



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS – EQA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E
AMBIENTAL – PPGQTA**

**ESTUDO DO MÉTODO QuEChERS PARA
DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE
AGROTÓXICOS EM PÊSSEGO EM CALDA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fabiane Pinho Costa

**Rio Grande, RS, Brasil
2012**

ESTUDO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM PÊSSEGO EM CALDA

por

Fabiane Pinho Costa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Linha de Pesquisa Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **MESTRE EM QUÍMICA**

Orientador: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel

**Rio Grande, RS, Brasil
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS - EQA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E
AMBIENTAL - PPGQTA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**ESTUDO DO MÉTODO QuEChERS PARA
DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE
AGROTÓXICOS EM PÊSSEGO EM CALDA**

elaborada por

Fabiane Pinho Costa

como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Química**

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel
(Orientador - Presidente)

Prof^a. Dr^a. Eliana Badiale Furlong (FURG)

Prof. Dr. Osmar Damian Prestes (UNIPAMPA)

Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte (FURG)

Rio Grande, 27 de abril de 2012.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel** pela oportunidade, pela orientação, pelo seu apoio, incentivo e compreensão em todos os momentos, por acreditar no meu potencial e no meu trabalho, por me proporcionar uma boa formação e pela amizade demonstrada. Obrigada!

À **Prof. Dr^a. Eliana Badiale Furlong** pela participação e sugestões no exame de qualificação, pelos ensinamentos enquanto professora e co-orientadora e pelas suas valiosas sugestões para o final deste estudo.

Ao **Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte** pela participação no exame de qualificação, por contribuir com suas sugestões para o final deste estudo. Obrigada também, pelas sugestões e questionamentos realizados ao longo do desenvolvimento deste trabalho, com certeza contribuíram muito.

Ao **Prof. Dr. Osmar Damian Prestes** pela disposição e participação na defesa da dissertação, por contribuir com suas sugestões para o final deste estudo.

À **Sergiane Souza Caldas** por todos os ensinamentos compartilhados, pelas contribuições no decorrer do meu trabalho, pela amizade, otimismo, compreensão e pela ajuda em todos os trabalhos que realizei durante a graduação e no mestrado. Sergi, obrigada por tudo, muito do que aprendi e das conquistas que alcancei foi através de ti!

Aos meus pais, **Luiza e Gilnei**, por me proporcionarem sempre o melhor que podiam, pelo amor, pelo apoio, pela educação e valores ensinados. Pai e mãe, obrigada por tudo. Amo muito vocês!!!

Ao meu irmão **Fabrício**, pelo amor, carinho e amizade. Te amo mano!

À minha vó **Ilda**, por todo o apoio, carinho e incentivo durante todo o meu estudo. Vó obrigada por estar sempre me apoiando em todas as decisões de minha vida!

Ao meu noivo, **Ricardo**, pelo carinho, amor, dedicação e paciência, por estar sempre ao meu lado, por compreender minha ausência e mau-humor em muitos momentos. Pelas palavras de confiança quando achava que nada daria certo, e

principalmente por me apoiar nas minhas decisões e esperar esses dois anos à distância. Lindo, te amo!!!!

Aos meus familiares, que sempre torceram por mim e apostaram em mais uma vitória e que direta ou indiretamente fizeram parte dela!!!

A todos os meus amigos, que sempre me proporcionam momentos de descontração e torcem por mim (**Sibéle, San, Kaka e Nati**).

Em especial às minhas grandes amigas, **Geise e Vivi**, minhas amigas e consideradas irmãs, pessoas que confio, que amo, que estão e sempre estiveram ao meu lado, rindo, chorando, em todos os momentos. Amigas obrigada por essa amizade verdadeira e por todos os momentos bons que vocês me proporcionam! Amo muito vocês!

À **Ju**, que muito me ajudou e me acompanhou no desenvolvimento do meu trabalho!

À **Lizi**, que me ensinou a apresentar, pelo meu primeiro artigo, pelas discussões sobre os trabalhos, pelos momentos de alegria, pela torcida, por estar sempre disposta a ajudar! Obrigada Lizi por tudo!

Aos meus filhotes, **Alff, Belinha** e a minha gata **Marry**, que me trazem uma felicidade enorme e me dão muito carinho!

À todos os colegas do LACOM, **Márcia, Jaque, Sherol, Sergi, Liziara, Débora, Liziane, Maicon, Adri Demoliner, Adri Dias, Ana Laura, Ednei, Fábio, Luis, Maristela, Cátia, Nathiele, Vivi, Augusto, Maria Angelis, Bruno, Renata, Bruno Meira, Edinho, Ju Maciel**, com os quais convivi, e que contribuíram de diversas formas e pelos momentos de muita diversão que tenho guardado na lembrança e no coração com um enorme carinho.

À **FURG** pela oportunidade, principalmente pelo ensino gratuito e de qualidade.

À **CAPES** por me oportunizar a bolsa de estudo!

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental**, os quais auxiliaram na minha formação acadêmica, proporcionando-me esta realização e formação com qualidade.

Agradeço à **Deus**, pela proteção e por me conceder mais esta vitória.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental
Universidade Federal do Rio Grande – FURG
ESTUDO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO
MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM PÊSSEGO EM CALDA
AUTORA: FABIANE PINHO COSTA
ORIENTADOR: PROF. Dr. EDNEI GILBERTO PRIMEL
Rio Grande, 27 de abril de 2012.

O pessegueiro é uma planta típica de clima temperado e para o seu bom desenvolvimento as condições climáticas da região de plantio devem ser observadas. No Brasil, o estado do Rio Grande do Sul (RS) apresenta as características apropriadas para o cultivo, sendo a cidade de Pelotas, o maior pólo produtor de pêssegos, com destaque para o destino à indústria. Devido ao clima propício para o cultivo dessas espécies, a cidade de Pelotas investiu na industrialização, sendo atualmente o mais importante fornecedor de pêssego em calda, abastecendo todo o mercado interno. Os insetos, fungos e bactérias representam uma constante ameaça para o cultivo, pois o pessegueiro é frequentemente atacado por essas pragas. A forma de controle é o uso de agrotóxicos, sendo que, no Brasil, 30 ingredientes ativos são permitidos para a aplicação na cultura do pêssego. Com o uso indiscriminado desses compostos e o desrespeito as Boas Práticas Agrícolas, resíduos de agrotóxicos podem ser encontrados em alimentos, afetando a segurança alimentar. Neste trabalho foi realizado o estudo dos métodos QuEChERS original, citrato e acetato, afim de avaliar a eficiência de extração aliada ao efeito matriz (EM) para os agrotóxicos triclorfom, dimetoato, fentiona, malationa, fenitrotiona, tiametoxam, ciproconazol, tebuconazol, difenoconazol e azoxistrobina em amostras de pêssego em calda drenado e não drenado. As determinações foram realizadas utilizando cromatografia a gás acoplado à espectrometria de massas (GC-MS). O método proposto com extração pelo método QuEChERS original e determinação por GC-MS foi validado conforme parâmetros do INMETRO, ANVISA e SANCO. Os LOQs dos agrotóxicos para o método, variaram entre 1,0 e 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Foi construída a curva trabalho para avaliar o desempenho do método e a linearidade, sendo que todas as curvas analíticas apresentaram valores de r maiores que 0,99. Os valores de recuperação para o pêssego em calda drenado foram de 83,4 a 120,4% com RSD inferiores a 14,9% para a maioria dos analitos, e de 68,6 a 124,6% com RSD inferiores a 19,8%, para o pêssego em calda não drenado. O EM predominante em ambas as matrizes foi o enriquecimento, sendo que para o pêssego em calda drenado, houve um maior número de analitos com efeito positivo. Para compensar o EM, foi utilizada a calibração por superposição na matriz e o padrão interno. A eficiência do processo foi utilizada para avaliar a performance do método de extração e determinação, sendo que para ambas as matrizes, o processo foi eficiente para sete dos dez analitos. A robustez foi demonstrada utilizando amostras de pêssego *in natura* do tipo dupla finalidade, apresentado valores de recuperações dentro dos limites aceitáveis. A aplicabilidade do método foi avaliada para três marcas de pêssegos em calda provenientes da cidade de Pelotas. Resíduos de tebuconazol foram detectados em todas as marcas, tanto nas amostras drenadas como nas não drenadas. Dimetoato foi detectado em apenas uma das marcas, para ambas as amostras. O método mostrou-se adequado à análise dos agrotóxicos em pêssego em calda e todos os parâmetros de validação obtidos estão dentro dos limites sugeridos para métodos cromatográficos.

Palavras chave: agrotóxicos; pêssego em calda; QuEChERS; GC-MS

ABSTRACT

Master's Thesis
Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental
Universidade Federal do Rio Grande
STUDY OF THE QuEChERS METHOD FOR MULTIRRESIDUE PESTICIDES
DETERMINATION IN PROCESSED PEACHES
AUTHOR: FABIANE PINHO COSTA
ADVISOR: EDNEI GILBERTO PRIMEL, M. S., Ph. D.
April 27th, 2012, Rio Grande, RS, Brazil

Peach is a typical plant of temperate climate, and for its development the climate conditions of the producing area should be observed. In Brazil, Rio Grande do Sul (RS) state has the suitable characteristics for its cultivation, and Pelotas city, is the largest supplier center of peaches, especially which one destined for the industry. Due to the favorable climate for the cultivation of these species, Pelotas city is the most important supplier of processed peaches nowadays. Insects, fungus and bacteria pose a constant risk to the fruit quality because the peach is often attacked by these diseases. The way of control employed is the use of pesticides, and in Brazil, 30 active ingredients are allowed for application in peach. Due to the widespread use of pesticides and the non-respect of the Good Agricultural Practice, pesticide residues can be found in food, affecting the food security. In this work the study of original, citrate and acetate QuEChERS methods was performed in order to evaluate the extraction efficiency and the matrix effect (ME) for the pesticides trichlorfon, dimethoate, fenthion, malathion, fenitrothion, thiamethoxam, cyproconazole, tebuconazole, difenoconazole and azoxystrobin in drained and undrained processed peaches samples. The determinations were performed using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The proposed method with extraction by original QuEChERS method and determination by GC-MS was validated according to parameters suggested by Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) and Commission of the European Communities (SANCO). The method LOQs ranged between 1.0 and 10.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Working curve was constructed to evaluate the method performance and the linearity. All analytical curves showed r values higher than 0.99. The recovery values for the drained processed peaches are from 83.4 to 120.4% with RSDs lower than 14.9% for most of the analytes, and from 68.6 to 124.6% with RSDs lower than 19.8% for undrained processed peaches. The signal enrichment was the predominant ME in the matrices and for the drained processed peaches more analytes with a positive effect were found. To compensate the ME, matrix-matched calibration and internal standard were used. The process efficiency was used to evaluate the performance of the method of extraction and determination, in and the results showed that the process was effective for seven of ten analytes studied. The robustness was demonstrated by using samples of fresh peach fruits and the recovery values shown within acceptable limits. The applicability of the method was verified by the analysis of three brands of processed peaches from the Pelotas city. Tebuconazole residues were detected in all brands, in undrained and drained samples. Dimethoate was detected in both samples but only in one of the brands. The method proved to be adequate for the analysis of pesticides in processed peach and all the validation parameters were within the limits suggested for the validation of chromatographic methods.

Key words: pesticides; processed peache; QuEChERS; GC-MS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa da Produção Agrícola Municipal de pêssego, no estado do RS, em toneladas (Fonte: IBGE – Produção Agrícola Municipal, 2010)	7
Figura 2 - Componentes básicos de um espectrômetro de massas.....	24
Figura 3 – Componentes de um GC-MS com fonte de ionização EI	25
Figura 4 - Representação do método QuEChERS Original	29
Figura 5 - Procedimento dos métodos QuEChERS acetato e citrato	33
Figura 6 - Comparação entre as áreas obtidas através das condições 1 e 2 no GC-MS	68
Figura 7 - Gráfico comparativo entre os volumes de injeção de 1 e 2 μL no GC-MS, utilizando a condição 2.....	69
Figura 8 - Comparação entre os valores de área de cada composto utilizando injeção por pulso de pressão e sem pulso de pressão	70
Figura 9 - Faixa de aumento das taxas de aquecimento.....	73
Figura 10 - Cromatograma do Íon Total para os 10 agrotóxicos estudados na concentração de 5 mg L^{-1} nas condições otimizadas para o GC-MS.....	74
Figura 11 - Íons dos analitos monitorados por janelas de aquisição em intervalos de tempo (min)	74
Figura 12 - Eficiência do processo para os métodos original, citrato e acetato para o pêssego em calda drenado	77
Figura 13 - Eficiência do processo para os métodos original, citrato e acetato para o pêssego com calda	78
Figura 14 - Distribuição das diferentes respostas dos agrotóxicos para o efeito matriz nos níveis do LOQ e 10 LOQ em (A) para a amostra de pêssego em calda drenado e em (B) para a amostra de pêssego com calda.....	88
Figura 15 - Gráfico da relação entre R%, EM e EP para o pêssego em calda drenado, no nível de 10 LOQ	91
Figura 16 - Gráfico da relação entre R%, EM% e EP% para o pêssego com a calda, no nível de 10 LOQ	91
Figura 17 - Concentrações de resíduos dos agrotóxicos detectados nas amostras A, B e C para o pêssego em calda drenado	96

