplicados experimentos estatísticos que examinam, simultaneamente, os efeitos de alteração em diferentes variáveis do método (BRITO *et al*, 2003). No caso de métodos cromatográficos, as variações referem-se a diferentes tipos de colunas, fluxo, programação de temperatura e natureza do gás de arraste no caso de CG, bem como o tempo e pH de extração, agitação, entre outros fatores no preparo de amostra (LANÇAS, 2009).

Segundo o MAPA (2011), todas as possíveis variações das condições experimentais, que podem ocorrer durante a rotina analítica, devem estar respaldadas pelos estudos de robustez, pois tais variações podem ser as alterações que podem ocorrer quando o método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamento. Portanto, quanto maior a robustez de um método, maior será sua precisão e maior a portabilidade para outros laboratórios interessados na execução de tal procedimento (INMETRO, 2011).



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Desenvolver e validar uma metodologia analítica para a análise qualitativa e quantitativa de oito agrotóxicos organofosforados em amostras de sapoti (*Manilkara zapota*) por métodos cromatográficos acoplado a espectrometria de massa, empregando o QuEChERS no preparo de amostra.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- ✓ Testar o uso do UPLC-QTOF-MS e do CG-EM na validação do método;
- ✓ Otimizar as condições cromatográficas para obtenção de cromatogramas dos oito agrotóxicos com boa resolução;
- ✓ Validar as condições cromatográficas otimizadas para a determinação dos agrotóxicos em amostras de sapoti empregando o método de extração QuEChERS;
- ✓ Aplicar a metodologia desenvolvida em frutas de sapoti obtidos de diferentes localidades da cidade de Fortaleza-CE e em polpas de diferentes marcas.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

Os experimentos realizados neste trabalho foram executados no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (LMQPN) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em parceria com o Laboratório de Análises de Traços (LAT) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

### 4.1 Reagentes, solventes e materiais utilizados

- ✓ Acetonitrila 99,9% ( $v v^{-1}$ ) grau UV/HPLC/Espectroscópico (Tedia);
- ✓ N-Hexano 97% ( $v v^{-1}$ ) grau UV/HPLC/Espectroscópico (Vetec);
- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q UV3<sup>®</sup> (resistividade de 18,2 M $\Omega$  cm);
- ✓ Amina primária secundária (PSA) com tamanho de partículas de 40  $\mu$ m (Sigma Aldrich, 50 gamas (g));
- ✓ Carvão (carbono grafitizado) (Sigma Aldrich, 50 g);
- ✓ Citrato de sódio tribásico P. A. (Vetec, 500 g);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro P. A. (Vetec, 500 g);
- ✓ Cloreto de Sódio P. A. (Sigma Aldrich, 500 g);
- ✓ Hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado 99% P. A. (Sigma Aldrich, 50 g);
- ✓ Detergente faixa neutra (pH 6,5 a 7,5);
- ✓ Frascos de vidro (vial), capacidade de 5 mL;
- ✓ Gás Hélio (99,99%) – usado como fase móvel;
- ✓ Metanol 99,9% ( $v v^{-1}$ ) UV/HPLC/Espectroscópico (Tedia);
- ✓ Mix padrão analítico de oito agrotóxicos organofosforados (gutiom, clorpirifós, diclorvós, dissulfotom, etoprofós, fenclorvós, parationa-metílica e protiofós) 2000 mg L<sup>-1</sup> em hexano:acetona (9:1) (Sigma-Aldrich);
- ✓ Tubos para centrífuga tipo Falcon, capacidades 15 e 50 mL, fundo cônico, em plástico polipropileno;
- ✓ Tubos de Eppendorf;
- ✓ Pipeta de pasteur de vidro.

### 4.2 Limpeza das vidrarias

Os materiais utilizados foram lavados com detergente faixa neutra (pH 6,5 a 7,5), água destilada e com água ultra purificada em sistema Milli-Q. O procedimento de secagem adotado para as vidrarias volumétricas foi secagem lenta (onde as mesmas foram mantidas

expostas ao ar) e para as não volumétricas foram secas em estufa mantida a 150°C por 30 minutos.

### **4.3 Teste utilizando o UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>**

Na tentativa de identificar os compostos por cromatografia líquida (CL) diversas condições foram testadas, para o teste foi utilizado uma solução padrão mix 1 mg L<sup>-1</sup>. Esta solução foi obtida a partir de um mix de 100 mg L<sup>-1</sup> dos agrotóxicos através de diluição com metanol grau HPLC, partindo-se inicialmente do padrão analítico de 2000 mg L<sup>-1</sup> também diluindo-se com metanol ultra puro para obtenção do mix de 100 mg L<sup>-1</sup>.

O gradiente de eluição utilizado permaneceu o mesmo em todas as injeções, variando-se a fase orgânica de 2 a 98 % durante 20 minutos, o fluxo foi mantido na vazão 0,45 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção (VI) de 5 µL. Primeiramente 0,1 % (v v<sup>-1</sup>) de ácido fórmico em água e 0,1 % (v v<sup>-1</sup>) de ácido fórmico em acetonitrila foram utilizados como fase móvel.

### **4.4 Preparo da solução estoque para análise em CG-EM**

A solução padrão estoque dos agrotóxicos foi preparada a partir da solução mix dos organofosforados (2000 mg L<sup>-1</sup>). Inicialmente, transferiu-se 50 µL da solução mix para um balão volumétrico de 10 mL com um micropipetador automático e aferiu-se o volume com hexano, afim de obter uma solução de 10 mg L<sup>-1</sup>. A partir desta solução, transferiu-se 500 µL para um balão volumétrico de 5 mL, aferindo-se o volume final com hexano e obtendo uma solução padrão estoque de trabalho na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup>.

#### ***4.4.1 Preparo das soluções padrão para obtenção das curvas analíticas no solvente e na matriz***

Foram construídas curvas de calibração no solvente e na matriz para posterior verificação de possíveis componentes da amostra que possam interferir positivamente ou negativamente no sinal referente aos agrotóxicos detectados no estudo.

Devido às diferentes sensibilidades dos analitos em estudo, decidiu-se trabalhar em uma ampla faixa de concentração, preparando-se soluções padrão desde 5 µg L<sup>-1</sup> até 5 mg L<sup>-1</sup> totalizando-se 16 pontos. Dessa forma, para os analitos mais facilmente detectáveis, foram obtidos dois tipos de curva, uma para elevadas faixas de concentração e outra para baixos

níveis de concentração. As soluções padrão preparadas para o estudo foram de 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 e 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Para construção da curva analítica no solvente, os padrões de 5 a 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  foram preparados através de diluições com hexano de alíquotas da solução estoque de 1  $\text{mg L}^{-1}$ , obtida de acordo com o item 4.4. Já os padrões de concentrações mais elevadas (500 a 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) foram preparados diluindo-se alíquotas da solução de 10  $\text{mg L}^{-1}$ .

Para a construção da curva na matriz, procedeu-se o preparo de amostra da fruta sapoti, descrito posteriormente no item 4.7. E em vez de ressuspender o resíduo da amostra em hexano puro, utilizou-se 1 mL de cada um dos 16 pontos preparados anteriormente, obtendo-se assim os componentes da matriz diluídos em hexano juntamente com os agrotóxicos em 16 níveis de concentração.

#### 4.5 Condições cromatográficas

O método cromatográfico foi desenvolvido no sistema CG-EM / Agilent Technologies (modelo 7890B do CG e 5977A do EM). A Figura 6 mostra o sistema cromatográfico utilizado no estudo. O gás de arraste utilizado foi o gás hélio (99,99%) na vazão de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ , coluna capilar HP5-S da Agilent com dimensões de 30 m x 0,25 mm d.i. (diâmetro interno) e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme da fase estacionária com composição 5% fenil e 95% polidimetilsiloxano. O injetor operou no modo splitless (sem divisão de fluxo). O espectrômetro de massa operou no modo de ionização por impacto de elétrons (IE) a 70 eV, com fonte de íons a 240°C e temperatura da linha de transferência de 240°C.

Inicialmente injetou-se 1,0  $\mu\text{L}$  do padrão com a Temperatura do Injetor (TI) mantida a 170°C com a seguinte programação de temperatura: temperatura inicial de 100°C durante 1 min, seguindo com aquecimento de 12°C/min até 165°C, aumentando-se a temperatura com aquecimento de 10°C/min até 300°C permanecendo por 2 min., correspondendo a um tempo de corrida de 21,9 minutos, como ilustra a Figura 7. Essas condições foram obtidas de acordo com o estudo de LU *et al* (2013).

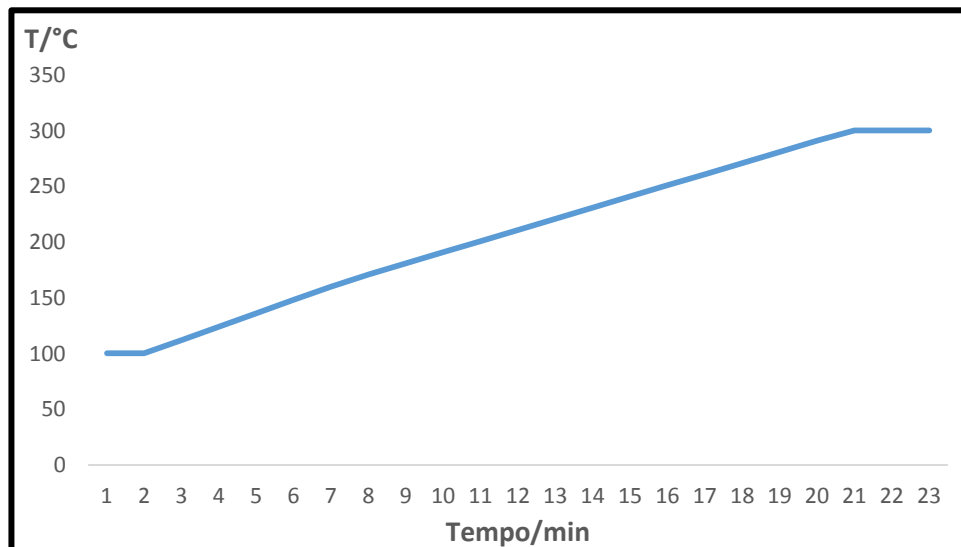
Outros testes foram realizados mantendo a mesma programação de temperatura, porém a temperatura do injetor (TI) foi elevada para 240°C com um Volume de Injeção (VI) de 5  $\mu\text{L}$ .

Figura 6 – CG-EM utilizado no estudo



Fonte: Autor (2016)

Figura 7 – Programação de temperatura utilizado no estudo



Fonte: Autor (2016)

#### 4.6 Amostragem

Com o objetivo de realizar uma análise qualitativa e quantitativa dos agrotóxicos, foram coletadas amostras de frutas de sapoti (*Manilkara zapota*) de 10 supermercados de redes distintas na cidade de Fortaleza-CE abrangendo os bairros Cidade dos Funcionários (P1), Edson Queiroz (P2 e P3), Parangaba (P4 e P5), Maraponga (P6 e P7), Itaperi (P9), Bela Vista (P8) e Centro (P10), como especificados na Figura 8. Além da obtenção de polpas da fruta de três diferentes marcas (M1, M2 e M3).

Após a coleta, as amostras foram imediatamente levadas ao laboratório, onde o fruto *in natura* foi fracionado e em seguida integralmente processado em um multiprocessador de alimentos doméstico. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro previamente limpos de acordo com o item 4.2 e mantida em freezer à temperatura de -4°C até realização dos experimentos.

Figura 8 – Pontos de amostragem da fruta do sapoti



Fonte: Google Earth, modificado pelo autor (2016)

#### 4.7 Preparo de amostra para os estudos de validação

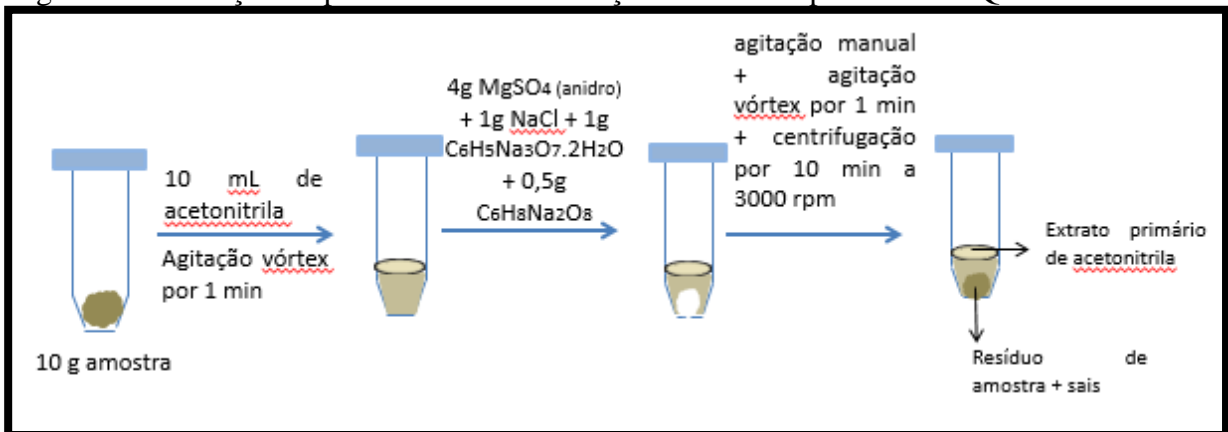
Para os estudos de validação foram utilizados amostras do fruto obtidos do supermercado intitulado como P4, que foi transportado para o laboratório para execução do preparo prévio.