Figura 18 - Concentrações de resíduos dos agrotóxicos detectados nas amostras A, B e C para o pêssego analisado com a calda	96
Figura 19 - Confirmação do sinal positivo para resíduos de tebuconazol nas amostras de pêssego em calda para a marca A.....	98
Figura 20 - Confirmação do sinal positivo para resíduos de tebuconazol nas amostras de pêssego em calda para a marca B.....	98
Figura 21 - Confirmação do sinal positivo para resíduos de dimetoato e tebuconazol nas amostras de pêssego em calda para a marca C	99
Figura 22 - Representação da detecção de tebuconazol em uma das amostras de pêssego em calda drenado, monitorando um íon para identificação e outro para confirmação.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição de pêssego por 100 gramas de porção comestível	4
Tabela 2- Comparação entre os métodos modernos de preparo de amostra para determinação de agrotóxicos em alimentos	27
Tabela 3 - Métodos utilizados para determinação de agrotóxicos em matrizes de pêssego.....	35
Tabela 4 – Fórmula estrutural, toxicidade, classe, grupo químico, limites máximos de resíduos (LMR) e Ingestão Diária Aceitável (IDA) para os agrotóxicos selecionados.	62
Tabela 5 - Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos selecionados	65
Tabela 6 - Testes com diferentes programações de temperatura do forno cromatográfico e fluxo do gás de arraste	66
Tabela 7 – Resumo dos parâmetros avaliados nas condições 1 e 2 de análise	68
Tabela 8 – Programação da temperatura do forno cromatográfico otimizada, totalizando um tempo de análise de 18 min	70
Tabela 9 – Condições cromatográficas otimizadas para o método utilizando GC-MS	71
Tabela 10 – Tempo de retenção, íons característicos e monitorados de cada analito e janelas de aquisição, por ordem de eluição	72
Tabela 11 – Comparação entre os métodos original, citrato e acetato em função do número de agrotóxicos que apresentam recuperações entre 70-120% e EM entre 80-120%	76
Tabela 12 – Limites de detecção (LODi) e quantificação instrumental (LOQi), limites de detecção (LODm) e quantificação pelo método QuEChERS Original (LOQm) e a relação sinal/ruído (S/N) obtidas pelo GC-MS.....	79
Tabela 13 – Faixa linear, equação de reta e coeficiente de correlação linear (r) para os agrotóxicos estudados	81
Tabela 14 – Equações das curvas por superposição da matriz e coeficientes de correlação linear para amostras de pêssego drenado e com calda	82
Tabela 15 – Equações das curvas obtidas através da curva trabalho e coeficientes de correlação linear para amostras de pêssego drenado e com calda (n=6)	82
Tabela 16 - Recuperação (R%) e precisão (RSD) empregando o método QuEChERS Original e GC-MS em amostras de pêssego em calda drenado e com calda fortificadas em três níveis (baixo, intermediário e alto)	84

Tabela 17 – Percentuais de recuperação (R%) e RSD_{pi} para a precisão intermediária do método QuEChERS Original e GC-MS em amostras de pêsego em calda drenado e com calda fortificadas em dois níveis (baixo e intermediário)	86
Tabela 18 – Resultados do efeito matriz para os agrotóxicos em estudo nas amostras de pêsego em calda drenado e com calda	87
Tabela 19 – Percentuais de Recuperação, RSD, EM e EP da robustez do método para amostra de pêsego <i>in natura</i> (n=6)	92
Tabela 20 – Resíduos de agrotóxicos detectados nas amostras de pêsego <i>in natura</i> e nas amostras de pêsego em calda processado	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists
- ASE – Extração Acelerada por Solvente, do inglês Accelerated Solvent Extraction
- BCPC – British Crop Protection Council
- C18 - Sílica modificada com hidrocarboneto linear C 18 , octadecilsilano
- CEN – *Commite Européen de Normalisation*, do inglês *European Committee for Standardization*
- CI – Ionização Química, do inglês *Chemical Ionization*
- CV – coeficiente de variação
- d.i. – diâmetro interno
- DAD – Detecção por Arranjo de Diodos, do inglês *Diode Array Detection*
- d-SPE - Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*
- ECD – Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Electron Capture Detector*
- EI – Ionização Eletrônica, do inglês *Electron Ionization*
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EU- União Européia
- EUA – Estados Unidos
- eV – elétron-Volt
- FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
- FE- Fase Estacionária
- FID – Detecção por Ionização em Chama, do inglês *Flame Ionization Detection*
- FPD – Detector Fotométrico de Chama, do inglês *Flame Photometric Detector*
- FURG – Universidade Federal do Rio Grande
- GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*
- GC-ECD- Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Gas Chromatography with Electron Capture Detection*
- GC-MS- Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*
- GC-NPD- Cromatografia Gasosa com Detecção Nitrogênio e Fósforo, do inglês *Gas Chromatography with Nitrogen Phosphorus Detection*

HAc – Ácido acético

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

IA- Ingrediente Ativo

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

ISO – Organização Internacional para Padronização, do inglês *International Organization for Standardization*

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

K_{OW}- Coeficiente de partição octanol-água

LACOM – Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais

LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LMR - Limite Máximo de Resíduos

LOD - Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LODi- Limite de Detecção do instrumento, do inglês *Limit of Detection of the Instrument*

LODm- Limite de Detecção do método, do inglês *Limit of Detection of the Method*

LOQ - Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

LOQi - Limite de Quantificação do Instrumento, do inglês *Limit of Quantification of the Instrument*

LOQm- Limite de Quantificação do método, do inglês *Limit of Quantification of the Method*

LVI – Injetor de Grande Volume, do inglês *Large Volume Injection*

MAE – Extração Assistida por Microondas, do inglês *Microwave Assisted Extraction*

MeCN – Acetonitrila

MM- Massa Molar

MRM - Monitoramento de reações múltiplas, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*

MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

MSPD – Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*

m/z – razão massa-por-carga

n – número de replicatas

NaOH – hidróxido de sódio

NPD – Detecção de Nitrogênio e Fósforo, do inglês *Nitrogen-Phosphorus Detection*

OCI – injetor *on-column*

- p.a.- grau pró-análise
- Pa – Pascal (unidade de pressão)
- PARA- Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
- pH - Potencial hidrogeniônico
- PI- Padrão Interno
- pK_a - Potencial de dissociação ácida
- PLE – Extração com Líquido Pressurizado, do inglês *Pressurized Liquid Extraction*
- PSA - Amina primária secundária, do inglês *Primary Secondary Amine*
- PTFE – politetrafluoretileno
- r^2 - coeficiente de determinação
- rpm- rotação por minuto
- RS – Rio Grande do Sul
- RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*
- RSD_{pi} – Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária
- RSD_r – Desvio Padrão Relativo para Repetitividade
- s – estimativa do desvio padrão absoluto
- SBSE – Extração sortiva em barra de agitação, inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*
- SFE – Extração por Fluido Supercrítico, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*
- SIM – Monitoramento do Íon Seleccionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*
- SINDAG- Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola
- SPE - Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*
- SPME – Microextração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*
- s/n – relação sinal-ruído
- t_R – tempo de retenção
- TCD – Detecção por Condutividade Térmica, do inglês *Thermal Conductivity Detection*
- TIC- Cromatograma Total, do inglês *total ion chromatogram*
- TID – Detector Termoiônico, do inglês *Thermionic Ionization Detector*
- UPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography*
- UV – Detecção no Ultravioleta, do inglês *Ultraviolet Detector*
- x_m – média de medidas em réplica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1 Pêssego	3
3.1.1. Valor nutricional e o cultivo do pessegueiro.....	3
3.1.2. Produção e importância sócio-econômica no RS	6
3.1.3. Processo de industrialização do pêssego em calda	8
3.2 Agrotóxicos	10
3.2.1. Definição e Classificação.....	10
3.2.2. O uso de agrotóxicos no pessegueiro e a ocorrência de resíduos em alimentos.....	13
3.2.3. Resíduos de agrotóxicos em alimentos processados	15
3.3 Técnicas cromatográficas	18
3.3.1. Cromatografia a gás	18
3.3.2. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	21
3.3.2.1. Ionização por impacto de elétrons (EI)	21
3.3.2.2. Espectrometria de massas	23
3.4 Preparo de amostra	25
3.4.1. Métodos multirresíduos para extração de agrotóxicos em alimentos	25
3.4.2. Método QuEChERS original	28
3.4.3. Métodos QuEChERS citrato e acetato	32
3.4.4. Determinação de agrotóxicos em pêssego	34
3.5 Validação de métodos analíticos	36
3.5.1. Limites de Detecção (LOD) e Limites de Quantificação (LOQ).....	37
3.5.2. Curva analítica de calibração e linearidade	37
3.5.3. Exatidão.....	40
3.5.4. Precisão	41
3.5.5. Robustez.....	43
3.6 Efeito matriz	44

4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1. Seleção dos agrotóxicos	46
4.2. Seleção do padrão interno	46
4.3. Instrumentação	46
4.4. Reagentes, solventes e materiais	47
4.5. Limpeza da vidraria	48
4.6. Controle de qualidade nas determinações	48
4.7. Preparo das soluções	49
4.8. Otimização da separação cromatográfica por GC-MS	49
4.8.1. Programação da temperatura do forno	50
4.8.2. Fluxo do gás de arraste	50
4.8.3. Otimização das temperaturas do injetor, interface e fonte de íons	50
4.8.4. Modo e volume de injeção <i>split</i> e <i>splitless</i>	51
4.9. Amostragem e processamento das amostras de pêsego em calda	51
4.10. Avaliação do método QuEChERS e quantificação por GC-MS	52
4.10.1. Método QuEChERS Original	53
4.10.2. Método QuEChERS acetato	53
4.10.3. Método QuEChERS citrato	54
4.11. Validação do método	54
4.11.1. Limites de detecção e quantificação	55
4.11.2. Curva analítica, curva trabalho e linearidade.....	55
4.11.3. Exatidão (recuperação).....	56
4.11.4. Precisão	57
4.11.5. Efeito matriz	58
4.12. Eficiência do Processo	59
4.13. Aplicabilidade do método e robustez	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1. Seleção dos agrotóxicos	61
5.2. Seleção do padrão interno	61
5.3. Otimização e seleção das condições cromatográficas no GC-MS	65
5.3.1. Programação da temperatura do forno e fluxo do gás de arraste.....	65
5.3.2. Testes das temperaturas do injetor, da interface e da fonte de íons e modo <i>Splitless</i>	67

5.4. Estudo dos métodos QuEChERS original, citrato e acetato	75
5.4.1. Avaliação da eficiência de recuperação e EM	75
5.4.2. Escolha do procedimento de extração em função da EP	77
5.5. Validação do método por GC-MS para determinação multirresíduo de agrotóxicos em pêssego em calda	78
5.5.1. Limites de detecção e limites de quantificação	78
5.5.2. Curva analítica, curva trabalho e linearidade	80
5.5.3. Exatidão e precisão	83
5.5.4. Efeito matriz	86
5.6. Eficiência do processo.....	90
5.7. Robustez	92
5.8. Aplicabilidade do método	94
6. CONCLUSÕES.....	101
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	103
8. TRATAMENTO DE RESÍDUOS GERADOS	103
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
10. PRODUÇÕES CIENTÍFICAS REFERENTE AO TRABALHO	112

1. INTRODUÇÃO

O pêssego (*Prunus pérsica*) é uma espécie nativa da China, com valor nutritivo como fonte de compostos traços, muito apreciado pelo sabor agradável e textura macia, bem como pelo seu potencial vitamínico. Além do consumo *in natura*, o pêssego é utilizado na doçaria caseira e industrial para a produção de compotas, doces, polpas, conservas em xarope, entre outros.

A persicultura representa uma importante atividade para o setor da fruticultura na cidade de Pelotas (RS), onde estão situados 90% da área de pomares do estado, com destaque para a produção de pêssego destinado a indústria. Para os agricultores de Pelotas e de municípios da zona Sul do RS, a cultura do pessegueiro destaca-se pela importância econômica e social, por ser o maior produtor e fornecedor de pêssego em calda, abastecendo todo o mercado interno (RIGATTO, 1999).

A cultura do pêssego é frequentemente exposta ao ataque de pragas, principalmente de origem fúngica, bacteriana e por insetos, que causam perdas significativas na colheita e pós-colheita. O controle de doenças no pessegueiro é realizado através do uso de agrotóxicos, sendo permitido o uso de 30 princípios ativos, de diferentes classes toxicológicas e grupos químicos que representam alto risco para a saúde, bem como para o meio ambiente (EMBRAPA, 2005; AGROFIT, 2012).

Resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais são uma grande preocupação para os consumidores devido aos seus efeitos negativos na saúde, sendo os alimentos, uma das rotas mais comuns de exposição aos agrotóxicos. Exposições combinadas à diferentes resíduos de agrotóxicos podem ocorrer como consequência da ingestão de um simples alimento contendo multirresíduo ou de uma combinação de diversos produtos alimentícios, cada um contendo um ou mais tipos de resíduos.

Com o aumento da produção, do uso de agrotóxicos e em combinação com o desrespeito as Boas Práticas Agrícolas, a detecção destas substâncias nos alimentos é, atualmente, uma das principais preocupações de saúde pública.

Os alimentos processados estão também sob investigação com relação a ocorrência desses resíduos. Alguns estudos verificaram a redução dos níveis de resíduos de agrotóxicos devido as técnicas de processamento, porém, mesmo com as

etapas de descascamento, lavagem, cozimento, entre outros processos, os resíduos podem não ser completamente removidos de certos alimentos.

No Brasil, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em alimentos (PARA), monitorou a qualidade de 18 espécies de alimentos em relação à resíduos de agrotóxicos. Neste estudo, os resultados mostraram irregularidades quanto ao uso destes compostos nas lavouras, pois foram encontrados resíduos acima dos limites máximos de resíduos (LMR), bem como a detecção de ingredientes ativos não autorizados para determinada cultura. É importante salientar que o pêssego, mesmo se tratando de uma fruta muito apreciada e consumida pela população, não foi monitorado. Além disso, estudos que avaliem a ocorrência de resíduos de agrotóxicos em pêssego em calda não são encontrados na literatura científica.

Os alimentos apresentam matrizes complexas, propriedades químicas distintas e baixa concentração de alguns analitos, em especial os contaminantes, e por isso, requerem uma etapa fundamental de preparo de amostra. Assim, para a determinação de agrotóxicos, faz-se necessário o emprego de métodos multirresíduo de fácil aplicação e de eficiência adequada para superar os limites impostos pela legislação. Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos para a separação, identificação e quantificação desses compostos ganha grande destaque para que os limites de detecção e quantificação de tais métodos sejam cada vez menores. O método QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) é o método mais consolidado e seu uso em alimentos tem sido cada vez mais ampliado. A técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS) é uma das principais ferramentas aplicadas em análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos e por outras amostras permitir que a confirmação e a determinação de um grande número de compostos sejam realizadas simultaneamente.

Ressalta-se que este estudo torna-se importante como forma de proteção à saúde da população e imprescindível, diante da inexistência de dados de determinação destes compostos em amostras de pêssego em calda. Além de contribuir para o estabelecimento, na legislação, de LMR para o pêssego em calda, e considerando-se, que os limites atuais na legislação, referem-se ao tipo de pêssego para consumo *in natura*, que se trata de um fruto diferente daquele utilizado para a industrialização.

2. OBJETIVOS

Considerando o importante papel desempenhado pela Química Analítica no desenvolvimento e/ou aperfeiçoamento de técnicas e métodos para investigar a ocorrência de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentares, o objetivo geral do trabalho é estudar diferentes condições de preparo de amostra envolvendo o método QuEChERS e GC-MS para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos em pêssego em calda.

Os objetivos específicos propostos no trabalho são:

- ✓ Selecionar os principais agrotóxicos utilizados na cultura do pêssego com enfoque à produção na cidade de Pelotas;
- ✓ Otimizar os parâmetros instrumentais do GC-MS, para a determinação dos compostos;
- ✓ Realizar um estudo baseado nos métodos QuEChERS mais utilizados na literatura, para a extração de agrotóxicos em alimentos, afim de selecionar o método mais eficiente para essas determinações, através da avaliação da influência do procedimento de extração no efeito matriz (EM), na exatidão do método e na eficiência do processo (EP) em amostras de pêssego em calda;
- ✓ Validar os métodos empregando o método QuEChERS para extração dos analitos e determinação por GC-MS, nas amostras em análise;
- ✓ Demonstrar a aplicabilidade do método validado na determinação de resíduos de agrotóxicos em diferentes amostras de pêssego em calda.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Pêssego

3.1.1 Valor nutricional e o cultivo do pessegueiro

O pêssego é uma das frutas mais apreciadas no mundo, pelo sabor, aparência e pelo seu valor econômico no âmbito da cadeia produtiva. O pêssego (*Prunus pérsica*) é uma espécie nativa da China, com registros que remontam a 20 séculos a C. O nome é proveniente da Pérsia que foi de forma equivocada tomada como país de origem dessa espécie. No Brasil, o pessegueiro foi introduzido em 1532, por Martim Afonso de Souza, por meio de mudas trazidas da Ilha da Madeira e plantadas em São Vicente (no atual estado de São Paulo) (SALIM, 1998).

Os pêssegos são consumidos em maior quantidade na forma *in natura*, e é nessa condição que oferecem toda a sua riqueza vitamínica e propriedades alimentares. No entanto, são também utilizados na doçaria caseira e industrial (compotas, doces, polpas, conservas em xarope, etc.). Os pêssegos para fins industriais podem ser dos tipos, indústria e dupla finalidade, e são caracterizados através de uma polpa elástica e amarela, epiderme amarela, maior teor de acidez, ausência de coloração vermelha junto ao caroço e geralmente aderente (EMBRAPA, 2009).

A Tabela 1 apresenta a composição do pêssego para consumo *in natura* e processado (em calda).

Tabela 1 – Composição de pêssego por 100 gramas de porção comestível

Composição	Pêssego <i>in natura</i>	Pêssego em calda
Água (%)	89,3	82,2
Proteína (g)	0,8	0,7
Lipídio (g)	Tr*	Tr*
Carboidrato (g)	9,3	16,9
Fibra alimentar (g)	1,4	1,0
Cálcio (g)	3,0	4,0
Energia (Kcal)	36	63

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). *Tr- nível traço

Além disso, o pêssego de polpa amarela é rico inclusive em carotenóides importantes pelos poderes antioxidantes, estimuladores das funções imunológicas e protetores contra determinados tipos de câncer (NOGUEIRA, 2008).

O pessegueiro é uma planta típica de clima temperado, apresentando a exigência de um período de inverno, durante o qual ele encontra condições de repouso hibernar, período indispensável ao seu desenvolvimento (NOGUEIRA, 2008). As condições climáticas da região devem ser observadas para a implantação de um pomar. O RS é o estado do Brasil que apresenta as condições climáticas apropriadas para o cultivo do pêsego, nas quais favorecem a exploração comercial.

Para o pessegueiro, a temperatura, a radiação solar, a precipitação pluvial e a ocorrência de ventos fortes e granizo, são os efeitos climáticos que influenciam no cultivo. A temperatura é o mais importante dentre eles, o qual afeta a distribuição das cultivares. A temperatura, por ser um parâmetro de difícil controle, o clima da região de plantio deve ser levado em consideração. Deste modo, o RS é favorecido para este cultivo, devido ao clima temperado (NOGUEIRA, 2008).

Durante a fase vegetativa, o pêsego, geralmente, atinge melhor qualidade em áreas onde as temperaturas no verão, (principalmente, próximo à colheita) são relativamente altas durante o dia e amenas no período noturno. Essas condições propiciam aumento do teor de açúcares e melhoria da coloração. Muitas cultivares tornam-se adstringentes quando se desenvolvem sob condições de verões frescos, as quais, geralmente, ocorrem em áreas de maior altitude. A radiação solar proporciona aumento na atividade fotossintética, influenciando na coloração do fruto (EMBRAPA, 2005).

Estima-se que a necessidade de água para a planta esteja entre 70 e 100%, sendo variável com seu estágio de desenvolvimento, tendo maior necessidade nas fases de crescimento que antecedem a maturação e após a colheita. Os ventos fortes, durante a fase vegetativa da planta, podem ser prejudiciais, pois podem dilacerar as folhas e propagar doenças, principalmente bactérias (EMBRAPA, 2005).

A fase de repouso, na qual as espécies frutíferas de clima temperado cessam o crescimento, tem grande influencia na produção no ciclo seguinte. O frio é classificado como o parâmetro de maior importância, tanto para eliminar a dormência, como após a floração. A grande maioria das cultivares de pessegueiro, em regiões de clima temperado, requer de 600 a 1000 horas de frio (abaixo de 7,2 °C) para florescer e enfolhar normalmente. De um modo geral, as cultivares de pêsego mais plantadas no Brasil foram criadas nos programas de melhoramento genético do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), no estado de São Paulo ou no Centro de Pesquisa

Agropecuária de Clima Temperado (CPACT) da EMBRAPA em Pelotas no estado do Rio Grande do Sul. Há, ainda, algumas criadas pela Estação Experimental de Taquari- Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Rio Grande do Sul, e pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Difusão de Tecnologia de Santa Catarina S.^a - EPAGRI - e pelo Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR - além de algumas cultivares de maturação precoce, criadas pela Universidade da Flórida, nos Estados Unidos, como, por exemplo, Maravilha, San Pedro, Flordaprince e Flordasun (EMBRAPA, 2012).

3.1.2 Produção e importância sócio-econômica no RS

Atualmente, a China encontra-se como o maior produtor mundial de pêssegos, chegando a totalizar mais de dez milhões de toneladas, segundo dados da *Food and Agriculture Organization* (FAO), em 2010. O Brasil encontra-se na 14^a posição dentre os 20 maiores países produtores, totalizando mais de 220 mil toneladas (FAO, 2010).

O pessegueiro é cultivado em vários estados brasileiros. Os maiores pólos produtores estão concentrados nos estados do Rio Grande do Sul (RS), São Paulo (SP), Paraná (PR) e Santa Catarina (SC), sendo o estado gaúcho, o maior produtor nacional (IBGE, 2010). Do total da produção brasileira (mais de 220 mil toneladas), o RS é responsável por mais de 130 mil toneladas da produção de pêssego, em uma área de aproximadamente 15 mil ha (IBGE, 2010).

A fruticultura assume importância cada vez maior no RS. Os pomares, que geram renda e emprego e diversificam a economia, aparecem em praticamente todas as regiões. O pessegueiro é uma das espécies frutíferas mais importantes, ocupando a quarta maior área cultivada entre as frutíferas, depois da uva, laranja e maçã, superando outras culturas de destaque, como a tangerina e a banana (IBGE, 2010).

Devido às excelentes condições de clima e solo para a produção de frutas, tanto de clima temperado como subtropical e tropical, a produção gaúcha, se diferencia, pela qualidade e pelo excelente rendimento por área, tornando o estado, potencial produtor dessas frutas (EMATER, 2012).

Como mostra a Figura 1, os maiores pólos de produção de pêssego, no estado, estão concentrados no extremo sul do RS, nas cidades de Pelotas, Bento Gonçalves, Canguçu, Farroupilha e Piratini, respectivamente (IBGE, 2010).

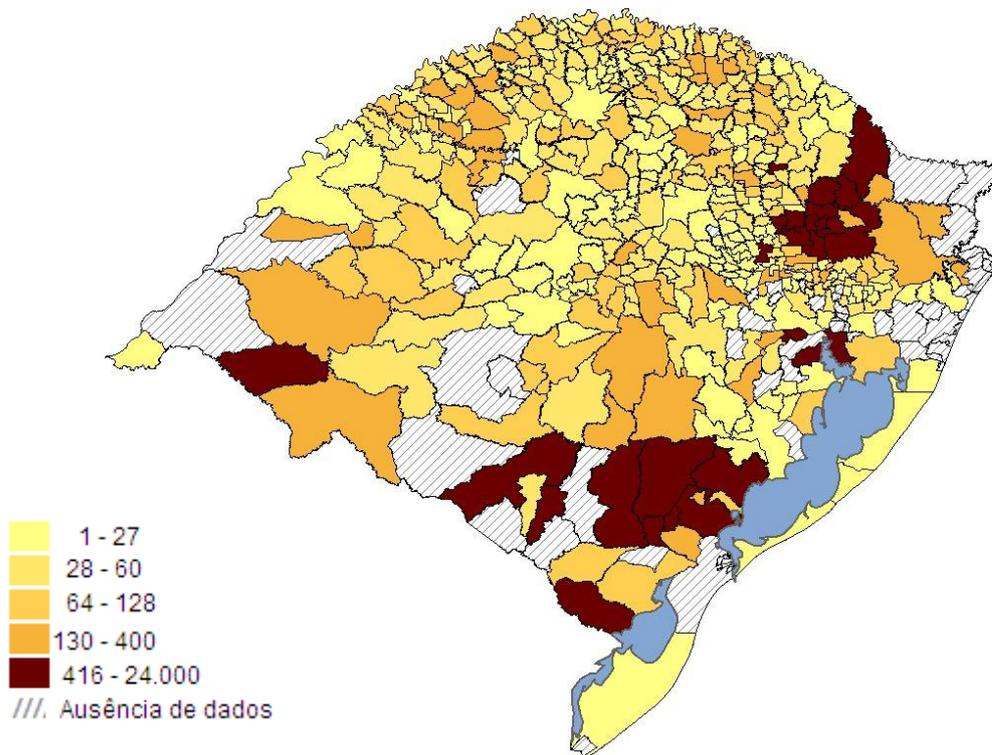


Figura 1 – Mapa da Produção Agrícola Municipal de pêssego, no estado do RS, em toneladas (Fonte: IBGE – Produção Agrícola Municipal, 2010)

Segundo a EMATER, a região de Pelotas é a principal produtora de pêssegos. Na região estão situados 90% da área de pomares do estado, com destaque para a produção de pêssego destinado a indústria. Para os agricultores de Pelotas e de municípios da Zona Sul do RS, a cultura do pessegueiro destaca-se pela importância econômica e social, pois, com uma estrutura fundiária baseada em minifúndios e com disponibilidade de mão-de-obra familiar, esses produtores encontram na fruticultura uma ótima alternativa de diversificação da matriz produtiva, a absorção da mão-de-obra familiar e a geração de renda em pequenas áreas (MADAIL, 2008). Devido ao clima propício para o cultivo dessas espécies, a cidade investiu fortemente na indústria de doces e conservas, destacando-se no mercado nacional como o mais importante fornecedor de pêssego em calda, abastecendo todo o mercado interno (RIGATTO, 1999).

3.1.3 Processo de industrialização do pêssego em calda

O pêssego é uma fruta delicada, necessita de cuidados no estágio de maturação para colheita, especialmente com choques mecânicos, para se dispor de matéria-prima de alta qualidade. O período entre colheita e processamento deve ser o mais breve possível, uma vez que as perdas por transpiração são elevadas (EMBRAPA, 2005).

Segundo informações da EMBRAPA (2005), os processos envolvidos na industrialização do pêssego em calda são: corte, descaroçamento, pelagem (descascamento), lavagem, embalagem, exaustão, esterilização, cozimento, resfriamento e armazenamento.

✓ Corte e descaroçamento

São realizados através máquinas onde lâminas do tipo tesoura com orifício no centro fazem o corte do pêssego e prende o caroço no orifício, resultando na retirada do caroço. Outro tipo de descaroçador, após o corte, uma lâmina do tipo colher é introduzida, fazendo um movimento giratório, cortando a polpa em torno do caroço. As perdas, aparentemente, são maiores porque ele recorta a polpa em torno do caroço, o que dependendo da regulagem da máquina, pode ser excessiva.

✓ Pelagem ou descascamento

Esta operação deve ser realizada imediatamente após o descaroçamento, uma vez que a oxidação da polpa no local onde se retirou o caroço.

O princípio geral da pelagem consiste em: (1) as metades são conduzidas horizontalmente sobre uma esteira; (2) Uma solução de soda cáustica, geralmente em concentrações elevadas (devido o alto teor de impurezas e umidade) á alta temperatura, é distribuída sobre as metades, através de calhas que formam diversas cascatas encadeadas, por aproximadamente 1 min; (3) o produto passa entre serpentinas de vapor que aceleram a reação da casca com a soda.

✓ Lavagem e inspeção

Após a operação de descascamento, as metades devem ser submetidas a vigorosos jatos de água para a remoção completa da soda cáustica. Durante a etapa de inspeção, realiza-se o retoque dos frutos que por ventura apresentam casca, manchas, machucaduras, podridões, pintas pretas, retirando-os. Frutos com retoques

muito aparentes vão compor tipos inferiores de qualidade de pêssego em calda como pêssego em cubos, fatiado, ou serão encaminhados para a preparação de polpas.