O método QuEChERS citrato, descrito por Anastassiades *et al* (2003), foi utilizado como procedimento de preparo de amostra por ser bastante eficiente na extração de agrotóxicos em matrizes ambientais, tais como frutas. Contudo, uma etapa a mais foi adicionada ao método com o objetivo de deixar o extrato final mais adequado para análise cromatográfica.

#### 4.7.1 Procedimento de extração e limpeza pelo método QuEChERS citrato

Inicialmente 10 g de amostra de sapoti previamente processada foi pesada diretamente em um tubo Falcon com capacidade de 50 mL, onde foi adicionado 10 mL de acetonitrila (grau cromatográfico) de acordo com a proporção descrita pelo método (1 mL de acetonitrila para 1 g de amostra), seguida de agitação por 1 minuto em agitador vórtex. Após a agitação, adicionou-se uma mistura de sais contendo 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 de hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado que foram anteriormente pesados, seguido de agitação manual do tudo para evitar formação de nódulos. Em seguida, procedeu-se com agitação por 1,0 minuto usando vórtex e centrifugação por 10 minutos na velocidade de 3000 rpm para obtenção do extrato (Figura 9).

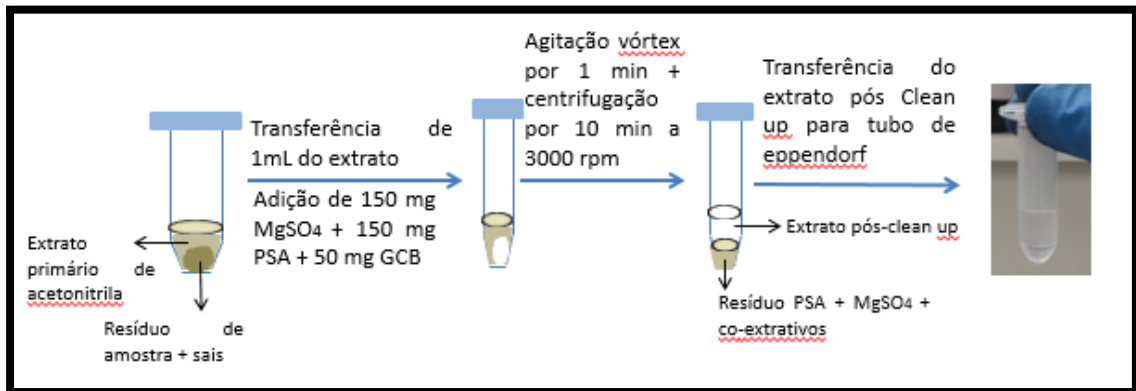
Figura 9 – Ilustração do procedimento de extração da amostra pelo método QuEChERS citrato.



Fonte: Autor (2016)

Após a etapa de extração, uma alíquota de 1 mL da fase líquida de acetonitrila foi transferida para um tubo Falcon de capacidade de 15 mL, contendo os absorventes de limpeza, 150 mg de sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) anidro, 150 mg de amina primária secundária (PSA) e 50 mg de carbono grafitizado (GCB). Em seguida agitou-se por 1,0 minuto em agitador vórtex para promover a dispersão dos sorventes no extrato primário da matriz e centrifugou-se por 10 minutos a 3000 rpm, obtendo-se o extrato pós clean up que foi transferido para um tubo de eppendorf (Figura 10).

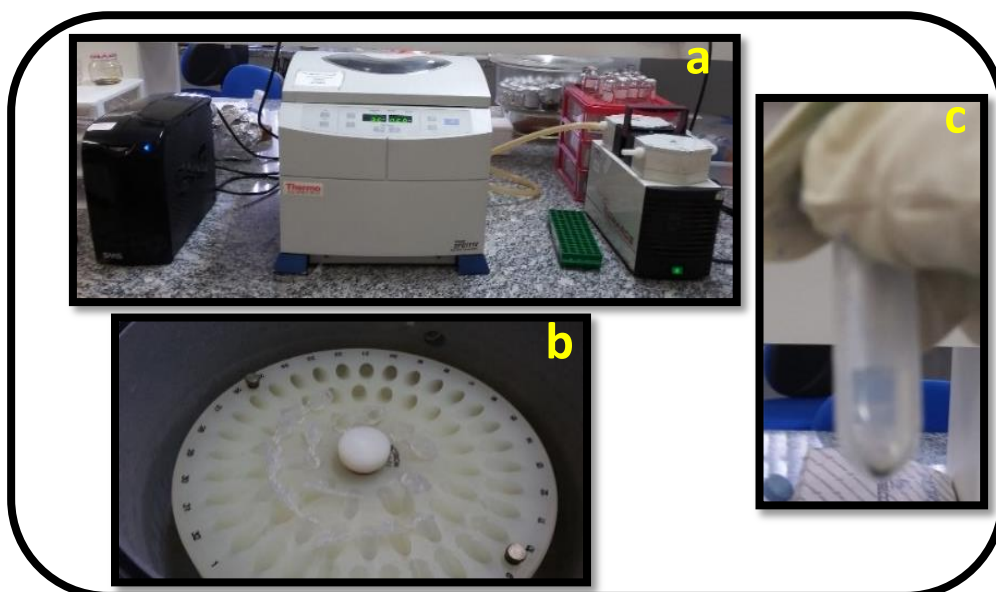
Figura 10 – Ilustração do procedimento de clean up.



Fonte: Autor (2016)

Contudo, o extrato final do método apresenta-se em acetoneitrila. Devido a possibilidade de sobrecarga do liner, uma vez que a acetoneitrila apresenta um elevado volume de expansão, e com a finalidade de manter o extrato final mais parecido com a solução do padrão analítico (em hexano), uma etapa de ressuspensão foi adicionado ao método. Dessa forma, o solvente inicial foi evaporado em uma centrífuga a vácuo modelo SpeedVac (Marc & Therc) como ilustrado na Figura 11. Ao resíduo obtido após evaporação (Figura 11c), foi adicionado 1 mL de hexano grau cromatográfico, agitou-se no vórtex e transferiu-se a solução obtida para um vial com ajuda de uma pipeta de pasteur de vidro, para posterior injeção no sistema cromatográfico.

Figura 11 – (a) aparelho SpeedVac utilizado nos experimentos; (b) Interior do equipamento, com os tubos eppendorf posicionados; (c) Resíduo obtido após evaporação.



Fonte: Autor (2016)



#### 4.8 Efeito matriz

A avaliação da existência de efeito matriz no extrato de sapoti nas análises por CG-EM, foi realizada mediante comparação dos coeficientes angulares obtidos pela curva de calibração no solvente e na matriz, conforme equação 1:

$$EM = \frac{(b_m - b_s) \times 100}{b_s} \quad (1)$$

Onde:

$b_m$  = coeficiente angular da curva na matriz;

$b_s$  = coeficiente angular da curva no solvente;

EM = Efeito Matriz.

Não é considerado a existência de efeito matriz para as relações que ficarem no intervalo de  $-10\% < EM < 10\%$  (SANTIAGO DA SILVA *et al*, 2012 e DAYANA DOS SANTOS, 2013).

#### 4.9 Parâmetros de validação do método CG-EM

A validação do método analítico envolveu o estudo dos parâmetros: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão, conforme as recomendações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), seguindo o Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Resíduos e contaminantes em alimentos (MAPA, 2011). Para este estudo utilizou-se amostras de sapoti provenientes do P4.

##### 4.9.1 Seletividade

Para o estudo de seletividade, utilizou-se os principais fragmentos (quantificação e confirmação) do espectro de massa de cada analito para obter os seus respectivos cromatogramas de IE. Além disso observou-se a similaridade do espectro de massa de cada composto com o espectro do padrão presente na biblioteca do instrumento.

##### 4.9.2 Linearidade

Para o estudo da linearidade foram preparadas curvas de calibração no solvente e na matriz conforme subitem 4.4.1. Para um bom ajuste linear da faixa de concentração adotada foi considerada a aproximação do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) com 1. Além disso, foram feitos testes estatísticos para verificar a significância da regressão linear e dos parâmetros de calibração da curva escolhida para quantificação dos analitos em amostras

reais. Os testes foram realizados através de cálculos estatísticos de desvio padrão dos valores do coeficiente linear (a), angular (b) e dos desvios verticais (no eixo y) segundo as equações 2, 3 e 4, respectivamente:

$$s^2_a = \frac{s^2_y \cdot \sum(x^2_i)}{D} \quad (2)$$

$$s^2_b = \frac{s^2_y \cdot n}{D} \quad (3)$$

$$s^2_y = \frac{\sum(d^2_i)}{n - 2} \quad (4)$$

Onde:  $s_a$  = Desvio padrão do coeficiente linear;

$s_b$  = Desvio padrão do coeficiente angular;

$s_y$  = Desvio padrão no eixo y;

$x_i$  = Valores individuais de x;

$n$  = número total de pontos da curva;

$d_i$  = Desvio vertical de cada ponto;

$D$  = Determinante, dado da seguinte forma: 
$$\begin{vmatrix} \sum(x^2_i) & \sum x_i \\ \sum x_i & n \end{vmatrix}$$

Após obtenção dos valores de  $s_a$ ,  $s_b$  e  $s_y$ , utilizou-se o teste ‘t de student’ para os parâmetros de calibração e o teste F para a análise de regressão linear, através das seguintes fórmulas:

$$t_{calc,b} = \frac{|b-1|}{s_b}; t_{calc,a} = \frac{|a-0|}{s_a}; F_{calc} = \frac{s^2_{max}}{s^2_{min}} \quad (5)$$

Onde “ $s_{max}$  e  $s_{min}$ ” representam o maior e menor desvio padrão calculado para as réplicas em cada nível de concentração da calibração, respectivamente. De maneira que, se  $t_{calculado} > t_{tabelado}$  com um nível de confiança de 95%, o parâmetro é significativo e deve ser mantido na equação da reta, porém se  $t_{tabelado} > t_{calculado}$ , o parâmetro de calibração é insignificativo devendo ser excluído. Da mesma forma, se  $F_{calculado} > F_{tabelado}$  para 95% de confiança, a regressão linear é significativa, caso contrário, se  $F_{tabelado} > F_{calculado}$ , não existe relação linear entre os eixos x e y, mesmo com um bom valor de  $R^2$ .

#### 4.9.3 Exatidão e precisão

A exatidão foi estimada através do estudo de recuperação, onde contaminações intencionais foram feitas na amostra da fruta do sapoti em diferentes níveis de concentração para posterior extração e clean up pelo método QuEChERS. Para as fortificações, diferentes alíquotas da solução padrão de 10 mg L<sup>-1</sup>, preparada de acordo com o item 4.4, foram adicionadas ao tubo de centrífuga com a amostra já pesada. Para o cálculo da porcentagem (%) recuperada utilizou-se a seguinte equação (6), comparando-se os resultados obtidos com os recomendados pela resolução ANVISA n°899/03 de 70 a 120%.

$$\% \text{ recuperação} = \frac{C_f - C_i}{C_a} \times 100 \quad (6)$$

Onde:  $C_f$  = Concentração do analito na amostra contaminada intencionalmente;

$C_i$  = Concentração do analito na amostra não contaminada intencionalmente;

$C_a$  = Concentração adicionada.

A precisão foi obtida utilizando-se o método da repetitividade, calculando-se o CV das áreas obtidas após 10 injeções da solução padrão de 1 mg L<sup>-1</sup> no sistema cromatográfico.

#### 4.9.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

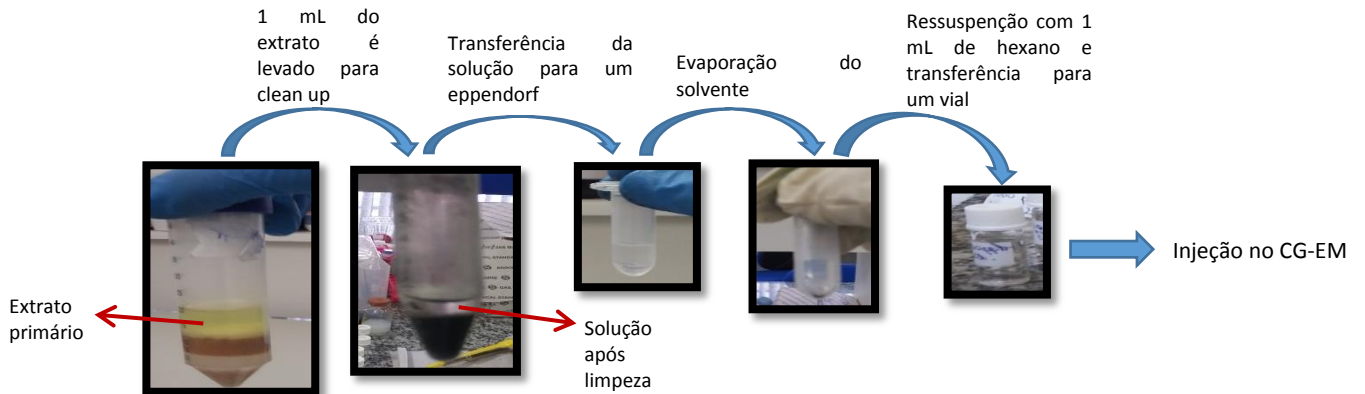
Os LD's e LQ's foram estimados através de injeções sucessivas das soluções padrão preparadas de acordo com o subitem 4.4.1, partindo-se da menor diluição até o nível de concentração que resultou em uma relação sinal/ruído de 3 e 10 respectivamente, obtendo-se, assim, LD's e LQ's pelo método das diluições sucessivas.

#### 4.10 Conversão da relação massa/volume (µg L<sup>-1</sup>) para relação massa/massa (mg kg<sup>-1</sup>)

Após obter os resultados a partir da curva de calibração, é necessário convertê-los para que fiquem de acordo com unidades estabelecidas pelas legislações. Como esquematizado na Figura 12, durante o procedimento do método QuEChERS, 1 mL do extrato, após a etapa de limpeza, é levado para a centrífuga SpeedVac, onde em seguida será ressuspensionado em hexano com o mesmo volume de solvente que havia anteriormente, seguido de injeção cromatográfica de uma alíquota desta solução. Portanto pode-se concluir que a

concentração do analito adquirida após tratamento dos dados através da curva calibração, é aquela do extrato primário.

Figura 12 – Esquema ilustrando a obtenção da concentração do analito no extrato em  $\mu\text{g L}^{-1}$



Fonte: Autor (2016)

De posse da concentração do analito no extrato primário em  $\mu\text{g L}^{-1}$  e através da aplicação da equação abaixo (7), obtemos a concentração estimada do analito no fruto em  $\text{mg kg}^{-1}$ .

$$C_F = \frac{C_{ext} (\mu\text{g L}^{-1}) \times V (L)}{m_a (kg) \times 1000} [\text{mg kg}^{-1}] \quad (7)$$

Onde:  $C_F$  = Concentração do analito na amostra;

$C_{ext}$  = Concentração do analito no extrato em  $\mu\text{g L}^{-1}$ ;

$V$  = Volume do extrato em litros;

$m_a$  = Massa de amostra pesada, cerca de 0,01 kg;

1000  $\rightarrow$  Fator de conversão de ' $\mu\text{g}$ ' para ' $\text{mg}$ '.

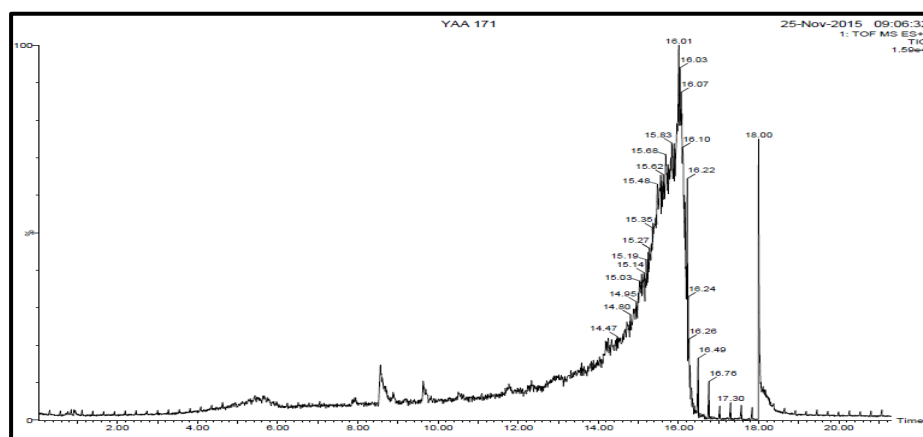
Além da utilização da equação 7 para obter os valores de concentração dos analitos em amostras reais, esta também foi utilizada para a conversão dos valores de LD's, LQ's e dos níveis de fortificação para a relação massa/massa ( $\text{mg kg}^{-1}$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise cromatográfica por UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>

As condições cromatográficas descritas no item 4.3 para o sistema UPLC-QTOF-MS não foram satisfatórias para a análise dos agrotóxicos organofosforados, conforme observado na Figura 13.

Figura 13 – Cromatograma obtido através do gradiente de eluição linear de 2 a 98 % durante 20 minutos com 0,1 % (v v<sup>-1</sup>) ác. fórmico em água e 0,1 % (v v<sup>-1</sup>) de ác. fórmico em acetonitrila como fase móvel.

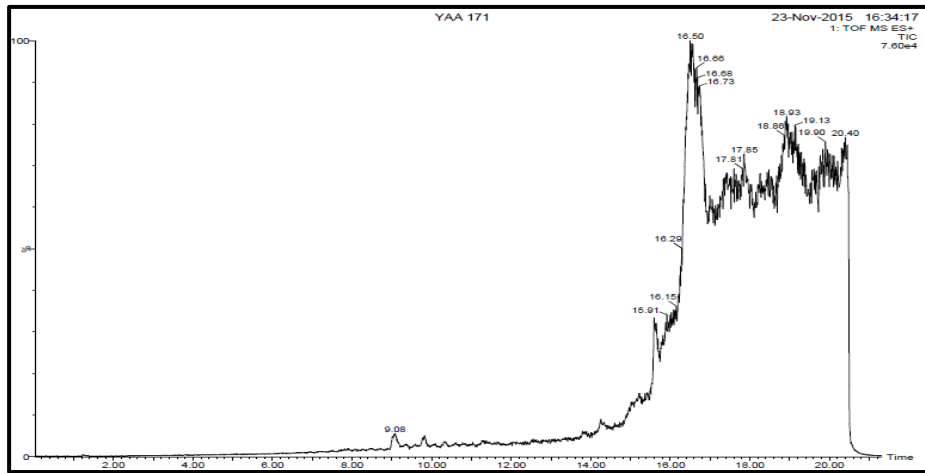


Fonte: Autor (2016)

Nenhum composto em estudo foi observado na Figura 13, então uma pequena modificação na fase móvel foi feita utilizando-se acetato de amônio em vez de ácido fórmico como reagente estabilizante, assim como realizado por Grimalt *et al* (2010) quando estudou resíduos de agrotóxicos em matrizes de alimentos por três analisadores diferentes. A Figura 14 ilustra o cromatograma obtido quando se utilizou 38,5 mg de acetato de amônio em água e em acetonitrila.

Novamente, não foi possível observar nenhum pico referente aos agrotóxicos em estudo. Esse resultado pode estar relacionado com a fase de diluição do padrão primário dos pesticidas (2 000 mg L<sup>-1</sup>), cujo os analitos estão diluídos em uma solução de hexano/acetona (9:1). Devido a imiscibilidade do hexano em metanol, a solução preparada para realizar os testes (1 mg L<sup>-1</sup>) pode ter formado duas fases, mesmo não sendo possível observá-la visualmente devido as grandes proporções do metanol.

Figura 14 – Cromatograma obtido utilizando 38,5 mg de Ac. de amônio em água e em acetonitrila como fase móvel.

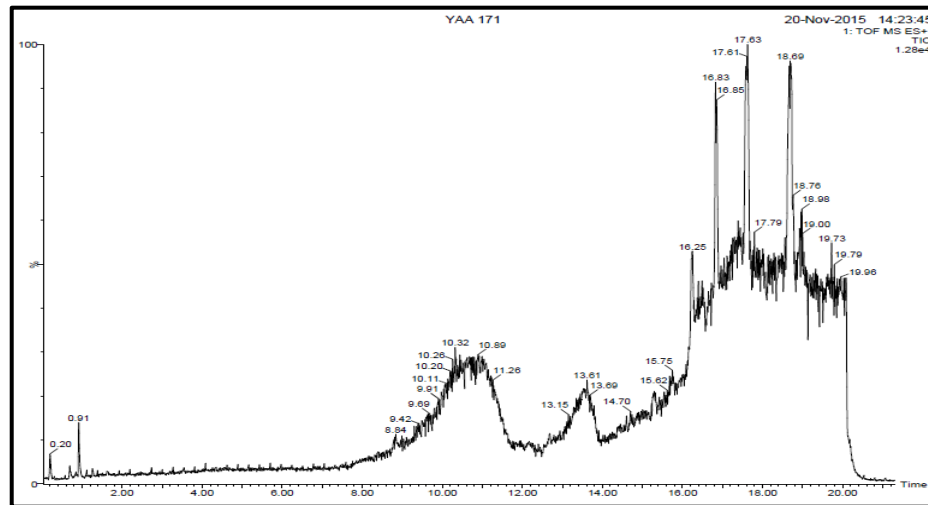


Fonte: Autor (2016)

Na Tabela 2 é possível observar os valores do ‘log  $K_{ow}$ ’ dos agrotóxicos a 20°C e pH 7, todos eles encontram-se positivos, indicando maior afinidade dos analitos por fases orgânicas (pouco polares). O menor valor de log  $K_{ow}$  é de 1,9 para o diclorvós, isso indica que este composto apresenta aproximadamente 79,4 vezes maior afinidade por octanol do que por água. A grande afinidade destes compostos por fases não polares pode ter levado a concentração deles na pequena região do hexano, impossibilitando a coleta dos analitos pela seringa do sistema cromatográfico.

Devido a miscibilidade do hexano em clorofórmio, imaginou-se que uma solução 10 % (v v<sup>-1</sup>) de clorofórmio em metanol fosse adequada para extrair os agrotóxicos da fase hexano para a fase mais polar (metanol). Dessa forma, um novo teste foi realizado, agora o mix de 100 mg L<sup>-1</sup> foi preparado diluindo-se uma alíquota do padrão analítico de 2000 mg L<sup>-1</sup> com a solução de clorofórmio/metanol, em seguida foi preparada a solução de 1 mg L<sup>-1</sup> a partir da de 100 mg L<sup>-1</sup> e injetou-se no sistema cromatográfico. Na Figura 15 é possível observar o cromatograma obtido utilizando-se 0,1 % (v v<sup>-1</sup>) de ácido fórmico em água e em acetonitrila como fase móvel.

Figura 15 – Cromatograma obtido após injeção do mix de 1 mg L<sup>-1</sup> preparado apartir do mix de 100 mg L<sup>-1</sup> em clorofórmio/metanol. Fase móvel utilizada 0,1% de Ac. Fórmico em água e em acetonitrila.



Fonte: Autor (2016)

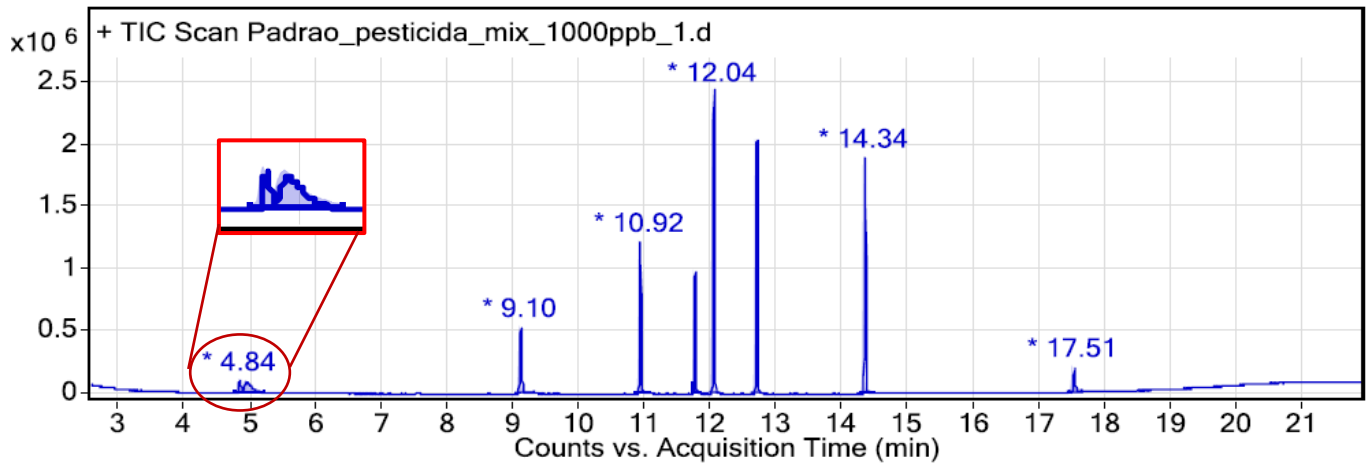
Novamente nenhum composto foi observado, podendo-se concluir que o padrão primário dos pesticidas em fase hexano/acetona (9:1) é incompatível para análise no sistema de cromatografia líquida disponível, devendo ser utilizado cromatografia a gás para determinação e quantificação desses compostos.