✓ Embalagem

As metades são classificadas em até cinco tamanhos que vão ser enlatados, em tipos como Extra, Especial, Primeira, Selecionado, Escolhido, Retocados, etc. Quanto ao tamanho, a maioria das fábricas rotula como produto Extra o que contém de 8 a 12 metades por lata de 1 kg; Especial, de 12 a 18 metades; Primeira, com 16 a 25 metades. O peso de enchimento, em geral, é de 450 gramas para metades e 400 gramas para pêssegos inteiros.

Posteriormente à colocação do produto na embalagem, procede-se à cobertura com calda quente. A concentração da calda, geralmente é expressa em graus Brix. Por exemplo: uma calda 20 °Brix é preparada colocando-se 20 partes de açúcar em 80 partes de água, isto é, totalizando 100 partes. As caldas devem ser fervidas, no mínimo, por 5 minutos para a retirada do excesso de sulfitos que podem trazer sabores estranhos, e após, filtradas.

✓ Exaustão

A exaustão, tem por finalidade retirar o ar do produto, formando na lata, quando fechada, um vácuo parcial. O fechamento hermético imediato da lata após esta operação, proporciona, quando a lata voltar à temperatura ambiente, a formação de uma pressão negativa (vácuo parcial) pela remoção de parte do ar. Após, as latas passam pelo processo de fechamento da embalagem.

✓ Esterilização e cozimento

Sendo o pêssego em calda um produto ácido, com pH entre 3,1 e 4,0, a temperatura próxima da fervura da água (banho-maria) é suficiente para conferir esterilidade ao produto, quando processado num recipiente hermético. Para latas de 1 kg, o tempo de esterilização, de modo geral, é entre 18 e 25 minutos. Neste caso, as latas são colocadas em tanques com água aquecida por vapor, até próximo de 100 °C.

✓ Resfriamento e armazenagem

As latas devem ser imediatamente resfriadas após a esterilização. Uma das principais razões é para que o produto não continue cozinhando e perdendo a firmeza. Entretanto, não se deve resfriar o produto até um ponto abaixo da

temperatura ambiente, uma vez que a lata permanecerá coberta de umidade por um longo período, tendendo a enferrujar.

O armazenamento deverá ser efetuado em local com temperatura próxima dos 25 °C e com baixa umidade do ar. Temperaturas elevadas podem acelerar reações de oxidação no produto. Ambientes com alta umidade podem acelerar o processo de oxidação das latas, se estas foram estocadas para posterior rotulagem e embalagem.

3.2 Agrotóxicos

3.2.1 Definição e Classificação

Segundo a legislação, o Decreto nº 4.074 regulamenta a Lei nº 7802/1989 e estabelece que os defensivos agrícolas, ou agrotóxicos, são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento (BRASIL, 2002).

O *Codex Alimentarius* além das substâncias mencionadas na legislação brasileira, contempla substâncias que possam vir a serem utilizadas não apenas diretamente durante o plantio, mas em todas as etapas do cultivo propriamente dito e também após a colheita, como nas etapas de armazenamento, transporte, distribuição e processamento do alimento (FAO, 2005).

Em outras palavras, o termo agrotóxico, coloca em evidência a toxicidade desses produtos ao meio ambiente e à saúde humana. Os agrotóxicos abrangem um grande número de moléculas químicas, com diferentes modos de ação e toxicidade, sendo divididos em três classes principais: inseticidas, fungicidas e herbicidas. Existem também os rodenticidas, moluscicidas, nematocidas e acaricidas (SILVA, *et al.* 2004).

A classificação quanto à ação dos agrotóxicos permite viabilizar à ação do composto agindo sobre determinados tipos de pragas, classificando-se como:

- ✓ Inseticidas: possuem ação de combate a insetos, larvas e formigas;
- ✓ Herbicidas: possuem ação de combate a ervas daninhas;
- ✓ Fungicidas: possuem ação de combate a fungos, e;
- ✓ Acaricidas: possuem ação de combate a ácaros.

No Brasil, há uma grande diversidade de produtos comerciais, cerca de 500 produtos diferentes, sendo que existem em torno de 700 ingredientes ativos (IA) que entram na composição de tais produtos, podendo chegar a uma totalização de mais de milhares de produtos comercializados. O termo “Ingrediente ativo” ou “princípio ativo” é utilizado para descrever os compostos responsáveis pela atividade biológica desejada (BARBOSA, 2004).

Estas substâncias estão divididas em diversos grupos químicos de substâncias, sendo benzoiluréias, carbamatos, organofosforados, organoclorados, piretróides, sulfoniluréias e triazinas os grupos mais importantes (BCPC, 2010). Os nomes estão relacionados com as características estruturais dos compostos, ou seja, com a natureza dos elementos químicos presentes em sua composição, além da maneira como tais elementos estão ligados entre si.

Com relação ao grupo químico dos organoclorados, no Brasil, a maioria desses compostos não tem mais uso permitido, pois em condições ambientais normais, demandam muito tempo para serem degradados na natureza (BARBOSA, 2004). Para substituí-los, surgiram os organofosforados, que são compostos químicos menos persistentes ao meio ambiente (SILVA *et al.*, 2004).

Embora existam muitas possibilidades para que os agrotóxicos sejam transportados no ambiente e contaminem os recursos ambientais, nem todos os produtos apresentam a mesma persistência e mobilidade no ambiente. Para saber quais produtos apresentam maiores riscos de serem transportados e atingirem locais indesejáveis, é importante conhecer como eles se movimentam no ambiente e quais as características que servem de indicadores do potencial do produto se tornar um poluente (CABRERA *et al.*, 2008).

As propriedades físico-químicas dos agrotóxicos são consideradas um importante parâmetro para avaliação ou predição teórica sobre os destinos e impactos

de agrotóxicos no ambiente, bem como, a contaminação residual em alimentos (CABRERA *et al.*, 2008).

Os valores do produto da constante de dissociação ácida (pK_a) têm efeito sobre a solubilidade do agrotóxico e, através do pK_a do agrotóxico e do pH do solo, é possível prever a forma predominante (ionizável ou molecular) de um composto ácido, a mesma relação pode ser obtida usando pK_b para agrotóxicos alcalinos (BARCELÓ e HENNION, 1997; CABRERA *et al.*, 2008).

O coeficiente de partição octanol-água, a solubilidade em água e a pressão de vapor são as propriedades físico-químicas que possuem maior decorrência da mobilidade dos agrotóxicos no meio ambiente.

Conforme observado por Schwarzenbach *et al.* (1995) vários agrotóxicos têm como características principais a hidrofobicidade elevada e reatividade baixa no meio ambiente. Essas características justificam a tendência desses compostos em se acumularem ou bioconcentrarem nos tecidos dos organismos vivos. A falta de uma via eficiente para a degradação desses compostos, em combinação com a sua hidrofobicidade, tem levado ao seu acúmulo em organismos vivos, incluindo peixes, seres humanos e alimentos (JARDIM *et al.*, 2009).

O coeficiente de partição octanol-água (K_{OW}) é definido como a relação da concentração de um agrotóxico na fase de n-octanol saturado em água e sua concentração na fase aquosa saturada em n-octanol. Ele relaciona as propriedades hidrofílicas e lipofílicas, demonstrando a tendência à bioacumulação destes compostos, sendo um fator importante na avaliação de riscos, pois em conjunto com os dados de degradação, o potencial de acumulação pode ser usado na identificação dos agrotóxicos que podem ser transportados via cadeia alimentar (BARCELÓ e HENNION, 2003; CABRERA *et al.*, 2008). A acumulação e o transporte de um composto nos organismos vivos estão relacionados a várias características do composto, dentre elas a polaridade, a solubilidade em água e a afinidade com tecidos gordurosos e a natureza da ligação aos receptores biológicos. O K_{OW} é constante para cada composto a uma dada temperatura e não tem unidade. Agrotóxicos com elevado valor de K_{OW} (acima de 10.000), apresentam características lipofílicas e, portanto, possuem maior potencial para acumulação nos organismos (BARCELÓ e HENNION, 2003; EMBRAPA, 2005)

A solubilidade em água é uma propriedade importante para os processos ambientais, pois atua no comportamento, transporte e destino desses compostos, indicando a tendência do agrotóxico em ser carregado superficialmente no solo atingindo águas superficiais. No entanto, este não é o único parâmetro para prever a percolação, devendo ser analisado em conjunto com outras propriedades (SILVA *et al.* 2004; CABRERA *et al.* 2008).

A pressão de vapor de um composto orgânico é definida como a pressão à temperatura em que a fase de vapor (gás) está em equilíbrio com a fase líquida. Quanto mais elevada a pressão de vapor de um agrotóxico, maior será a sua volatilização a uma dada temperatura e maior será o seu potencial para poluir o compartimento atmosférico (BARCELÓ e HENNION, 2003; EMBRAPA, 2005).

Com base nas características físico-químicas dos compostos, é possível prever de maneira geral como o agrotóxico irá se comportar no ambiente. Os agrotóxicos podem apresentar diferentes rotas de degradação e serem transferidos em partes para diferentes compartimentos ambientais (BARBOSA, 2004).

3.2.2 O uso de agrotóxicos no pessegueiro e a ocorrência de resíduos em alimentos

As condições de alta umidade, temperatura amena ou alta incidência de ventos fortes, principalmente na primavera, favorecem a ocorrência e propagação de doenças no pessegueiro. O pessegueiro é frequentemente atacado por fungos e insetos, os quais representam, além das perdas, um custo adicional pela necessidade de pulverizações de agrotóxicos para controle dos mesmos.

Dentre as mais importantes doenças fúngicas está a podridão parda, que em alguns anos, representa mais de 25% das perdas, só na pós-colheita e da bacteriose, cujo controle é difícil, caro e pouco eficiente (EMBRAPA, 2005).

Os insetos representam uma constante ameaça e um desafio ao produtor de pêssego, pois existem inúmeras espécies que, esporádica ou constantemente, causam perdas econômicas significativas. Além dessas perdas diretas, os prejuízos ambientais, principalmente em virtude do uso de inseticidas, devem ser considerados. De acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT), aos produtores

de pêssego é permitida a aplicação de 30 ingredientes ativos sendo que na cidade de Pelotas, 18 desses IAs são utilizados para o controle das doenças.

Destacam-se, independentemente da região do Brasil, os insetos: cochonilha-branca, grafolita e a mosca-das-frutas. Para o controle dessas pragas, pode-se citar o uso dos inseticidas fenitrotiona (contra a cochonilha-branca) e triclorfom (eficaz contra a grafolita) e, contra a mosca-das-frutas, o método usado é o da isca tóxica, os melhores inseticidas são: diazinom, dimetoato, etiom, fenitrotiona, fentiona, malationa, mevinfós e triclorfom (EMBRAPA, 2005).

O uso de agrotóxicos tanto na piscicultura como em outras culturas, se constituíram em uma tecnologia importante para o manejo e o controle das principais pragas. A agricultura brasileira tem se destacado com números cada vez mais expressivos, na produção, em área plantada, na exportação e na quantidade de tecnologias empregadas no campo. Tal crescimento leva também à utilização de maiores quantidades de agrotóxicos na produção agrícola, colocando o Brasil como maior consumidor mundial, posição antes assumida pelos Estados Unidos, segundo dados informados pelo instituto internacional de pesquisa em agronegócios Kleffman Group (SINDAG, 2009).

Com o aumento da produção, do uso de agrotóxicos e em combinação com o desrespeito as Boas Práticas Agrícolas, o aparecimento de resíduos destas substâncias nos alimentos é, atualmente, uma das principais preocupações de saúde pública. Entre os efeitos nocivos causados ao homem, por estas substâncias, pode-se citar: diversos tipos de câncer, danos ao sistema nervoso central, problemas no sistema reprodutivo e locomotor, deficiência mental, entre outros (BARBOSA, 2004).

No Brasil, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), iniciado em 2001 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), avalia continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor.

Em 2010, o último monitoramento de resíduos em alimentos, avaliou 18 tipos de alimentos dentre eles frutas e vegetais. Nesta avaliação, o pêssego que é uma fruta muito bem apreciada e consumida pela população na forma *in natura*, não foi monitorado. De acordo com os dados do monitoramento, 28% das amostras de alimentos foram consideradas insatisfatórias e as principais irregularidades, considerando os IA pesquisados, foram:

- ✓ 1,7% do total de amostras apresentaram resíduos de agrotóxicos em níveis acima do limite máximo de resíduo (LMR);
- ✓ Constatação de 24% de agrotóxicos não autorizados (NA) para a cultura;
- ✓ 1,9% apresentaram resíduos acima do LMR e NA simultaneamente.

O *Codex Alimentarius* define LMR como sendo a concentração máxima do resíduo de um agrotóxico (expresso em mg kg^{-1}) recomendado pelo comitê do *Codex Alimentarius* sobre resíduos de pesticidas (CCPR, do inglês *Codex Alimentarius Committee on Pesticides Residues*) como sendo legalmente permitido no alimento ou na ração animal (FAO, 2005). Para cada produto registrado existe um LMR permitido por lei para cada produto agrícola ou processado, embora no caso do pêssego em calda, não existam limites regulamentares. Esses limites máximos são obtidos com base em estudos realizados, seguindo-se as boas práticas agrícolas (BARBOSA, 2004). No Brasil, a competência para estabelecer os LMR em alimentos, é do Ministério da Saúde através da ANVISA (2010).

Os resultados do estudo do monitoramento apontam para a irregularidade quanto ao uso de agrotóxicos na lavoura brasileira, devido: (1) uso de agrotóxicos não autorizados para determinada cultura, mas cujo IA está registrado no Brasil e com uso permitido para outras culturas; (2) aplicação de um agrotóxico banido do Brasil ou que nunca teve registro no país, logo, sem uso permitido em nenhuma cultura (ANVISA, 2010).

As deficiências nas boas práticas para a utilização de agrotóxicos incorrem no aparecimento de resíduos que, em níveis acima dos LMR, podem representar risco à saúde humana. Portanto, o conhecimento da exposição da população a estes compostos é de fundamental importância para orientar as ações de controle e monitoramento visando a proteção do consumidor (PRESTES, 2007).

3.2.3 Resíduos de agrotóxicos em alimentos processados

Resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais são uma grande preocupação para os consumidores devido aos seus efeitos negativos na saúde (KEIKOTLHAILE *et al.*, 2010).

De acordo com estudos toxicológicos em alimentos, frequentemente os consumidores ficam expostos a vários resíduos de agrotóxicos, ao mesmo tempo, ou

dentro de um curto espaço de tempo. Exposições combinadas aos resíduos de diferentes grupos de agrotóxicos, podem ocorrer em consequência do consumo de um alimento que contenha multirresíduos de agrotóxicos, ou também, a partir de vários tipos de alimentos, cada qual contendo um ou mais tipos de resíduos de agrotóxicos (BOBBIS *et al.*, 2008). Resíduos de agrotóxicos têm sido encontrados em diversos tipos de alimentos, principalmente em alimentos frescos como frutas e vegetais porém, os alimentos processados também tem sido alvo de detecção desses resíduos.

Alguns estudos têm avaliado o efeito do processamento na redução de resíduos em alimentos. Os pesquisadores Holland *et al.* (1994) e Kaushik *et al.* (2009), pesquisaram extensivamente esses efeitos em alimentos. Nestes estudos, os autores estabelecem que as técnicas de processamento como, por exemplo, lavagem, branqueamento, descascamento, cozimento, fervura, processamento térmico, reduzem os níveis de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais, porém, não os eliminam completamente. Dependendo da localização física do resíduo, bem como as propriedades físico-químicas do agrotóxico, como exemplo, solubilidade, volatilidade, constantes de velocidade hidrolíticas, K_{OW} e degradação térmica podem influenciar nos efeitos do processamento (KEIKOTLHAILE *et al.*, 2010).

Há na literatura alguns outros relatos que mostram que as operações de processamento reduziram os níveis de agrotóxicos em culturas como tomate, brócolis, feijão e espinafre (ELKINS, 1989; CHIN, 1991). Em batatas foram encontradas alterações nas concentrações de resíduos de agrotóxicos durante a lavagem, descascamento e cozimento (SOLIMAN, 2001).

Um estudo em 2004, na Espanha, avaliou os níveis residuais de agrotóxicos antes e após o processamento. Foram realizados testes em campo onde foram plantadas mudas de pessegueiro, tomate, pimentão vermelho, aspargos, espinafre e alcachofra. Sob essas culturas, os agrotóxicos lindano, clorpirifos, cialotrin, cipermetrina, deltametrina, mancozebe, manebe, propinebe, acefato e tiram, foram pulverizados. Os alimentos após colheita foram processados em uma planta piloto. Para os tomates, a lavagem removeu todos os resíduos a níveis indetectáveis; para o pimentão, o processo de assar reduziu em 67% os resíduos de clorpirifos e a descamação reduziu a níveis não detectáveis; para os aspargos a lavagem não alterou os níveis, o descascamento reduziu em 60% de clorpirifos, após o

branqueamento e o processamento térmico observou-se que resíduos não foram detectados; para a alcachofra, resíduos de acefato ($0,28 \text{ mg kg}^{-1}$), que eram ligeiramente acima do LMR, foram completamente removidas por branqueamento. Quanto ao pêssigo, houve um aumento na concentração de acefato após a lavagem (de $0,01$ para $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$) e depois do processo térmico os resíduos foram reduzidos a níveis indetectáveis (CHAVARRI *et al.*, 2004).

DORS *et al.* (2011) avaliaram a distribuição dos agrotóxicos bispiribaque de sódio, carbofurano, clomazona e tebuconazol nas diferentes frações do arroz beneficiado (arroz branco, farelo de arroz, arroz com casca, arroz parboilizado beneficiado, farelo de arroz parboilizado e arroz parboilizado com casca). Ao comparar os processos, a moagem dos grãos não afetou a quantidade de resíduos para o bispiribaque de sódio e clomazona. O mesmo não ocorreu com carbofurano e tebuconazol. O processo de parboilização teve efeito diferente dependendo dos agrotóxicos. Nos casos de redução a alta temperatura ($100 \text{ }^{\circ}\text{C}$) proveniente do processo de parboilização, deveu-se a inativação ou degradação dos compostos.

ATHANASOPOULOS *et al.* (2005) concluíram que no processo de secagem em uvas, resíduos de metamidafos, reduziram até 72% devido às perdas por evaporação durante o processo.

HOLLAND *et al.* (1994) obtiveram um percentual de redução de resíduos de HCB, lindano, p,p-DDT, dimetoato, profenofos, pirimifos metil, de 72 a 77% pelo processo de extração para suco de uva. Os autores explicam que os níveis de resíduos de agrotóxicos em sucos de frutas ou obtidos de uvas, dependem das propriedades do agrotóxico entre o particionamento das peles das frutas/polpa e o suco. A polpa ou o bagaço frequentemente incluem pele e assim, retém uma proporção substancial de resíduos lipofílicos.

UYGUN *et al.* (2007) através do processo de estocagem por aproximadamente seis meses, obtiveram uma redução de 65 a 72% de resíduos de malationa, isomalationa e malaoxon em amostras de cevada.

KONTOU *et al.* (2004) mostraram que em amostras de tomate, houve uma redução de resíduos de manebe de 74% por processo de cozimento a $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Os autores justificam que em processos que envolvem o calor, pode ocorrer o aumento da volatilização, hidrólise ou degradação química e portanto, reduzir os níveis de resíduos de agrotóxicos.

A investigação sobre a ocorrência de resíduos de agrotóxicos em alimentos após as etapas do processamento é útil para avaliar o risco de contaminação para a saúde do consumidor bem como, para estabelecer limites máximos de resíduos nesses alimentos.

3.3 Técnicas cromatográficas

A cromatografia compreende um grupo diversificado e importante de métodos que permitem a separação, identificação e quantificação de componentes muito semelhantes de misturas complexas, por si mesma ou acoplada com outras técnicas instrumentais de análise, tais como, a espectrofotometria e a espectrometria de massas (SKOOG, 2009; COLLINS *et al.*, 2006).

A cromatografia encontra aplicação em todos os ramos da ciência, e pode ser conceituada como um método físico-químico de separação no qual os constituintes da amostra são particionados entre duas fases, uma estacionária, geralmente de grande área, e a outra, móvel, um fluido insolúvel na fase estacionária, que percola através da primeira (CIOLA, 1998; SKOOG *et al.*, 2002). Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes (COLLINS *et al.*, 2006).

As técnicas cromatográficas podem ser classificadas como cromatografia líquida, gasosa, por troca iônica, por exclusão e por bioafinidade.

3.3.1 Cromatografia a gás

Na cromatografia a gás, os componentes de uma amostra vaporizada são separados em consequência de sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase líquida ou sólida contida em uma coluna, fase estacionária (FE). Os processos físicos envolvidos na separação são de sorção: adsorção ou absorção (partição). Se a fase estacionária for um sólido (cromatografia gás-sólido), ocorre a adsorção dos compostos, ou mais comumente, um filme de um líquido pouco volátil, suportado sobre um sólido inerte (cromatografia gás-Líquido) ou sobre a própria parede do tubo

(Cromatografia Gasosa de Alta Resolução). No caso de um líquido ocorre a partição. Na cromatografia gás-líquido, os dois fatores que governam a separação dos constituintes de uma amostra são: (1) a solubilidade na FE: quanto maior a solubilidade de um constituinte na FE, mais lentamente ele se desloca pela coluna; (2) a volatilidade: quanto mais volátil a substância (ou, em outros termos, quanto maior a pressão de vapor), maior a sua tendência de permanecer vaporizada e mais rapidamente se desloca pelo sistema.

A amostra líquida volátil ou gasosa é injetada através de um septo (disco de borracha) para dentro de uma entrada de injeção aquecida (injetor), vaporizando rapidamente. O vapor é arrastado através da coluna por meio de um gás de arraste (fase móvel) que pode ser He, N₂ ou H₂, o qual é específico para cada detector (HARRIS, 2005).

Em contraste com muitos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas dos analitos; sua única função é transportar o analito através da coluna. O fluxo de gás com a amostra vaporizada, passa por um tubo que contém a fase estacionária (coluna cromatográfica) onde ocorre a separação da mistura. A coluna deve estar suficientemente aquecida para proporcionar uma pressão de vapor que possibilite a eluição dos analitos em um tempo razoável. O forno cromatográfico é o responsável tanto pelo aquecimento quanto por manter a coluna aquecida. As substâncias separadas eluem da coluna dissolvidas no gás de arraste e passam por um detector; dispositivo que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluído. O detector é mantido em uma temperatura maior do que a da coluna, de modo que todos os analitos permaneçam na forma gasosa (HARRIS, 2005). O registro deste sinal em função do tempo é o cromatograma, sendo que as substâncias aparecem nele como picos com área proporcional à sua massa, o que possibilita a análise quantitativa. Os compostos separados por GC devem ser gases ou substâncias voláteis e termicamente estáveis. Quando os compostos não apresentam essas características, caso em que tem elevada massa molecular e/ou contendo grupos funcionais fortemente polares há necessidade de derivatização (COLLINS *et al.*, 2006).

Alguns critérios devem ser levados em consideração em análises por GC. A injeção da amostra deve ser feita de tal maneira que se obtenha uma banda única e estreita. A quantidade de amostra injetada não deve ultrapassar a capacidade da

coluna, que é determinada pela quantidade de fase estacionária. As amostras, que podem ser líquidas ou gases, são injetadas utilizando microseringas e seringas ou válvulas, respectivamente (COLLINS *et al.*, 2006). A injeção através de um septo, que pode ser de silicone ou politetrafluoretileno (PTFE), com o emprego de microseringas são as mais utilizadas e apresentam repetitividade de $\pm 1\%$ (COLLINS *et al.*, 2006).

Diferentes modos de injeção podem ser utilizados. Em colunas capilares, podem ser encontrados injetores tipo com divisor/sem divisor da amostra (S/SL do inglês, *split/splitless*), onde a divisão da amostra é realizada de acordo com a taxa *split* escolhida; e injetores *on column*, onde a amostra é injetada diretamente na coluna, com modos de injeção à frio (*cold-on column*) e vaporização com programação de temperatura (OCI/PTV, do inglês *On Column Injector/ Programmed Temperature Volatilisation*);

A grande maioria das análises por GC é realizada em colunas capilares estreitas e compridas, as quais oferecem maior resolução, menores tempos de análise e maior sensibilidade do que as colunas empacotadas, mas têm menor capacidade de amostra (HARRIS, 2008). A escolha do gás de arraste, depende da disponibilidade, pureza e consumo do gás, além do tipo de detector utilizado (MENDHAM *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, vários avanços na área de instrumentação possibilitaram aos equipamentos um aumento de sensibilidade. Entre esses avanços, pode-se citar o desenvolvimento de sistemas de injeção de grandes volumes (LVI - *Large Volume Injection*), que permitem a injeção de uma maior quantidade de extrato e conseqüentemente de analitos, promovendo um aumento significativo de sensibilidade (PRESTES *et al.*, 2009).

Os detectores mais utilizados em cromatografia gasosa são: detector por ionização em chama (FID, do inglês *Flame Ionization Detector*), detector por condutividade térmica (TCD, do inglês *Thermal Conductivity Detection*), detector por captura de elétrons (ECD, do inglês *Electron Capture Detector*), detector termoiônico (TID, do inglês *Thermionic Ionization Detector*), detector fotométrico de chama (FPD, do inglês *Flame Photometric Detector*) e o espectrômetro de massas (MS, do inglês *Mass Spectroscopy*).

3.3.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma ferramenta que tem sido utilizada há muito tempo e é, atualmente, uma técnica poderosa de detecção para a cromatografia, pois o espectrômetro é sensível a pequenas quantidades do analito, fornece informações qualitativas e quantitativas sobre os compostos que são eluídos a partir de uma coluna, e pode distinguir substâncias diferentes com o mesmo tempo de retenção (HARRIS, 2003). O espectrômetro de massas é constituído de três partes: fonte de ionização, muitas vezes denominada interface, analisador de massas e detector de íons com aquisição/processamento de dados. Após a injeção da amostra no espectrômetro de massas, as moléculas da amostra entram em uma fonte de ionização que as ioniza. As fontes de ionização são energéticas o suficiente para quebrar as ligações químicas das moléculas da amostra, produzindo fragmentos os quais podem também ser ionizados. Uma vez formados os íons, eles são analisados pelo analisador de massas de acordo com a sua razão massa/carga (COLLINS, 2006).

As fontes de ionização mais comum em GC-MS para determinação de agrotóxicos são: Ionização por Impacto de elétrons (EI, do inglês *Electron Ionization*) e Ionização Química (CI, do inglês *Chemical Ionization*), positiva ou negativa. As vantagens da utilização do modo EI são a baixa influência da estrutura molecular na resposta e o grande número de fragmentos característicos que são gerados. Entretanto, o modo CI positivo ou negativo proporciona uma melhor seletividade para muitos agrotóxicos quando comparado com o modo EI. O modo CI é preferencialmente utilizado para a determinação de organo-halogenados, piretróides e organofosforados. Este modo é menos utilizado em métodos multirresíduo, por não ser uma técnica de ionização universal, além de fornecer espectros contendo um pequeno número de fragmentos, oferecendo menos informação qualitativa (PRESTES *et al.*, 2009).

3.3.3 Ionização por impacto de elétrons (EI)

A ionização eletrônica ou também conhecida como impacto de elétrons, é a técnica de ionização mais comumente utilizada em GC-MS, por ser uma poderosa

ferramenta para análises qualitativas e quantitativas. Neste tipo de ionização, a substância a ser analisada é introduzida na câmara de ionização do Espectrômetro de Massas onde as moléculas são vaporizadas. Um feixe de elétrons é emitido a partir de uma corrente que passa através de um filamento de tungstênio aquecido, os elétrons são acelerados por um campo elétrico, os quais colidem com as moléculas neutras na fase gasosa provenientes da coluna cromatográfica (HERBERT & JOHNSTONE, 2002; VÉKEY, 2001).