Contudo, é importante ressaltar, que seria possível analisar esses compostos no sistema de CL se estivessem diluídos em solventes adequados como o metanol, o melhor a se fazer é comprar os padrões isolados e em pó para que possam ser diluídos em solventes de acordo com a técnica desejada. Porém a obtenção de padrões de agrotóxicos misturados e já diluídos é bem mais acessível e barato.

## 5.2 Análise cromatográfica por CG-EM

As condições cromatográficas descritas na seção 4.5 para o sistema CG-EM permitiram uma eficiente resolução para os oito agrotóxicos organofosforados. A Figura 16 mostra o perfil de separação dos analitos contidos em uma solução padrão de 1 mg L<sup>-1</sup>, cuja eluição total ocorreu em um tempo menor que 20 minutos, utilizando-se temperatura do injetor (TI) a 240°C, 5 µL o volume de injeção (VI) e operando no modo Cromatograma de Ions Totais (TIC).

Figura 16 – Cromatograma obtido utilizando TI a 240°C, após injeção de 5 µL do mix de 1 mg L<sup>-1</sup> no modo TIC.



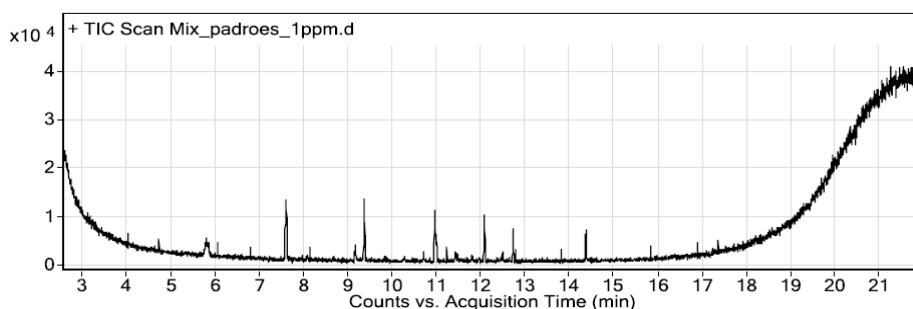
Nota: T<sub>r</sub> = Tempo de retenção

T<sub>r</sub> = 4,8 min (Diclorvós); T<sub>r</sub> = 9,1 min (Etoprofós); T<sub>r</sub> = 10,9 min (Dissulfotom); T<sub>r</sub> = 11,8 min (Prationa metflica); T<sub>r</sub> = 12 min (Fenclorfós); T<sub>r</sub> = 12,7 min (Clorpirifós), T<sub>r</sub> = 14,3 min (Protiofós) e T<sub>r</sub> = 17,5 min (Gutiom).

É possível observar a baixa intensidade referente ao gutiom e a formação de dois picos que indicam diclorvós. A baixa sensibilidade do gutiom comparado aos outros compostos pode ser explicada por sua baixa pressão de vapor, apenas de  $5 \times 10^{-4}$  mPa a 25°C como indica a Tabela 2. E a elevada TI (240°C) pode estar degradando o diclorvós que apresenta ponto de degradação (PD) de 190°C (Tabela 2), o que pode estar ocasionando a ocorrência de dois picos.

Inicialmente trabalhou-se com TI mais baixa a 170°C com VI de 1 µL como mostra o cromatograma da Figura 17, nessas condições apenas picos relacionados a impurezas apareceram bem próximos ao ruído, e nenhum analito foi identificado. Ao aumentar a TI para 240°C e o VI para 3 µL, foi possível observar picos cromatográficos referentes aos analitos, porém em intensidades pequenas, confundindo-se com o ruído e os picos de impurezas, sendo o gutiom o mais crítico no tempo de 17,5 min (Figura 18).

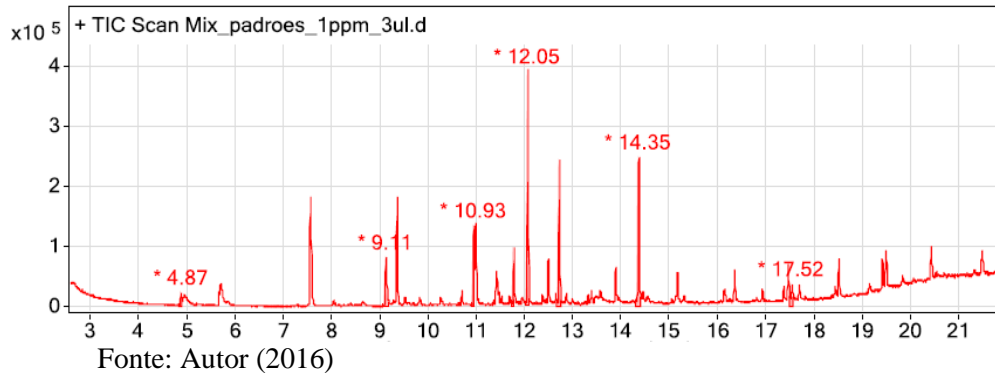
Figura 17 - Cromatograma obtido utilizando TI a 170°C, após injeção de 1 µL do mix de 1 mg L<sup>-1</sup> no modo TIC.



Fonte: Autor (2016)



Figura 18 - Cromatograma obtido utilizando TI a 240°C, após injeção de 3 µL do mix de 1 mg L<sup>-1</sup> no modo TIC.



Fonte: Autor (2016)

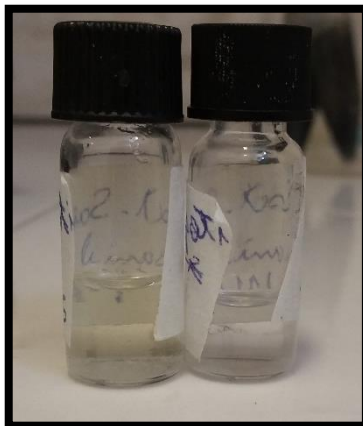
Portanto, a condição otimizada na Figura 16, com TI a 240°C e VI a 5 µL foi o mais adequado para a identificação e análise dos oito agrotóxicos em estudo, mostrando boa sensibilidade e seletividade mesmo para os compostos diclorvós e gutiom como será visto nas próximas seções.

### 5.3 Aplicação do método QuEChERS

Segundo os desenvolvedores do método QuEChERS, a acetonitrila é o solvente utilizado na etapa de extração em virtude de extrair agrotóxicos de diferentes polaridades, além de proporcionar um extrato com menor quantidade de coextrativos lipofílicos como ceras, gorduras e pigmentos oriundos da amostra (LEHOTAY *et al*, 2014). Contudo ainda assim esses interferentes podem estar presentes no extrato primário. Portanto, uma etapa de limpeza da amostra é essencial.

O uso de PSA na etapa de limpeza é muito oportuno devido à remoção de interferentes da matriz como ácidos graxos e alguns compostos polares. No entanto, esse produto químico é pouco eficiente na remoção de pigmentos, que podem afetar na análise cromatográfica dos analitos, além de diminuir a vida útil do equipamento. Sabendo disso, um reagente adicional no procedimento de limpeza foi acrescentado ao método QuEChERS citrato. O carvão ativo ou carbono grafitizado (GCB) foi adicionado juntamente com o PSA, afim de remover a pigmentação do extrato primário do sapoti. Tal remoção é evidenciada pela leve mudança de coloração do extrato final da amostra de amarelo pálido para incolor, como pode ser visto na Figura 19.

Figura 19 – Extratos obtidos pelo método QuEChERS sem a adição de GCB na etapa de clean up (à esquerda) e preparados com a adição de GCB (à direita).



Fonte: Autor (2016)

Segundo Wilkowska e Biziuk (2011), devido a estrutura planar do GCB, este pode adsorver analitos que apresentam sistemas cíclicos planares, promovendo perda de recuperação dos mesmos. Porém, como será visto na seção 5.7, o uso de carvão ativo não afetou na perda de exatidão dos compostos em estudo.

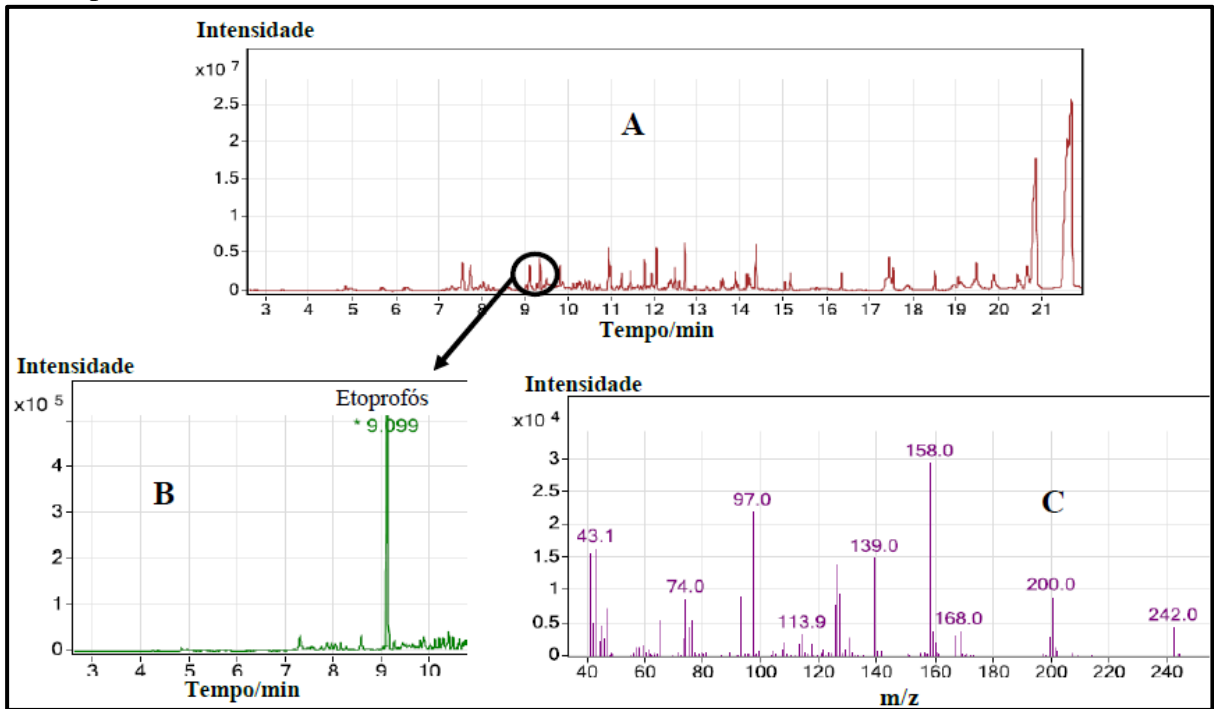
#### 5.4 Seletividade

O uso de modernos detectores de espectrometria de massa permite extrair o cromatograma do composto de interesse (cromatograma de íon extraído - IE) a partir do cromatograma de íons totais (TIC) desde que seja selecionado o correto fragmento do espectro de massa do analito alvo, obtendo-se assim, ganho de seletividade e sensibilidade.

A Figura 20 ilustra o ganho de seletividade para o composto etoprofós quando selecionado seus respectivos fragmentos. É possível observar que no modo TIC de monitoramento (Figura 20A), o método não confere seletividade adequada para os analitos, onde picos de vários componentes da matriz comprometem a resolução dos picos dos agrotóxicos. Contudo ao se utilizar o recurso de IE o método apresenta-se bastante seletivo para todos os agrotóxicos, por exemplo para o etoprofós na Figura 20B. A Figura 21 ilustra os espectros de massa e os cromatogramas de IE (indicados por setas ou círculos) para os demais agrotóxicos no extrato do sapoti.

Os espectros de massas para todos os analitos no extrato do sapoti no modo IE apresentaram mais que 95% de similaridade quando comparados com os obtidos da biblioteca do instrumento. Dessa forma, o modo IE foi utilizado tanto para a construção da curva de calibração na matriz, quanto para a análise qualitativa e quantitativa em amostras reais, como será visto mais adiante.