Para formar íons carregados positivamente, a energia média dos elétrons deve ser superior ao potencial de ionização da molécula neutra. Embora a maioria dos potenciais de ionização para compostos orgânicos estejam na faixa de 8-12 eV, para análise de rotina e estudos comparativos uma voltagem de 70 eV é aplicada. Em torno deste valor de energia, a eficiência de ionização (formação de íons) é constante (HERBERT & JOHNSTONE, 2002; VÉKEY, 2001).

A utilização de condições controladas para obtenção de espectros de massas em um sistema GC-MS permite a comparação entre laboratórios e a construção de bibliotecas de espectros de massas de uso universal. Estas bibliotecas permitem uma rápida comparação dos espectros através da utilização de algoritmos específicos de busca e comparação das intensidades relativas dos íons registrados no espectro de massa.

Alguns equipamentos permitem a variação da energia do feixe de elétrons da fonte de ionização. Ao reduzir esta energia é obtida uma menor fragmentação das moléculas do analito e espectros de massas mais simples são obtidos. Entretanto, o aumento da energia (acima de 70 eV) leva à uma maior fragmentação das moléculas, podendo ocorrer perda relativa de sensibilidade. Tanto no caso da utilização de energias menores quanto maiores que 70 eV, os espectros de massas não são comparáveis às bibliotecas padronizadas (HERBERT & JOHNSTONE, 2002; VÉKEY, 2001).

Com a ionização, os íons moleculares cátion radical formados inicialmente, contém um excesso de energia que não é igual para todos os íons. A saída da fonte de íons é um fluxo de íons gasosos positivos (o mais comum) ou negativos, que são então acelerados para dentro do analisador de massas (SKOOG, 2009). Existem vários tipos de analisadores de massas: que são utilizados para selecionar e filtrar os íons, sendo eles: rádio frequência (tanto quadrupolo quanto trapeamento de íons);

tempo de voo; transformada de Fourier e setor magnético, sendo que os mais utilizados são a rádio frequência e o tempo de voo. (PRESTES *et al.*, 2009). Suas abundâncias relativas são registradas, gerando o espectro de massas (intensidade vs m/z).

3.3.4 Espectrometria de massas

O espectrômetro de massas é um dos detectores mais poderosos para GC (SKOOG, 2006). A espectrometria de massas é uma técnica usada para o estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas. Para obter um espectro de massas, as moléculas no estado gasoso ou as espécies dessorvidas a partir de fases condensadas são ionizadas. As moléculas da amostra ionizadas entram no espectrômetro de massas pelo sistema de entrada. No caso da GC, a amostra está na forma de vapor e a entrada deve ser interfaceada entre a pressão atmosférica do sistema de GC e a baixa pressão (10^{-5} a 10^{-8} Pa) do sistema do espectrômetro de massas (SKOOG, 2006). Um sistema de vácuo é necessário de modo a evitar que os íons sejam defletidos por colisões com moléculas do gás residual (HARRIS, 2008).

Os modos de operação são as maneiras como o espectrômetro de massas pode ser programado para a aquisição de dados. No modo *scan* o MS é programado de forma a analisar todas as massas do seu espectro de operação ou dentro de uma faixa determinada de m/z (VÉKEY, 2001). No modo SIM (do inglês, *Single Ion Monitoring*) após a ionização o MS faz a separação de somente um íon específico, o que aumenta a sensibilidade, uma vez que os íons correspondentes ao ruído são ejetados sem chegar ao detector. Em alguns equipamentos podem ser selecionados até três íons simultaneamente (VÉKEY, 2001).

A Figura 2 representa os componentes básicos de um espectrômetro de massas.

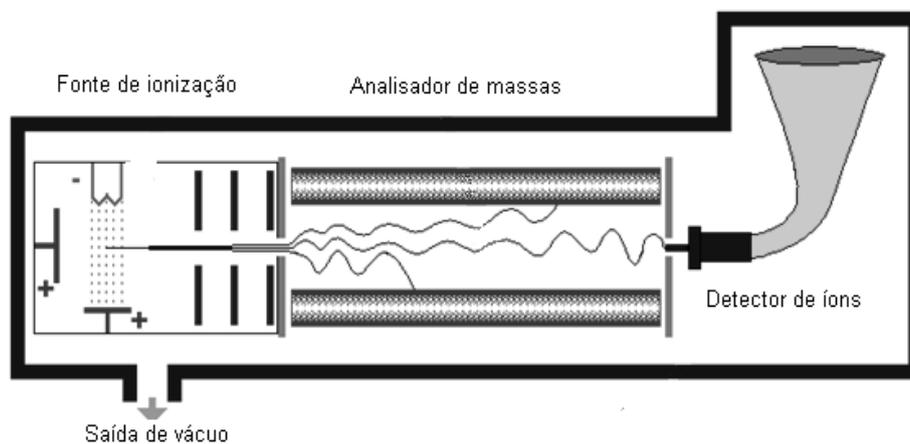


Figura 2 - Componentes básicos de um espectrômetro de massas

A GC-MS é uma das principais ferramentas aplicadas em análise de resíduos de agrotóxicos por permitir que a confirmação e a determinação de um grande número de compostos sejam realizadas simultaneamente. Atualmente, a técnica GC-MS é utilizada com frequência para determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos. A facilidade do acoplamento GC-MS, além da disponibilidade de um banco de espectros de massas padrão obtidos no modo de ionização por impacto de elétrons ajudou na disseminação da técnica GC-MS (PRESTES *et al.*, 2009).

Os baixos LODs obtidos são consequência da alta seletividade promovida pelo uso de diferentes modos como, por exemplo, o modo SIM que tem sido utilizado para determinar resíduos de agrotóxicos em alimentos (PRESTES *et al.*, 2009).

O sistema básico de um cromatógrafo acoplado à espectrometria de massas é representado na Figura 3.

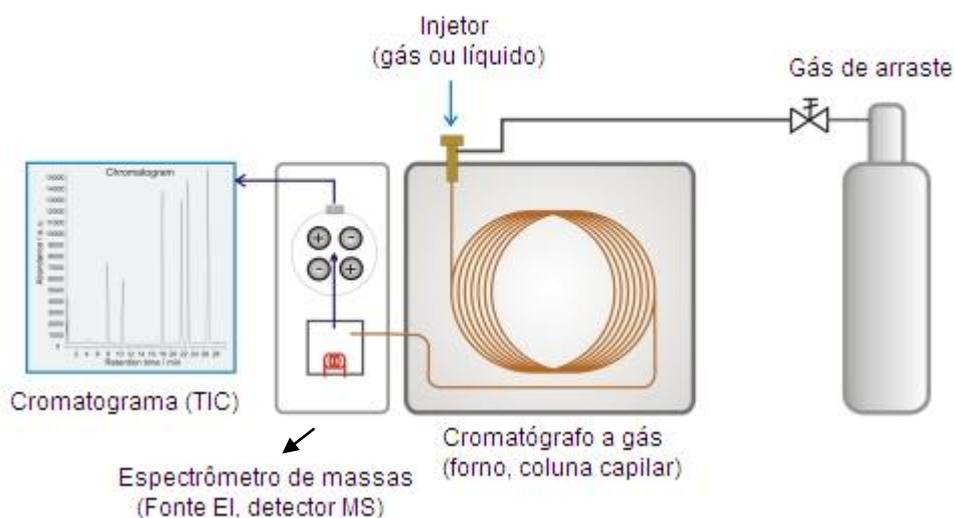


Figura 3 – Componentes de um GC-MS com fonte de ionização EI

3.4 Preparo de amostra

A etapa de preparo de amostra consiste principalmente em, promover a extração e o enriquecimento dos analitos e a remoção, tanto quanto possível, dos interferentes.

Os passos típicos na etapa do preparo de amostra incluem amostragem, homogeneização, extração, limpeza do extrato (*clean-up*) e concentração antes da determinação. Portanto, o preparo de amostras é uma etapa crucial e determinante dentro de todo o processo analítico (CHEN *et al.*, 2008).

3.4.1 Métodos multirresíduos para extração de agrotóxicos em alimentos

Os alimentos apresentam matrizes complexas, propriedades químicas distintas e baixa concentração de analitos, e por isso, requerem uma etapa fundamental de preparo de amostras. Assim, para a determinação de agrotóxicos, faz-se necessário o emprego de métodos multirresíduo de fácil aplicação e de eficiência adequada para superar os limites impostos pela legislação. O método selecionado para uma análise multirresíduo deve garantir, baixos limites de detecção e fornecer exatidão e precisão para um amplo número de analitos. Os avanços da química analítica em concordância

com o conceito de sustentabilidade, levaram ao desenvolvimento de várias técnicas de extração. A Tabela 2, apresenta algumas das técnicas de preparo de amostra modernas utilizadas para determinação de agrotóxicos em matrizes alimentares.

Tabela 2- Comparação entre os métodos modernos de preparo de amostra para determinação de agrotóxicos em alimentos

Técnica	Vantagens	Desvantagens
Extração assistida por microondas (MAE- do inglês <i>Microwave-Assisted Extraction</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Fácil realização; ✓ Extração simultânea de várias amostras; ✓ Pequenas quantidades de solventes; ✓ Tempo curto de extração. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Extração de insuficiente seletividade; ✓ Etapa de limpeza necessária; ✓ Compostos termolábeis não pode ser usada; ✓ Tempo de espera para resfriamento.
Extração por solvente acelerado (ASE- do inglês <i>Accelerated solvent Extraction</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Extrações podem ser automatizadas, diminuindo erros pelas etapas do processo por serem de forma idêntica; ✓ Tempo curto de extração; ✓ Consumo moderado de solventes; ✓ Simplicidade de preparo de amostra antes da análise. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Elevados custos de manutenção e aquisição do instrumento; ✓ Baixa seletividade de extração; ✓ Limpeza de extrato e de equipamento após cada uso.
Dispersão da matriz em fase sólida (MSPD- do inglês <i>Matrix solid-phase Dispersion</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Custo relativamente baixo por análise; ✓ Equipamento simples; ✓ Realização simultânea de várias análises; ✓ Pode ser utilizada <i>in situ</i>; ✓ Pouca quantidade de solventes. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Geralmente obtém-se LODs não muito baixos; ✓ Algumas vezes baixa recuperação dos analitos; ✓ Não se torna muito ideal para amostras secas ou ricas em lipídios.
Micro extração em fase sólida (SPME- do inglês <i>Solid-phase Microextraction</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Utilização de solventes pode ser eliminada; ✓ Capacidade de adsorvente limitada; ✓ Possibilidade de re-executar repetidamente a análise de uma amostra; ✓ Possibilidade de utilizar uma fibra muitas vezes sem perda de adsorbado; ✓ Cromatógrafos com injetores comuns podem ser usados sem grandes mudanças na concepção . 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Não garante uma gama suficientemente ampla de análise em um único procedimento; ✓ Problemas com a reprodutibilidade; ✓ Problemas frequentes com a otimização de método; ✓ Recuperações de analitos relativamente baixas.
Extração por fluido super crítico (SFE- do inglês <i>Supercritical fluid extraction</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Redução no consumo de solvente; ✓ Extração de compostos termolábeis; ✓ Não resulta na degradação dos compostos analisados; ✓ Realização de extração fracionada; ✓ Tempo curto de extração; ✓ Dispositivo que permite a extração no modo semi-automático. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Custo elevado para aquisição e manutenção; ✓ Baixa seletividade de extração; ✓ Elevado tempo de limpeza do equipamento após cada uso; ✓ Relativamente complicado quando comparado à outras técnicas de extração.

Referência: adaptado de WILKOWSKA e BIZIUK, 2011.

Uma importante etapa no preparo da amostra é a purificação dos extratos. Constituintes da matriz podem ser co-extraídos e posteriormente co-eluídos com os compostos que serão analisados e, conseqüentemente, interferir na avaliação da análise (LEDOUX, 2011). A limpeza do extrato minimiza problemas, permite resultados mais exatos e precisos, além de possibilitar o aumento da vida útil das colunas capilares. Várias técnicas de purificação são aplicadas para eliminar interferências co-extraídas dos extratos de amostras de frutas e vegetais, incluindo Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*), Extração dispersiva em Fase Sólida (d-SPE, do inglês *Extraction Dispersive Solid-Phase*) e Cromatografia por Permeação em Gel (GPC, do inglês *gel permeation chromatography*) (KINSELLA *et al.*, 2009; LEDOUX, 2011).

Com o objetivo de superar limitações práticas dos métodos multirresíduo existentes, um novo procedimento de preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos foi introduzido no ano de 2003, por Anastassiades *et al.* sendo denominado QuEChERS (PRESTES *et al.*, 2009).

O método QuEChERS em conjunto com a d-SPE, tem se destacado dentre os métodos de preparo de amostra para a extração de agrotóxicos em diversos tipos de alimentos. Este método simplifica as etapas de preparo, bem como a quantidade de solventes e de vidraria utilizada, proporcionando a extração dos analitos e a limpeza dos extratos (RODRIGUES, 2010). O método QuEChERS é discutido na seção a seguir.

3.4.2 Método QuEChERS original

O método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) demonstra suas características de ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro.

Entre as principais vantagens deste método com relação aos métodos tradicionais estão: altos valores de recuperações para uma ampla faixa de agrotóxicos; elevado grau de exatidão e precisão; preparo de um grande número de amostras em um curto período de tempo; redução no volume de solventes orgânicos e simplicidade de operação (LEHOTAY *et al.*, 2005). Além disso, o método QuEChERS foi idealizado para gerar extratos que pudessem ser analisados por

Cromatografia Líquida e/ou Cromatografia Gasosa acopladas à Espectrometria de Massas (GC-MS e LC-MS) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

O método baseia-se nas seguintes etapas: extração, partição e limpeza. Um novo método de limpeza d-SPE foi proposto juntamente com o método QuEChERS. Na Figura 4, estão representadas as principais etapas do método QuEChERS original.