Figura 20 – (A) Cromatograma no modo TIC dos agrotóxicos na matriz do sapoti em concentração de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , (B) Cromatograma de IE para o etoprofós e (C) Espectro de massa do etoprofós.



Fonte: Autor, 2016.

Para fazer uso do modo IE, foram utilizados os fragmentos referente aos íons de quantificação (maior intensidade, conhecido como pico base) de cada composto, juntamente com seus respectivos íons de identificação, íons que auxiliam na confirmação do composto de interesse.

A Tabela 6 mostra o tempo de retenção ( $T_r$ ), os fragmentos utilizados para obter os IE de cada agrotóxico e os fragmentos empregados pela comunidade científica. Observa-se que os fragmentos escolhidos para gerar o IE de cada composto, assemelham-se com os obtidos da literatura, variando-se apenas os íons de confirmação. O Gutiom tem sido um composto pouco abordado na literatura para análises em CG, nenhum trabalho que estudou este analito foi encontrado durante a revisão para este trabalho.

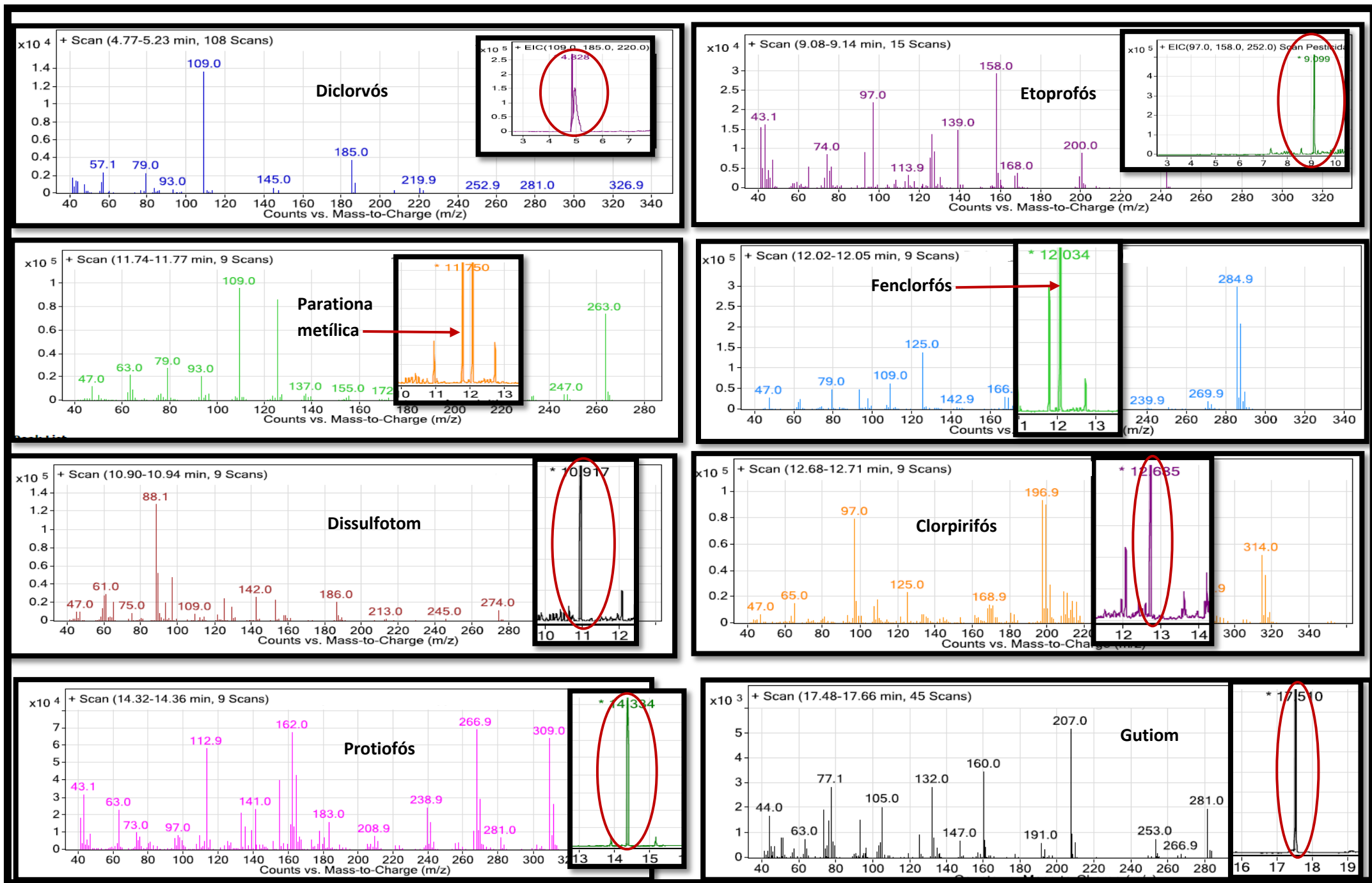
Tabela 6 – Tempo de retenção e fragmentos utilizados para obtenção do IE de cada agrotóxico

Agrotóxicos	T <sub>r</sub> /min	Fragmentos utilizados no estudo (m/z)	Fragmentos utilizados por Li <i>et al</i> (2014)	Fragmentos utilizados por Andrasciková e Hrouzková (2013)	Fragmentos utilizados por Lu <i>et al</i> (2013)
Diclovós	4,8	<u>109</u> , 185, 220	<u>109</u> , 185	-*	<u>109</u> , 185, 79
Etoprofós	9,1	<u>158</u> , 97, 242	-	-	<u>158</u> , 200, 139
Dissulfotom	10,9	<u>88</u> , 97, 274	<u>88</u> , 97	-	<u>88</u> , 186, 89
Parationa metílica	11,8	<u>109</u> , 125, 263	<u>109</u> , 125	<u>109</u> , 125, 263	<u>109</u> , 263, 79
Fenclorfós	12,0	<u>285</u> , 125, 320	-	-	<u>285</u> , 79, 320
Clorpirifós	12,7	<u>197</u> , 97, 349	-	<u>197</u> , 199, 314	<u>197</u> , 97, 314
Protiofós	14,3	<u>267</u> , 162, 344	<u>267</u> , 113	-	<u>267</u> , 113, 309
Gutiom	17,5	<u>207</u> , 160, 317	-	-	-

Fonte: Autor (2016)

\*(-) Não estudado pelo autor; Sublinhado é o pico base.

Figura 21 – Espectros de massa e cromatogramas de IE de cada agrotóxico. Obs: Os cromatogramas de IE estão indicados por setas ou círculos.



## 5.5 Efeito Matriz e Linearidade

Para o desenvolvimento de um método analítico, os possíveis efeito matriz na análise cromatográfica devem ser levados em consideração, visando comprovar a ausência ou a presença do fenômeno sobre a resposta do analito de maneira positiva ( $EM > 0$ ) ou negativa ( $EM < 0$ ). Para isso, foram feitas curvas analíticas utilizando o solvente puro apenas com os analitos e o solvente com os analitos na presença dos componentes do extrato da amostra, assim como descrito na subseção 4.4.1.

A Figura 22, ilustra as curvas de calibração no solvente e na matriz para cada agrotóxico com os respectivos valores do  $R^2$ , a equação da reta e o EM calculado de acordo com a equação 1. Não considerando a interferência da matriz na resposta cromatográfica para valores menores que 10% em módulo.

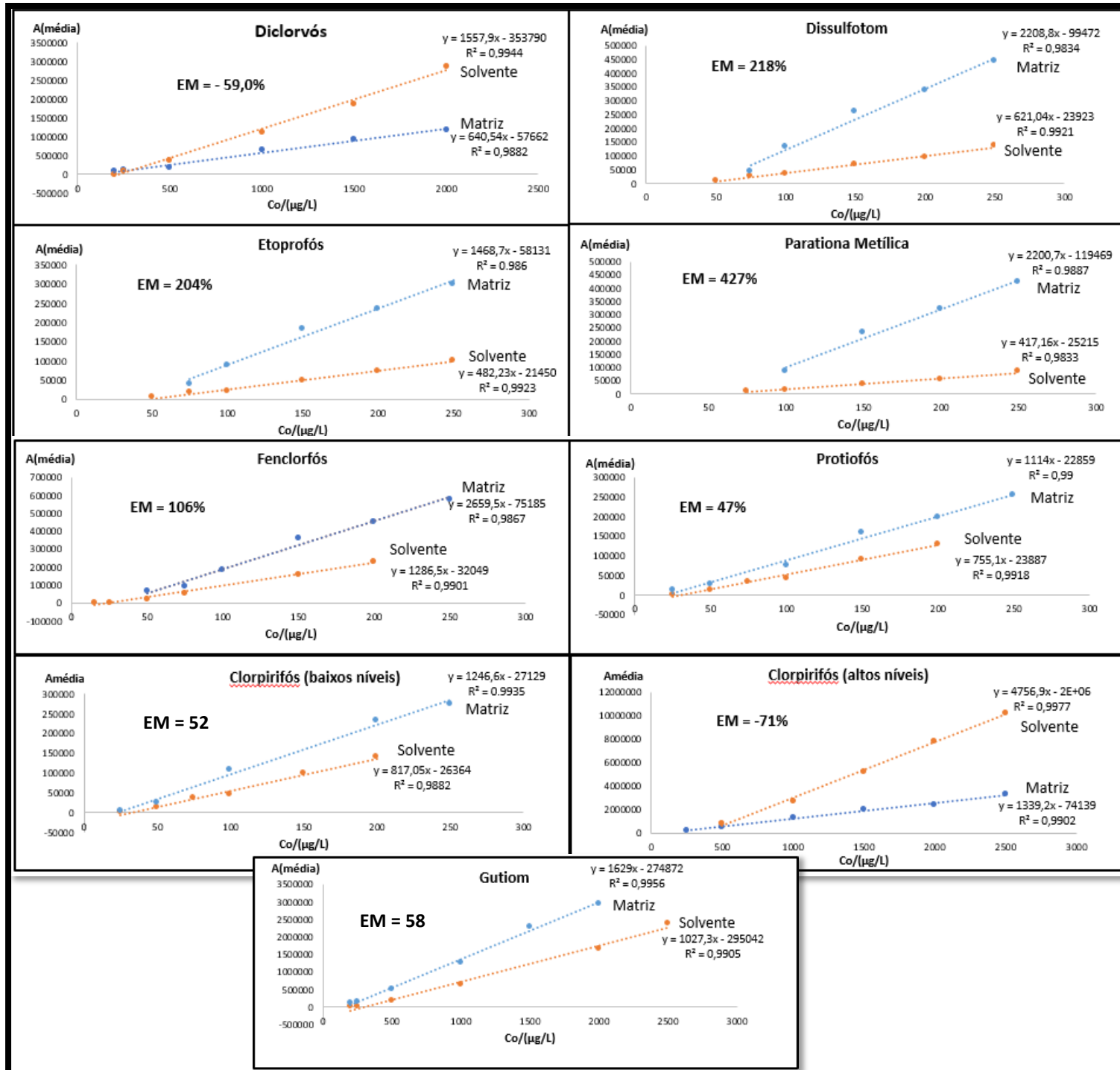
Devido a boa sensibilidade do Etoprofós, Dissulfotom, Parationa metílica, Fenclorfós, Clorpirifós e Protiofós, como será abordado na próxima seção, foi possível obter curvas de calibração em duas faixas de concentração, uma para baixos níveis e outra para altos níveis, contudo devido a maior importância do clorpirifós em relação aos demais, decidiu-se abordar ambas as faixas de concentração apenas para esse composto, utilizando-se a curva de concentração em baixos níveis para os anteriores.

Observa-se na Figura 22 que o menor valor de  $R^2$  é 0,9833 (curva no solvente da parationa metílica) dando um valor de 0,9916 de coeficiente de correlação (R), dessa forma, todos os analitos em ambas as curvas estão de acordo com as orientações da ANVISA e do INMETRO que recomendam R acima de 0,99 e 0,90, respectivamente.

No entanto, observa-se uma forte influência da matriz para todos os agrotóxicos, sobretudo para a parationa metílica que apresentou EM positivo de 427%. Ressalta-se ainda, que o clorpirifós apresentou efeito negativo para altos níveis de concentração e positivo quando se trabalha a baixos níveis. Como nenhum composto apresentou módulo do EM menor que 10%, utilizou-se a curva na matriz para realizar a quantificação dos agrotóxicos em amostras reais, evitando-se assim a análise dos analitos de forma equivocada.

Apesar dos valores de R estarem em concordância com os órgãos nacionais, este não deve ser o único parâmetro utilizado como critério de aceitação da linearidade da regressão, uma vez que para valores abaixo de 0,999 é possível que a curva apresente erros aleatórios significantes. Sendo assim, procedeu-se testes estatísticos para verificar a significância da regressão linear e dos parâmetros da curva.