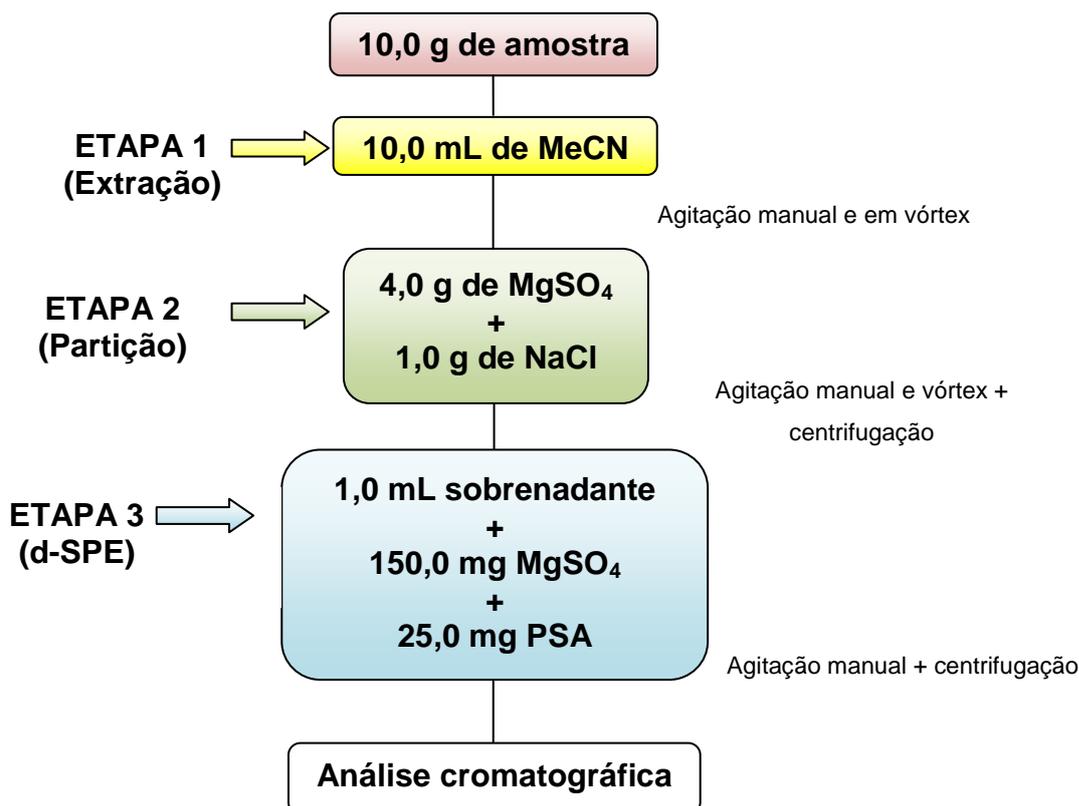


Figura 4 - Representação do método QuEChERS Original

✓ Massa de amostra

A escolha da massa de amostra deve garantir representatividade estatística ao resultado final. Para o método QuEChERS a quantidade de amostra escolhida no desenvolvimento foi de 10 g, sendo esta considerada ideal quando comparada a quantidades de 15 a 100 g normalmente utilizadas em outros métodos multirresíduo (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009).

✓ Extração

A utilização de acetonitrila como solvente possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos (MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004). A acetonitrila proporciona a extração de uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades e, quando acidificada, permite recuperações satisfatórias de agrotóxicos que geralmente apresentam problemas de estabilidade. Outra grande vantagem é que acetonitrila é mais adequada para LC-MS do que acetona e acetato de etila e pode ser utilizada sem problemas na análise por GC-MS. Assim, acetonitrila foi escolhida como solvente de extração para o método QuEChERS (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; LEHOTAY *et al.*, 2005).

A agitação manual ou com auxílio do Vortex possui várias vantagens em relação à agitação mecânica, tais como, possibilidade de realizar a extração a campo; a extração ocorre em um único frasco fechado não expondo o analista; rapidez, uma vez que não há necessidade de lavagem do homogeneizador no intervalo entre as extrações.

✓ Particionamento entre as fases

A adição de sais para promover o efeito “salting out” é utilizada em vários métodos multirresíduo. Dependendo da natureza do solvente utilizado na etapa de partição obtém-se melhores percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, bem como, a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (GHIP, 1996; STAHN, 2000; PIZZUTTI *et al.*, 2007).

A utilização de sais secantes como sulfato de sódio (Na_2SO_4) tem a finalidade de melhorar a recuperação de agrotóxicos polares (ANDERSSON & PALSHEDEN, 1991). A escolha do MgSO_4 no desenvolvimento do método QuEChERS foi devido a maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais. Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Nos métodos multirresíduo que utilizam acetona, a partição é controlada através de uma combinação de NaCl e solventes apolares, porém têm como

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

✓ Limpeza (*clean-up*)

A etapa de limpeza é realizada para remover co-extrativos que posteriormente possam afetar a confiabilidade dos resultados. Componentes não voláteis da matriz podem aderir ao sistema de injeção e também a coluna cromatográfica, aumentando a frequência de manutenção, além de alterar a resposta do sistema (LEHOTAY *et al.*, 2007; PRESTES *et al.*, 2009). A etapa de limpeza ocorre simultaneamente com a remoção de água residual na d-SPE. Esta etapa de remoção de água proporciona um extrato final de menor polaridade, facilitando a precipitação de co-extrativos polares.

O sorvente retém as interferências da matriz sendo que, após agitação manual e centrifugação, o extrato está apto para ser injetado no sistema cromatográfico. Nessa etapa de limpeza, algumas vezes pode diminuir a recuperação devido à perda dos analitos mais polares que são eliminados junto com os interferentes, ou então por ficarem retidos no material sorvente. O sorvente PSA (Primary Secondary Amine) retém as interferências da matriz, sendo que depois da agitação manual e centrifugação o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). A estrutura bidentada do PSA tem um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário. Como resultado, a retenção de ácidos graxos livres e de outros compostos polares presentes na matriz é muito forte. Uma limpeza eficiente garante uma maior vida útil para insensores e colunas cromatográficas, reduzindo assim a contaminação do sistema cromatográfico e minimizando o efeito matriz (MARTINEZ-VIDAL *et al.*, 2006; SHIMELIS *et al.*, 2007).

Os tubos usados na d-SPE podem conter além do PSA, Carbono grafitizado (GCB- do inglês Graphitised Carbon Black) e o C18. PSA retém também pigmentos polares e açúcares. GCB é eficiente para remoção de pigmentos como clorofila e esteróis, além destes, GCB também retém agrotóxicos planares. E o C18 é usado para remoção de compostos apolares, assim como lipídios (WILKOWSKA e BIZIUK, 2011).

Desde seu desenvolvimento o método QuEChERS tem sofrido diferentes modificações para ser empregado na determinação de diferentes analitos em diferentes matrizes. Como um método multirresíduo para determinação de agrotóxicos em alimentos, empregando métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas, uma ampla aplicabilidade vem sendo observada em inúmeras publicações da área.

Dentre as diversas modificações encontradas na literatura para o método QuEChERS, destacam-se os métodos QuEChERS citrato e acetato.

3.4.3 Métodos QuEChERS citrato e acetato

Apesar de a versão original ter demonstrado excelentes resultados em diferentes tipos de amostras (LEHOTAY *et al.*, 2005a; CVUA, 2006; PAYÁ *et al.*, 2007) algumas aplicações mostraram que certos compostos apresentavam problemas de estabilidade e/ou recuperação de acordo com o pH da matriz (LEHOTAY *et al.*, 2005ab; ANASTASSIADES *et al.*, 2007). Desta forma, durante o período de otimização do método, percebeu-se que a utilização de tampões (pH 5,0) promoviam recuperações satisfatórias (>70%) para compostos dependentes do pH (por ex.: pimetozina, imazalil e tiabendazol), independente da matriz utilizada (LEHOTAY, 2005b; ANASTASSIADES *et al.*, 2007).

Em geral, os agrotóxicos são estáveis em pH ácido, porém alguns compostos, apresentam baixos percentuais de recuperação quando em pH ácido, devido ao fato de estarem protonados e solubilizados na fase aquosa, não sendo recuperados na etapa de partição. O pH é importante tanto para compostos sensíveis em meio ácido como aqueles sensíveis à degradação em meio alcalino. Dessa forma, recomenda-se uma faixa de pH entre 4 e 5 uma vez que, a mesma proporciona boas recuperações para agrotóxicos sensíveis em meio ácido, além de garantir estabilidade para aqueles sensíveis em meio alcalino (LEHOTAY, *et al.*, 2005).

As frutas e os vegetais apresentam um pH natural que varia entre 2,5 e 6,5. Portanto, o ajuste do pH também está relacionado à presença de co-extrativos na fase orgânica, uma vez que se observa uma maior presença de gordura e ácidos graxos quando a extração é efetuada em meio ácido (PRESTES *et al.*, 2009).

A adição de uma etapa de tamponamento foi a primeira modificação proposta para o método QuEChERS, com o objetivo de melhorar os percentuais de recuperação (70-120%) (MAJORS, 2010). Lehotay *et al.* (2005) desenvolveram o método “QuEChERS-acetato”, no qual o efeito tamponante (pH 4,8) é promovido pela adição de acetato de sódio. Este método foi adotado em 2007 como método oficial da Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (AOAC, 2007). Anastassiades *et al.* (2007) propuseram o método “QuEChERS-citrato”, este utiliza uma mistura de citrato de sódio di e sesquiidratados como responsáveis pelo efeito tamponante (pH 5,0-5,5). Em 2008, o European Committee for Standardisation, oficializou o método “QuEChERS citrato” como método de referência na UE (CEN, 2008).

Na Figura 5 estão representados os procedimentos dos métodos acetato e citrato, respectivamente.

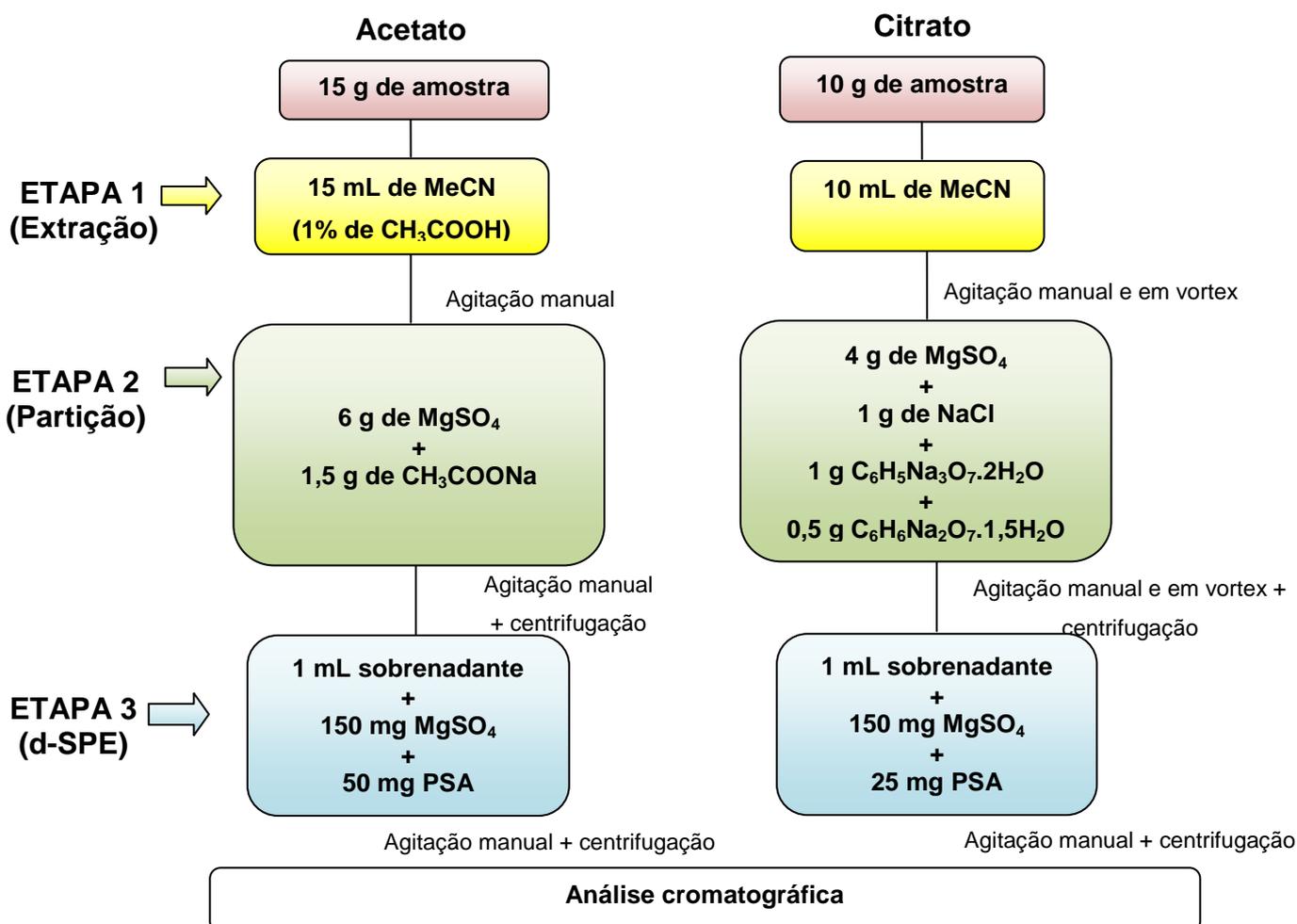


Figura 5 - Procedimento dos métodos QuEChERS acetato e citrato

3.4.4 Determinação de agrotóxicos em pêssego

De modo geral, as perdas na agricultura são imensas, devido a ação de pragas. Os agrotóxicos, desde seu desenvolvimento, desempenharam um importante papel no crescimento da agricultura moderna. No entanto, alguns autores sugerem que a ingestão diária de alimentos contaminados é a principal rota de exposição à agrotóxicos (HOWSAN *et al.*, 2004; OTAKE *et al.*, 2009). Portanto, a preocupação com a saúde humana e segurança alimentar, promove o desenvolvimento de vários métodos analíticos aplicados à determinação de resíduos destes compostos em diferentes tipos de alimentos (PANG *et al.*, 2006). A análise de resíduos de agrotóxicos, além de ser um instrumento de proteção a saúde humana está também relacionada a fatores econômicos. Atualmente, estima-se que no mundo, cerca de 20.000 análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos sejam realizadas todos os dias (PICÓ *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, vários trabalhos abordaram a determinação de agrotóxicos em pêssego *in natura* e em sucos processados. Cabe salientar, que para a matriz de pêssego em calda, sendo ela um alimento processado, não encontram-se relatos na literatura. Na Tabela 3, são apresentados, alguns trabalhos que determinaram agrotóxicos em matrizes de pêssego (*in natura* e suco processado), bem como em outras frutas e sucos de frutas, comparando técnicas de preparo de amostra e determinação, com detecção de resíduos de agrotóxicos.