Figura 22 – Curva no solvente e na matriz com seus respectivos valores de R<sup>2</sup>, EM e equação da reta para cada agrotóxico



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

Para verificar a veracidade da curva analítica aplicou-se o teste F, utilizando as equações 4 e 5 ( $F_{calc}$ ), como descrito na subseção 4.9.2. O teste foi aplicado apenas na curva da matriz, uma vez que esta foi a utilizada para a análise dos agrotóxicos em amostras reais. A Tabela 7 apresenta os valores referentes ao teste estatístico.

Tabela 7 – Teste de linearidade das curvas analíticas preparadas na matriz, considerando nível de significância de 95% para o valor de  $F_{tab}$

<b>Agrotóxico</b>	<b><math>F_{calculado}</math></b>	<b><math>F_{tabelado}</math></b>	<b>Teste F</b>
Diclorvós	334	6,39	significante
Etoprofós	210	9,28	significante
Dissulfotom	624	6,39	significante
Parationa metílica	251	9,28	significante
Fenclorfós	755	5,05	significante
Clorpirifós (curva baixa)	790	6,39	significante
Clorpirifós (curva alta)	402	6,39	significante
Protiofós	396	6,39	significante
Gutiom	914	6,39	significante

Fonte: Autor (2016)

Como o  $F_{calculado} > F_{tabelado}$ , pode-se concluir, que a existência de relação linear entre as variáveis  $x$  e  $y$  foi altamente significativa para todos os agrotóxicos na matriz da amostra. No geral, quando a regressão é significativa, ocorre um elevado valor de  $F_{calculado}$ , como neste estudo, uma vez que a variação nos valores de  $y$ , decorrentes da relação linear, possivelmente será maior que os resíduos (somatório dos desvios ou somatório dos erros) (SKOOG, 2010).



### 5.5.2 Teste de significância dos parâmetros de calibração

Uma vez que todas as curvas preparadas na matriz apresentaram-se significantes, estas idealmente deveriam passar pela origem (LIGIERO *et al*, 2009), entretanto, tal fato não foi observado. Dessa forma, levou-se em consideração o valor dos desvios referentes a cada parâmetro das equações das retas – coeficientes lineares (a) e angulares (b).

Os resultados da análise estatística dos parâmetros das curvas analíticas na matriz (Tabela 8), obtidas de acordo com as equações 2, 3 e 5 ( $t_{cal,a}$  e  $t_{cal,b}$ ), evidenciam que todos os coeficientes angulares são significativos ( $t_{cal} > t_{tab}$ ), por outro lado, os coeficientes lineares das curvas dos compostos diclorvós, fenclorfós, clorpirifós (alta e baixa) e protiofós, apresentaram-se não significativos estatisticamente ( $t_{tab} > t_{cal}$ ), podendo-se desconsiderar o valor deste parâmetro mesmo a reta da curva não passando pela origem. Dessa forma, para a quantificação dos agrotóxicos em amostras reais, utilizou-se a equação da reta apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados do teste estatístico de significância dos parâmetros das curvas de calibração preparadas na matriz, considerando nível de significância de 95% para o valor de  $t_{tab}$

Agrotóxico	Coeficiente linear					Coeficiente angular					Curva analítica final
	a	$s_a$	$t_{cal}$	$t_{tab}$	Teste t	b	$s_b$	$t_{cal}$	$t_{tab}$	Teste t	
Diclorvós	-57662,2	39448,26	1,46	2,776	não significativa	640,5	35,04	18,25	2,776	significante	$y = 640,5x$
Etoprofós	-58131,20	16968,62	3,43	3,182	significante	1468,65	101,18	14,50	3,182	significante	$y = -58131,2 + 1468,65x$
Dissulfotom	-66460,92	20204,78	3,29	2,776	significante	1978,09	79,19	24,97	2,776	significante	$y = -66460,92 + 1978,09x$
Parationa metílica	-171072,98	45396,46	3,77	3,182	significante	2591,80	163,60	15,84	3,182	significante	$y = -171072,98 + 2591,80x$
Fenclorfós	-42710,89	20671,92	2,07	2,571	não significativa	2397,25	87,23	27,47	2,571	significante	$y = 2397,25x$
Clorpirifós (curva baixa)	-15330,72	9952,23	1,54	2,776	não significativa	1134,20	40,32	28,11	2,776	significante	$y = 1134,20x$
Clorpirifós (curva alta)	-74139,40	101321,25	0,73	2,776	não significativa	1339,22	66,78	20,04	2,776	significante	$y = 1339,22x$
Protiofós	-22859,15	8492,14	2,69	2,776	não significativa	1114,02	55,97	19,89	2,776	significante	$y = 1114,02x$
Gutiom	-274872,13	60664,97	4,53	2,776	significante	1628,99	53,89	30,21	2,776	significante	$y = -274872,13 + 1628,99x$

Fonte: Autor (2016)

### 5.6 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os valores estimados de LD's e LQ's dos pesticidas na matriz do sapoti, convertidos para relação massa/massa ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), são mostrados na Tabela 9, assim como os LMR's dos agrotóxicos em diferentes culturas de acordo com a ANVISA e a Comissão Europeia (EC). De maneira que os valores de LD representam as menores concentrações dos compostos na amostra do fruto que o método é capaz de detectar, enquanto que o LQ são as menores concentrações dos compostos na amostra que o método é capaz de quantificar com confiabilidade.

Tabela 9 – Limites de detecção e quantificação do método para os agrotóxicos estudados com os respectivos LMR's.

Agrotóxico	LD/(mg/kg)	LQ/(mg/kg)	Culturas autorizadas com os respectivos LMR/(mg/kg) entre parênteses	
			ANVISA	EC
Clorpirifós	0,010	0,017	Citros (2,00), Maçã (1,00), Tomate (0,5), Feijão (0,1), Café (0,05)	Maçã (0,5), Pera (0,5), Uva (0,5), Abacaxi (0,3), Banana (3,0), Morango (0,5) e Manga (0,05)
Diclorvós	0,07	0,14	-*	Citros (0,01), Maçã (0,01), Uva (0,01) e Morango (0,01)
Dissulfotom	0,03	0,05	Agodão (0,2), Café (0,1)	-
Etoprofós	0,03	0,05	Batata (0,05)	Banana (0,03) e Abacaxi (0,03)
Fenclorfós	0,010	0,03	-	-
Gutiom	0,07	0,14	-	Cajú (0,5)
Parationa-metflica	0,03	0,07	Algodão (0,3), Soja (0,1)	-
Protiofós	0,010	0,017	Algodão (0,04), Soja (0,03), Tomate (1,0)	-

\*(-) Não informado

Os compostos clorpirifós e o protiofós mostraram-se os mais sensíveis para o método utilizado, apresentando os mais baixos valores de LQ's, por outro lado, o diclorvós e gutiom apresentaram-se como os menos sensíveis. Nenhuma das duas legislações utilizadas nesse trabalho (ANVISA e EC) indicam os compostos avaliados para a cultura do sapoti, conseqüentemente não há LMR's disponíveis na literatura para esta fruta. Contudo, ao comparar os LD's e LQ's dos agrotóxicos com os LMR's atribuídos a outras culturas, pode-se concluir que, de maneira geral, os LQ's são menores que os LMR's, podendo-se

empregar o método na determinação de resíduos de agrotóxicos não permitidos para essa cultura, além de o método QuEChERS, poder ser avaliado e aplicado na determinação de agrotóxicos em outras culturas. Apenas os agrotóxicos diclorvós e etoprofós não apresentaram LQ's menores que os LMR's das legislações.

### 5.7 Exatidão e precisão

Para a escolha dos níveis de fortificação no estudo de exatidão, foram levados em consideração diferentes fatores, como:

- a) as diferentes sensibilidades do método para os agrotóxicos. Um nível de fortificação considerado elevado para um agrotóxico, pode ser baixo para outro, como no caso do clorpirifós e gutiom;
- b) a faixa de linearidade das curvas analíticas na matriz. De maneira que 70% do menor nível de concentração de um composto e 120% do seu maior nível, não fiquem fora do intervalo linear da curva;
- c) a quantidade de injeções cromatográficas obtidas. Pois o estudo de recuperação foi realizado em triplicata biológica e duplicata de injeção, de maneira que cada nível de contaminação contribui para seis injeções cromatográficas, portanto tentou-se obter a menor quantidade de pontos de fortificação possível que abrangesse os três níveis de concentração (baixo, médio e alto) para todos os analitos em estudo.

Dessa forma, 6 níveis de contaminações intencionais da amostra foram escolhidos variando-se de 0,08 a 1,17 mg kg<sup>-1</sup> (valores convertidos para relação massa/massa). Os resultados dos percentuais recuperados dos agrotóxicos associados aos seus respectivos desvios padrão, apresentam-se na Tabela 10. De modo geral, é observado que o percentual de recuperação entre os níveis de fortificação variou de 42,3 a 170,76 %. No entanto, quando se compara com os critérios de aceitação da ANVISA, que estabelece recuperações entre 70 a 120% com desvio padrão aceitável de  $\pm 20\%$  para métodos multirresíduos, todos os analitos estudados apresentaram no mínimo três níveis de concentração com percentuais recuperados dentro dos limites aceitos pela legislação.

É importante considerar, ainda, que a exatidão é bastante dependente do nível de concentração dos analitos na amostra, em casos em que os analitos encontram-se a níveis mais baixos e onde haja complexidade da matriz, uma faixa de valores de recuperação mais ampla pode ser aceitável, como 50 a 120% com desvio padrão de  $\pm 15\%$  (RIBANI et al,

2004). Neste caso, as recuperações dos agrotóxicos para a maioria dos pontos estão dentro dos limites aceitáveis.

A Tabela 10 também fornece a precisão em termos do coeficiente de variação (CV/%) obtida pelo método da repetitividade. De acordo com as orientações da ABNT e da *European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General*, na avaliação de métodos cromatográficos, é admitido um valor máximo de CV/%, respectivamente de 23 e 20%. Dessa forma, todos os agrotóxicos apresentam-se dentro do limite recomendado quando considerado a legislação brasileira, e quando considerado o limite europeu, apenas o gutiom apresentou precisão insatisfatória com 21,68%.

Tabela 10 – Percentuais de recuperação dos agrotóxicos em seis níveis de fortificação com seus respectivos desvios padrão e precisão em termos do CV.

Agrotóxicos	Recuperação (%)						Precisão (CV/%)
	Nível de fortificação/(mg kg <sup>-1</sup> )						
	0,08	0,10	0,14	0,17	0,35	1,17	
Diclorvós	-	-	-	71,29 ± 2,9	75,5 ± 7,4	104,2 ± 13,1	9,35
Etoprofós	112,7 ± 3,4	90,1 ± 5,0	118,7 ± 1,07	156,1 ± 9,9	109,18 ± 12,36	102,8 ± 20,4	10,94
Dissulfotom	42,3 ± 2,00	91,3 ± 28,3	78,86 ± 9,25	170,76 ± 59,1	104,15 ± 14,53	164,3 ± 11,22	16,84
Parationa metílica	-	85,25 ± 7,5	77,34 ± 20,9	85,80 ± 5,59	111,56 ± 6,68	114,17 ± 3,98	12,27
Fenclorfós	63,7 ± 7,9	70,34 ± 4,28	85,9 ± 4,14	67,89 ± 15,14	84,0 ± 7,4	95,08 ± 3,36	5,63
Clorpirifós	64,16 ± 12,21	75,97 ± 2,61	70,09 ± 1,58	66,90 ± 4,9	92,92 ± 17,61	87,61 ± 11,07	7,02
Protiofós	66,8 ± 3,01	70,58 ± 2,5	69,46 ± 2,5	75,02 ± 3,87	101,15 ± 22,5	102,3 ± 14,1	8,05
Gutiom	-	-	-	122,0 ± 0,95	75,89 ± 10,45	106,77 ± 18,89	21,68

Fonte: Autor, 2016.

## 5.8 Análises qualitativas e quantitativas de amostras de sapoti da cidade de Fortaleza-CE

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em dez amostras de frutas de sapoti comercializadas em supermercados de diferentes pontos (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 e P10) da cidade de Fortaleza-CE, e em amostras de polpas da fruta de três diferentes marcas (M1, M2 e M3), assim como descrito na seção 4.6.

Dos agrotóxicos estudados, apenas o clorpirifós foi detectado, contudo este esteve presente em 70% das amostras de frutas avaliadas e em uma das três marcas de polpas comerciais. Dentre os organofosforados este é o ingrediente ativo mais conhecido pela comunidade agricultora. Devido seu amplo espectro de utilização, pode ser utilizado como formicida, acaricida e inseticida, por isso é indicado pelas legislações para aplicações em várias culturas (University of Hertfordshire DataBase, 2016).

A Tabela 11 fornece os níveis encontrados do agrotóxico nas amostras e as respectivas similaridades dos espectros de massas. Vale salientar que não existe limite máximo de resíduo permitido para esse agrotóxico associado a cultura do sapoti, no entanto os resultados mostram que quando comparados com os LRM's de outras culturas os níveis encontrados nos pontos P6, P7 e P10 apresentam-se irregulares aos de vários alimentos. Destacando-se a amostra da fruta obtida no supermercado em P6 que mostrou o maior nível de resíduo obtido.

Fazendo-se um comparativo com o IDA do clorpirifós de acordo com a EC ( $0,001 \text{ mg kg}^{-1}$ ), uma pessoa de 60 kg poderia consumir até 0,06 mg deste agrotóxico por dia, sabendo-se que em média uma fruta de sapoti comercializada em supermercados apresenta uma massa de 0,080 kg, uma fruta proveniente do supermercado localizado no P6 teria resíduos de clorpirifós (0,05 mg) suficiente para quase alcançar limite diário aceitável dessa pessoa. Sabe-se que o clorpirifós apresenta classificação toxicológica de nível II, em mamíferos atua inibindo a enzima colinesterase causando efeitos neurotóxicos, além de problemas associados a reprodução (VENUGOPAL, SUMALATHA e BONTHULA, 2012).

Os resultados indicam o uso indiscriminado do agrotóxico por parte de alguns agricultores, possivelmente devido à falta de informação e também de fiscalização dos órgãos competentes uma vez que a produção de sapoti se deve principalmente para o abastecimento do mercado interno (BANDEIRA *et al*, 2003). Necessita-se, portanto, ser ampliado os estudos na referida fruta e a inclusão desta cultura nas avaliações dos órgãos nacionais como a ANVISA e o INMETRO.

Com relação as amostras P3, P4 e P8 os resultados obtidos são inferiores aos menores valores de LMR's estabelecidos pela ANVISA (no café) e EC (na manga), estando dentro do padrão estabelecido quando comparado com outras culturas. As baixas similaridades do espectro de massa nas amostras P4 e P8 podem estar associados aos baixos níveis encontrados, próximos ao LD do agrotóxico. A Figura 23 ilustra os cromatogramas de algumas amostras, onde foi utilizado o recurso de IE para a realização da análise quantitativa.

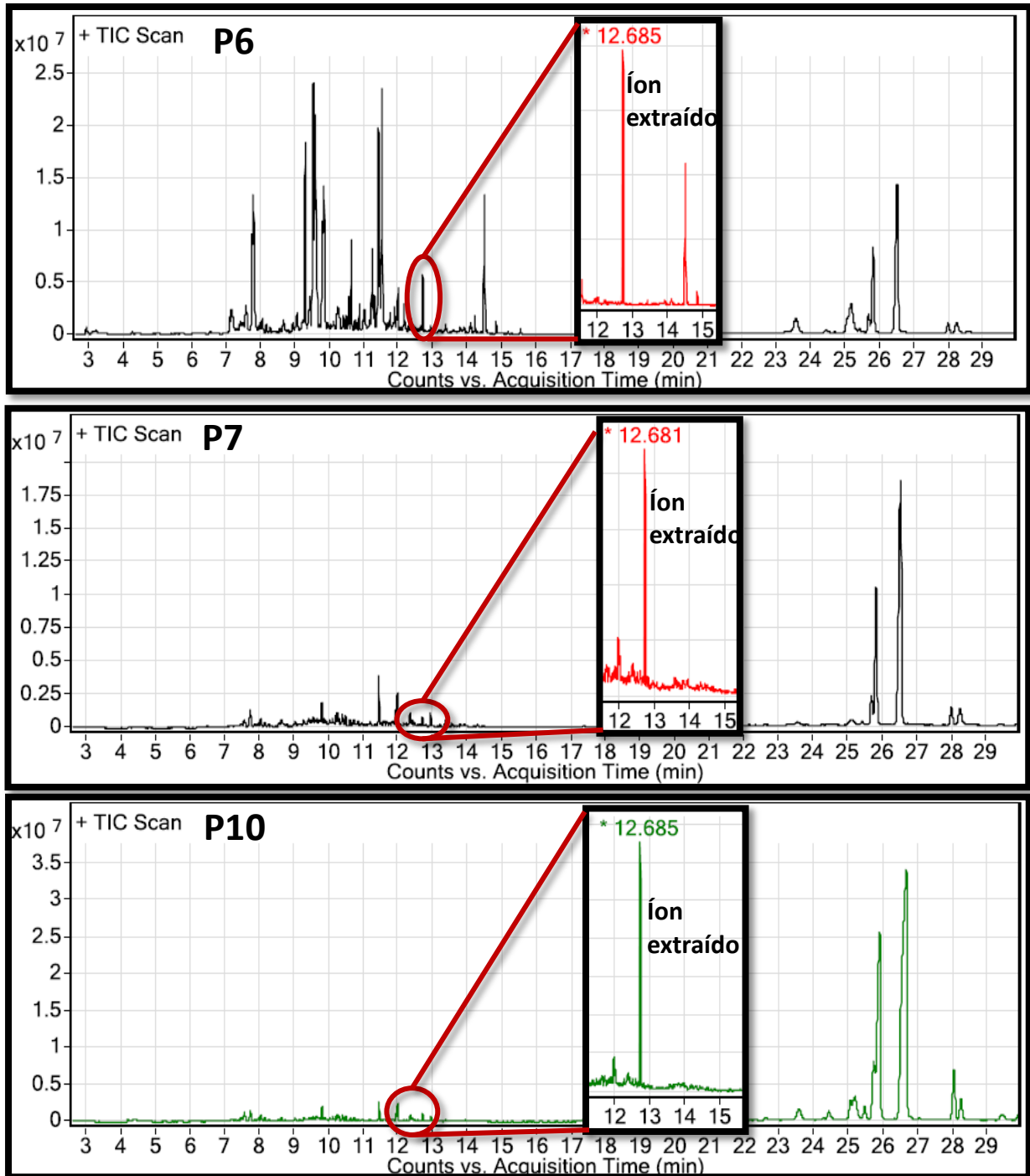
Tabela 11 – Resultados das análises das amostras de frutas e polpas de sapoti.

Concentração/(mg kg <sup>-1</sup> )		Similaridade/%
<b>P1</b>	<LD	-
<b>P2</b>	<LD	-
<b>P3</b>	0,025 ± 0,004	43
<b>P4</b>	0,020 ± 0,003	5,13
<b>P5</b>	0,030 ± 0,003	96
<b>P6</b>	0,63 ± 0,031	90
<b>P7</b>	0,08 ± 0,002	92
<b>P8</b>	0,011 ± 0,006	1,66
<b>P9</b>	<LD	-
<b>P10</b>	0,12 ± 0,004	93
<b>M1</b>	<LD	-
<b>M2</b>	<LD	-
<b>M3</b>	0,06 ± 0,002	88
<b>LMR/(mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>ANVISA</b>	Citros (2,00), Maçã (1,00), Tomate (0,5), Feijão (0,1), Café (0,05)
	<b>EC</b>	Maçã (0,5), Pera (0,5), Uva (0,5), Abacaxi (0,3), Banana (3,0), Morango (0,5) e Manga (0,05)
<b>IDA/(mg kg<sup>-1</sup>p.c)</b>	<b>ANVISA</b>	0,01
	<b>EC</b>	0,001

Fonte: Autor (2016).



Figura 23 – Cromatogramas no modo TIC de algumas amostras. Em destaque é apresentado o cromatograma de íon extraído para o clorpirifós.



Fonte: Autor (2016)

## 6 CONCLUSÕES

Devido à fase de diluição hexano/acetona (9:1) do padrão mix primário dos pesticidas ( $2\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$ ) ser pouco polar, este não mostrou ser adequado para análises por CL. Quando foi utilizado o CG-EM, as condições cromatográficas otimizadas demonstraram ser satisfatória por obter separação de compostos (com boa resolução) em um tempo de corrida menor que 20 minutos. Nessas condições, o método em desenvolvimento demonstrou ser seletivo e sensível quando utilizado o recurso de IE para os compostos em estudo, mesmo havendo pequena degradação do diclorvós. Contudo, os agrotóxicos etoprofós e diclorvós não apresentaram LQ's menores que os LMR's das legislações.

O uso de GCB na etapa de clean up possibilitou maior limpeza do extrato para análise, evitando com isso possíveis interferentes e prevenindo quanto aos danos que o extrato não limpo poderia causar no sistema cromatográfico. O método mostrou-se ainda exato, com recuperações dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA para, pelo menos, três níveis de fortificações, mesmo utilizando GCB no preparo de amostra.

O efeito matriz se pronunciou de forma significativa para todos os agrotóxicos, contudo utilizou-se curvas preparadas na matriz para a quantificação dos analitos. As curvas analíticas apresentaram-se lineares, com os valores de R maiores que 0,99, além dos testes estatísticos de significância mostrarem um bom ajuste linear entre os pontos da curva na matriz.

As análises em amostras reais demonstram o elevado uso de produtos comerciais que contém o ingrediente ativo clorpirifós por parte de alguns agricultores, este agrotóxico foi encontrado em nível elevado na amostra do ponto 6, onde foi preciso a utilização da curva em altos níveis de concentração para quantificar este analito. O uso elevado deste agrotóxico demonstra a falta de informação dos produtores, havendo a necessidade de inclusão desta cultura nas avaliações dos órgãos governamentais.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Guia para o controle da qualidade para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos para os laboratórios integrados do PARA**. Brasília, 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Monografias de agrotóxicos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>>. Acesso em: nov. de 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA: **Resolução nº 899, 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.

AGROLINK FITO. Disponível em: <[http://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/artigo/pragas-causam-perdas-de-ate-r--55-bilhoes-a-agricultura-no-brasil\\_220429.html](http://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/artigo/pragas-causam-perdas-de-ate-r--55-bilhoes-a-agricultura-no-brasil_220429.html)>. Acesso em: 03 out.2015.

AKOTO, O *et al.* Estimation of human health risk associated with the consumption of pesticide-contaminated vegetables from Kumasi. **Ghana. Environ Monit Asses**, p. 187-244, 2015.

ALBERT, A. *et al.* Rapid and quantitative analysis of pesticides in fruits by QuEChERS pretreatment and lowtemperature plasma desorption/ionization orbitrap mass spectrometry. **Anal. Methods**, v. 6, p. 5463-5471, 2014.

AMÁLIA, G. G. D. *et al.* Novas Tendências em Preparo de Amostras para Cromatografia Líquida. **Scientia Chromatographica**, v.2, n. 3, p. 19-29, 2010.

AMELIN, V. G. Determination of Polar Pesticides in Water, Vegetables, and Fruits by High Performance Liquid Chromatography. **Moscow University Chemistry Bulletin**, v. 67, n. 6, p.275-282, 2012.

ANDRASCIKOVA, M.; HROUZKOVA, S. A comparative study of three modifications of the QuEChERS method for determination of endocrine disrupting pesticide residues in lemon matrices by fast GC-MS. **Analytical Methods**, v.5, p. 1374-1384, 2013.

ANDRASCIKOVAAB, M.; HROUZKOVA, S.; CUNHA, S. C. Combination of QuEChERS and DLLME for GC-MS determination of pesticide residues in orange samples. **Food Additives & Contaminants**, v. 30, n. 2, p. 286-297, 2013.

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

ANDRASCIKOVA, M.; HROUZKOVA, S. A comparative study of three modifications of the QuEChERS method for determination of endocrine disrupting pesticide residues in lemon matrices by fast GC-MS. **Analytical Methods**, v.5, p. 1374-1384, 2013.

AQUINO, A.; NAVICKIENE, S. MSPD Procedure for Determination of Carbofuran, Pyrimethanil and Tetraconazole Residues in Banana by GC-MS. **Chromatographia**, v. 70, n. 7/8, p. 1265–1269, 2009.

BARRETO A. S. et al. A novel application of mesoporous silica material for extraction of pesticides. **Materials Letters**, v. 65, p. 1357–1359, 2011.

BLASCO et al. Analysis of insecticides in honey by liquid chromatography–ion trap-mass spectrometry: Comparison of different extraction procedures. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 4892-4901, 2011.

BORGES, K., B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. (2015). Preparo de amostra para análise de compostos orgânicos. 1ª ed. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos.

BOTERO-COY, A. N. et al. Exploring matrix effects in liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of pesticide residues in tropical fruits, Berlim, **Anal Bioanal Chem**, v. 407, p. 3667-3681, 2015

BRITO N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **R.Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129 – 146, 2003.

BANDEIRA C. T. *et al.* O cultivo do sapatizeiro. **Circular Técnica**, Fortaleza, Agosto 2003.

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

BRASIL.MMA.MEC.IDEC. CONSUMO SUSTENTÁVEL: MANUAL DE EDUCAÇÃO, 2005.

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

CARDOSO DA SILVA, J. C. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de microcistina-LR e agrotóxicos em águas superficiais, utilizando as técnicas de cromatografia líquida e cromatografia gasosa acopladas a espectrometria de massas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto-MG, 2010.

CAVALIERE, M. J. *et al.* Miotoxicidade por organofosforados. **Rev. Saúde Pública**, v. 30, n. 3, p. 267-272, 1996.

CEVERA, M. I. Application of gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for target and non-target analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1244, p. 168– 177, 2012.

CHANDRA, S.; MAHINDRAKAR, A. N.; SHIND L. P. Gas Chromatography-Mass Spectrometry determination of Pesticide Residue in Fruits. **Journal of ChemTech Research**, v. 6, n. 1, p. 124-130, 2014.

CHEN, M. et al. Quantitative Analysis of Neonicotinoid Insecticide Residues in Foods: Implication for Dietary Exposures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 6082–6090, 2014.

CHEN, Y et al. Sample preparation. **J. Chromatography A**, v. 1184, p. 191-219, 2008.  
CHERTA, L. et al. Application of gas chromatography–(triple quadrupole) massspectrometry with atmospheric pressure chemical ionization for thedetermination of multiclass pesticides in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v.1314, p. 224-240, 2013.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O Estado da Arte da Cromatografia Associada à Espectrometria de Massas Acoplada à Espectrometria de Massas na Análise de Compostos Tóxicos em Alimentos. **Quím. Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHRISTIA, C et al. Pesticide residues in fruit samples: comparison of diferente QuEChERS methods using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Environ Sci Pollut Res**, Berlin, 2015.

CIESLIK, E. et al. Evaluation of QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in selected groups of fruits. **Food Chemistry**, v. 125, p. 773-778, 2011.

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

COLEÇÃO PLANTAR – Sapoti. **Embrapa Informações Tecnológicas**, Brasília, 2005.

COSTA, F. P.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in canned and fresh peach. **Food Chemistry**, v. 165, p. 587-593, 2014.

DAYANA DOS SANTOS M. et al. Matrix Effect on Butyltin Analysis of Sediments and Fish Tissues by GC-PFPD. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 24, n. 6, p. 998-1005, 2013.

DIONÍSIO A. G. G. et al. Novas Tendências em Preparo de Amostras para Cromatografia Líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 3, p. 19-29, 2010.

DOMINGUES, V. F. et al. Organochlorine Pesticide Residues in Strawberries from Integrated Pest Management and Organic Farming. **J. Agric. Food Chem**, v. 59, p. 7582-7591, 2012.

DOMINGUES, V. F. et al. The development and optimization of a modified single-drop microextraction method for organochlorine pesticides determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Microchim Acta**, v. 178, p. 195-202, 2012.

EDIÇÃO ESPECIAL – Agrotóxicos. **Brasil de Fato**, São Paulo, junho 2012.

EUROPEAN COMMISSION – EC. **European Union Pesticides database**. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN>>. Acesso em: nov. de 2015.

FERNANDES, V. C. et al. Organochlorine pesticide residues in strawberries from integrated pest management and organic farming. **Food Chemistry**, v. 59, p. 7582 – 7591, 2011.

GRIMALT, S. et al. Quantification, confirmation and screening capability of UHPLC coupled to triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry in pesticide residue analysis. **J. Mass. Spectrom**, v. 45, p. 421–436, 2010.

GUEDES, J. A. C. et al. Matrix effect in guava multiresidue analysis by QuEChERS method and gas chromatography coupled to quadrupole mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 199, p. 380-386, 2016.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 8ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2013.

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

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

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos de analíticos**. Revisão 04, 2003.

JANYANTHI, P. D. K.; VERGHESE, A. Sapodilla seed borer, *Trymalitis margaritas* Meyrick: an invasive or indigenous species?. **Pest Management in Horticultural Ecosystems**, v. 16, n. 2, p. 141-147, 2010.

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

JUNIOR et al. O Sapotizeiro no Brasil. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 36, n. 1, p. 86-99, 2014.

LAGUNAS-ALLUE, L.; SANZ-ASENSIO, J.; MARTÍNEZ-SORIA, M. T. Response surface optimization for determination of pesticide residues in grapes using MSPD and GC-MS: assessment of global uncertainty. **Anal Bioanal Chem**, v. 398, p. 1509–1523, 2010.

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

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

- LEHOTAY, S. J. et al. Use of ammonium formate in QuEChERS for high-throughput analysis of pesticides in food by fast, low-pressure gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1358, p. 75-85, 2014.
- LEMOS M.F. et al. Monitoring of organophosphorous pesticide residues in samples of banana, papaya, and bell pepper. **Química Nova**, Espírito Santo, v. 38, n. 2, p. 268-273, 2015.
- LORENZ, J. G. et al. Multivariate Optimization of the QuEChERS-GC-ECD Method and Pesticide Investigation Residues in Apples, Strawberries, and Tomatoes Produced in Brazilian South. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 25, n. 9, p. 1583-1591, 2014.
- LI Y. F. et al. Determination of multiple pesticides in fruits and vegetables using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method with magnetic nanoparticles and gas chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1361, p. 77-87, 2014.
- LIGIERO, C. B. P. et al. Comparação entre métodos de quantificação em cromatografia gasosa: um experimento para cursos de química. **Química Nova**, v. 32, p. 1338-1341, n. 5, 2009.
- LU, D. et al. A fast and easy GC-MS/MS method for simultaneous analysis of 73 pesticide residues in vegetables and fruits. **Analytical Methods**, v. 5, p. 1721-1732, 2013.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Garantia de Qualidade Analítica: Resíduos e Contaminantes em alimentos**. Brasília, 2011.
- MARTINS, G. L. **Determinação de resíduos de pesticidas em solo de lavoura de arroz irrigado empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS**. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- MENEZES FILHO A.; NEVES DOS SANTOS, F.; PEREIRA, P. A. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. **Talanta**, v. 81, p. 346-354, 2010.
- MIRANDA, M. R. A. et al. Caracterização físico-química e histológica do desenvolvimento de sapoti. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 39, n.4, p. 575-582, 2008.
- MORAIS, P. L. D. et al. Alterações físicas, fisiológicas e químicas durante o armazenamento de duas cultivares de sapoti. **Pesq. agropec. Bras.**, v. 41, n. 4, p. 549 - 554, 2006.
- NASCIMENTO, V. E. et al. Caracterização física e química de frutos de mamey. **Rev. Bras. Frutic.** Jaboticabal, SP, v. 30, n. 4, p. 953-957, dez. 2008.
- ORSO, D. **Determinação de resíduos de agrotóxicos em mel empregando QuEChERS modificado e GC-ECD**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2011.

PANO-FARIAS, N. S et al. Supercritical fluid chromatography with photodiode array detection for pesticide analysis in papaya and avocado samples. **Separation Science**, v. 38, n. 7, p. 1240-1247, 2015.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. Tradução da 4ª ed. Norte-americana. 1 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PAZ, M. S. O. et al. Validation of QuEChERS method for organochlorine pesticides analysis in tamarind (*Tamarindus indica*) products: Peel, fruit and commercial pulp. **Food Control**, v. 54, p. 374-382, 2015.

PERES, F e MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

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

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620 – 1634, 2009.

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

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

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

QUEIROZ, A. J. M. et al. Caracterização físico-química da polpa de sapoti oriunda do estado do Ceará. **Revista Verde**, Mossoró, v. 7, n. 1, p. 45 – 48, 2012.

RAMOS, J. J.; GOZÁLEZ, M. J.; RAMOS, L. Comparison of gas chromatography-based approaches after fast miniaturised sample preparation for the monitoring of selected pesticide classes in fruits. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7307–7313, 2009.

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

RODRIGUES DA SILVA, J. **Impactos socioambientais causados pelo uso de agrotóxicos em plantações de abacaxi no município de Itapororoca/PB**. Monografia (Graduação em Geografia) – Universidade Estadual da Paraíba, Guarabira-PB, 2013.

SABIK, H. et al. Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. **Journal of chromatography A**, Canada, n. 885, p. 217 – 236, 2000.



SANCHES, S. M. et al. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 53 – 58, 2003.

SANTIAGO DA SILVA, C. N. et al. The role of matrix effects on the quantification of abscisic acid and its metabolites in the leaves of *Bauhinia variegata* L. using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. **Brazilian society of plant physiology**, v. 24, n. 3, p. 223-232, 2012.

SANTOS DE OLIVEIRA, V.; AFONSO, M. R. A.; CORREIA DA COSTA, J.M. Caracterização físico-química e comportamento higroscópico de sapoti liofilizado. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 342-348, 2011.

SAVOY, V. L. T. Classificação dos agrotóxicos. **Biológico**, v.73, n.1, p. 91-92, 2011.

SEEBUNRUENG, K.; SANTALADCHAIYAKIT, Y.;SRIJARANAI, S. Vortex-assisted low density solvent liquid–liquid micro extraction and salt-induced demulsification coupled to high performance liquid chromatography for the determination of five organophosphorus pesticide residues in fruits. **Talanta**, Tailândia, n. 132, p. 769-774, 2015.

SHOEIBI, S. et al. Spiked Calibration Curve: A Valid Method for Simultaneous Analysis of Pesticides in Melon Using Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS). Iran. **J. Chem. Chem. Eng.**, v. 33, n. 3, p. 21-27, 2014.

SILVA, R. O., CASTRO, R. C., MILHOME, M. A. L., & NASCIMENTO, R. F. Liquid chromatography–electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for determination of twenty multi-class pesticide residues in cashew. **LWT – Food Science and Technology**, 59, 21–25, 2014.

SILVA, A. P.; ALVES, C. C. Como iniciar a validação de métodos analíticos. In: CONGRESSO E FEIRA DA QUALIDADE EM METROLOGIA REDE METROLÓGICA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo: USP 2006. p 8-15.

SKOOG et al. **Fundamentos de química analítica**. Tradução da 8ª ed. Norte-americana. 1 ed., São Paulo: Cengage Learning, 2010.

TANG, Q. et al. Simultaneous determination of ten organophosphate pesticide residues in fruits by gas chromatography coupled with magnetic separation. **J. Sep. Sci.**, v.37, p.820-827, 2014.

TUAN, S. J. et al. Multiresidue Analysis of 176 Pesticides and Metabolites in Pre-harvested Fruits and Vegetables for Ensuring Food Safety by Gas Chromatography and High Performance Liquid Chromatography. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 17, n. 3, p. 163-177, 2009.

TURGUT, C; ORNEK, H.; CUTRIGHT, T. J. Determination of pesticide residues in Turkey's table grapes: the effect of integrated pest management, organic farming, and conventional farming. **Environ Monit Assess**, v. 173, p. 315–323, 2011.

UNIVERSITY OF HERFORDSHIRE. **Pesticide Properties DataBase – PPDB**. Disponível em: < <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>>. Acesso em: nov. de 2016.

VENUGOPAL, N. V. S.; SUMALATHA, B.; BONTHULA, S. R. Determination of Chloropyrifos in Fruits and Vegetables by using Analytical Techniques. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 979-985, 2012.

WAICHMAN, A. V. A problemática do uso de agrotóxicos no Brasil: a necessidade de construção de uma visão compartilhada por todos os atores sociais. **Rev. bras.Saúde ocup**, n. 37, v. 125, p. 17-50, 2012.

WANWIMOLRUK, S. et al. Food safety in Thailand 1: it is safe to eat watermelon and durian in Thailand. **Environ Health Prev Med**. V. 20, p.204-215, 2015.

WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticides residues in food matrices using QuEChERS methodology. **Food Chem.**, v.125, p. 803-812, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Health topics Pesticides**. Disponível em: < <http://www.who.int/topics/pesticides/en/>>. Acesso em: junho. 2016.

YANG, X. et al. Multiresidue method for determination of 88 pesticides in berry fruits using solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry: Determination of 88 pesticides in berries using SPE and GC–MS. **Food Chemistry**, v. 127, p. 855–865, 2011.

YAZDANFAR, N.; YAMINI, Y.; GHAMBARIAN M. Homogeneous Liquid–Liquid Microextraction for Determination of Organochlorine Pesticides in Water and Fruit Samples. **Chromatographia**, v. 77, p. 329-336, 2014.

ZHANG et al. A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 900-925, 2012.

ZHANG, L. et al. Analysis of Six Organophosphorus Pesticide Residues in Apples and Pears Using Cloud-point Extraction Coupled with HPLC-UV. **Journal of AOAC International**, v.97, n. 4, p. 1202-1206, 2014.