Tabela 3 - Métodos utilizados para determinação de agrotóxicos em matrizes de pêssego

Matriz	Agrotóxico	Extração	Determinação	Exatidão/ Precisão	LOQ (mg kg ⁻¹ ou mg L ⁻¹)	Detectou resíduos (mg kg ⁻¹)	Autor/ Ano
Pêssego, uva, Kiwi, morango, espinafre, limão e nectarina	38	Acetato de etila Sem limpeza	LC-MS/MS	63-96% 20%	0,005 – 0,8	Uva: azoxistrobina (0,23) Limão: carbendazim (0,3), imazalil (1,5), tiabendazol (2,10) e 2-fenilfenol (2,10) Morango: penconazol (0,05) pirimetanil (0,19), miclobutanil (0,53) Pêssego: tebuconazol (0,1) Kiwi: carbaril (0,1)	TAYLOR M.J., <i>et al.</i> 2002
Pêssego e nectarinas	4	Acetato de etila Sem limpeza	LC-APCI-MS	64-108% < 14%	0,02	Imidacloprido média de concentração 0,05 e carbendazim com 0,25	BLASCO C., <i>et al.</i> 2002
Pêssego, pepino, morango, laranja, alface cenoura e abobrinha	23	QuEChERS + d-SPE	GC-MS	85-101% <5%	0,01-0,1	----	ANASTASSIADES M., <i>et al.</i> 2003
Pêssego e damasco	6	Acetona e diclorometano Sem limpeza	GC-MS	73-145% < 5%	0,02 – 0,2	Clorpirifos em damasco (0,01 a 0,06) Parationa metilica em pêssego (0,02 a 0,07) Bromopropilato (0,36) Fosalona (0,14) Azinfos metilica (0,05)	LIAPIS, K.S., <i>et al.</i> 2003
Pêssego, nectarina, laranja e tanjerina	10	PLE Sem limpeza	LC-IT-MS ³	58-97% < 19%	0,025 – 0,25	Carbendazim foi frequente em pêssego (0,09 a 0,76) e laranja (0,01 a 0,16) Imidacloprido em pêssego (0,02 a 0,17)	BLASCO C., <i>et al.</i> 2005
SUCO: Pêssego, laranja, maçã, abacaxi, multifrutas	90	QuEChERS ACETATO + SPE	UPLC-MS/MS	70-108% < 20%	< 0,005	26% das amostras de todos os sucos, porém inferiores aos LMR	ROMERO-GONZÁLEZ, R., <i>et al.</i> 2008
SUCO: Pêssego, Framboesa, maçã, laranja	12	MSPD	LC-MS	71-118% < 15%	0,00003 – 0,00312	90% dos sucos continham resíduos. Dimetoato foi encontrado em 22% das amostras < LMR	RADISIC M., <i>et al.</i> 2009

3.5 Validação de métodos analíticos

A validação de um método é uma exigência na prática de análises químicas, e tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (EURACHEM, 1998; BRASIL, 2003).

Um laboratório deve produzir resultados analíticos confiáveis. O analista, no seu dia a dia, deve preocupar-se em obter resultados que afastem qualquer dúvida com respeito a sua exatidão e que possuam precisão adequada para a finalidade a que se destinam (SOARES, 2001 apud CALDAS, 2009). Para que esta confiabilidade seja atingida, o primeiro passo está na validação do método analítico escolhido. É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (INMETRO, 2003).

RIBANI *et al.* (2004) apresentaram, de maneira clara e objetiva, a validação de métodos como sendo um processo contínuo de avaliação dos métodos, desde a etapa de planejamento, passando pelo desenvolvimento e coleta de dados, até o monitoramento constante da aplicação e transferência deste.

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003.

Assim, deve-se selecionar, estudar e monitorar constantemente os parâmetros mínimos necessários para garantir a interpretação precisa dos resultados. Alguns dos parâmetros envolvidos no processo de validação de métodos analíticos são: curva analítica, linearidade, exatidão, precisão (repetitividade e intermediária) e limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). Além destes parâmetros, o efeito matriz (EM) também é um critério adotado seguindo os critérios de validação SANCO (2010).

3.5.1 Limites de Detecção (LOD) e Limites de Quantificação (LOQ)

Os termos Limite de Detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) e o Limite de Quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) são utilizados para demonstrar a habilidade do método em detectar e quantificar baixas concentrações de um analito.

O LOQ é o menor valor de concentração em que o analito pode ser quantificado com certo limite de confiança, ou seja, abaixo deste valor medições não apresentam suficiente confiança para quantificação (THOMPSON *et al.*, 2002). O método para determinação do LOQ deve ser considerado com a incerteza da medida de um componente dentro de um intervalo linear (RIBANI *et al.*, 2004).

O LOD e o LOQ podem ser estimados por diferentes meios: através do método visual, pelo método da relação sinal/ruído e baseado em parâmetros da curva analítica. O método mais utilizado para técnicas analíticas em geral é o da relação sinal/ruído (RIBANI *et al.*, 2004).

O procedimento sinal/ruído pode ser aplicado somente para processos analíticos que exibem o sinal da linha de base. É determinada a razão sinal/ruído por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado e quantificado. A razão sinal/ruído com valor ≥ 3 é geralmente considerada aceitável para estimar o LOD e com valor ≥ 10 para estimar o LOQ (BRASIL, 2003; BRITO *et al.*, 2003 apud CALDAS, 2009). O LOD e o LOQ são expressos em concentração, sendo que a precisão e exatidão devem ser consideradas (BRASIL, 2003).

3.5.2 Curva analítica de calibração e linearidade

A linearidade refere-se à capacidade de uma metodologia analítica de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em uma faixa analítica especificada (BRASIL *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (INMETRO, 2003; BRASIL, 2003). O coeficiente de correlação r , permite uma

estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A regressão linear deve ter alto coeficiente de determinação ($r^2 > 0,999$) (PIMENTEL e NETO, 1996), ou de correlação ($r > 0,99$) (ANVISA, 2003) ou acima de 0,90 (INMETRO, 2003), o que evidencia um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão.

A linearidade é determinada por intermédio de gráficos de calibração, denominados curvas analíticas, seguidos de um tratamento estatístico (LANÇAS, 2004). A curva analítica deve ser definida por no mínimo cinco pontos em ordem crescente de concentração, no mínimo três vezes cada, com estimativa do RSD entre as injeções inferiores a 5% (RIBANI *et al.*, 2004, BRASIL, 2003).

A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear (Equação 1) (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2003). sendo:

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

em que:

y = variável dependente – sinal detectado

x = variável independente – concentração da substância em análise

a = coeficiente angular

b = coeficiente linear

A faixa linear de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições específicas do ensaio (INMETRO, 2003).

Pode-se optar por diferentes tipos de padronização para a construção da curva analítica, as mais empregadas são: padronização interna, padronização externa e adição de padrão. Isto é feito de acordo com o tipo de análise e do tratamento utilizado para a amostra. O método de padronização escolhido deve fornecer a melhor exatidão possível, além de um alto nível de precisão (RIBANI *et al.*, 2004).

A padronização interna consiste na preparação dos padrões de calibração contendo diferentes concentrações do analito, nos quais se adiciona uma concentração fixa do padrão interno (PI). Esse método tem a finalidade de corrigir desvios durante o procedimento analítico devido a pequenas mudanças em variáveis experimentais como temperatura da coluna e volume de injeção entre uma concentração e outra no caso de método por cromatografia gasosa. O modelo de regressão e o gráfico são elaborados pela relação entre a razão das áreas (área do analito/área do padrão interno) com as concentrações do analito. Na aplicação do método, as amostras desconhecidas são analisadas após a adição da mesma quantidade do padrão interno (RIBANI *et al.*, 2004). Com a utilização de um padrão interno adequado, melhoras na precisão e exatidão são facilmente obtidas (SKOOG, 2006). O padrão interno deve: (a) sempre estar ausente da amostra, (b) deve ser similar à substância a ser quantificada, (c) não reagir com a substância ou outro componente da matriz, (d) ter tempo de retenção próximo a esta substância, (e) estar disponível em elevado grau de pureza, (f) ser adicionado à amostra em concentrações similares ao composto a ser analisado, (g) ser bem resolvido dos outros picos e (h) quando cromatografado, ficar separado de todas as demais substâncias presentes na amostra (LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004).

O método de padronização externa compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão, obtém-se um gráfico, relacionam-se as áreas obtidas com as concentrações.

A padronização por adição de padrão, consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra, antes do seu preparo. Constrói-se uma curva analítica relacionando as quantidades da substância adicionada à amostra com as respectivas áreas obtidas. A extrapolação da reta define, no eixo das abcissas, a concentração da substância na amostra analisada. (RIBANI *et al.*, 2004).

O método de superposição de matriz ("matrix-matched") consiste na adição do padrão da substância em diversas concentrações em uma matriz similar à da amostra, isenta da substância, e construção do gráfico de calibração relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões. O método de superposição de matriz pode ser utilizado para calibração, tanto com a padronização interna como com

a padronização externa. Este método é usado para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes e é de suma importância em determinações quando a matriz pode interferir na pré-concentração, extração, separação ou detecção da substância de interesse. O método de superposição de matriz tem o inconveniente de não proporcionar a magnitude do efeito de co-extratos, além de aumentar o custo e o tempo das análises. Apesar de se obter uma calibração confiável com o método de superposição da matriz, ele é somente uma forma para compensar efeitos da matriz, mas não elimina situações analíticas típicas: a intensidade de um efeito e a concentração de interferentes na matriz podem diferir de uma matriz ou amostra para outra (RIBANI *et al.*, 2004).

Outro procedimento para avaliar a linearidade do método analítico, bem como para a quantificação das amostras, é a construção da curva trabalho. A curva trabalho é aplicada para avaliar a performance do método proposto e na validação do método, nos cálculos de recuperação (TSAI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010). Para construir a curva trabalho, a amostra é fortificada com a solução padrão antes da extração. Após a extração a amostra é injetada pelo menos três vezes e as amostras são realizadas em triplicata. Com a construção da curva trabalho, os cálculos da exatidão e a avaliação da linearidade, possíveis erros sistemáticos da etapa do preparo de amostra, podem ser corrigidos.

3.5.3 Exatidão

A exatidão representa a concordância entre o valor encontrado em um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro (LANÇAS 2004; INMETRO 2003).

A exatidão representa a existência de erros sistemáticos, e é um dos critérios mais importantes para o julgamento do desempenho de um método analítico (PRIMEL, 2003). A exatidão está sempre associada à precisão, sendo ambas avaliadas de forma concomitante.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão são entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2003).

Quando materiais de referência não estão disponíveis, a exatidão pode ser avaliada através dos ensaios de recuperação (CODEX ALIMENTARIUS, 2001), os quais são geralmente expressos em percentual.

A recuperação dos analitos pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do padrão. As amostras devem ser fortificadas com os analitos em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. (INMETRO, 2003).

São estabelecidas faixas de valores aceitáveis de exatidão com determinados valores de precisão associados. Por exemplo, na análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$ (SANCO, 2007). Naturalmente essas faixas estão correlacionadas com a complexidade analítica bem como da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até 15%. Pelo fato de outros componentes da matriz poderem interferir na separação, detecção ou na quantificação da substância, efeitos dos componentes da matriz devem ser investigados durante a avaliação da exatidão do método (RIBANI et al., 2004; SANCO, 2007).

3.5.4 Precisão

Precisão é a medida de quão próximo os resultados estão uns dos outros, ou seja, é o grau de concordância entre os resultados de cada teste quando aplicado repetidamente a várias amostragens de uma mesma amostra, e é geralmente expressa como desvio padrão, variância ou coeficiente de variação de diversas medidas (EURACHEM, 1998; BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

Uma forma de expressar a precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD%) (Equação 2), também conhecido como coeficiente de variação (CV).

$$\text{RSD\%} \quad \text{ou} \quad \text{CV\%} = \frac{s}{X_m} \times 100 \quad (2)$$

onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto

X_m = média de uma série de medidas (replicatas)

Métodos que quantificam compostos em quantidades macro requerem valores de RSD de 1 a 2%. Métodos para análise de traços são aceitáveis valores de RSD de até 20% (RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão é considerada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Os parâmetros de validação são adequados conforme será o uso do método a ser validado. Se o método a ser desenvolvido terá aplicação em somente um laboratório não se faz necessária a avaliação da precisão em termos de reprodutibilidade, o que inclui estudos interlaboratoriais.

A repetitividade expressa a precisão nas mesmas condições de operação (mesmo equipamento, analista, reagentes e dia) em pequeno espaço de tempo (BRITO *et al.*, 2003 apud CALDAS, 2009; RIBANI *et al.*, 2004; VALENTINI, 2007). Pode ser avaliada, de acordo com o INMETRO, que recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão, ou de acordo com a ANVISA, que recomenda no mínimo nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja três diferentes concentrações e três replicatas cada, ou com no mínimo seis determinações para uma única concentração-teste (BRASIL, 2003). O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia (INMETRO, 2007), sendo utilizado pelo INMETRO. A ANVISA utiliza o mesmo conceito para o termo repetibilidade.

A precisão intermediária do método está relacionada às variações dentro de um mesmo laboratório como diferentes dias e/ou analistas, e/ou equipamentos (LANÇAS, 2004). Através da precisão intermediária é possível verificar se no mesmo laboratório, o método fornecerá os mesmos resultados. Os ensaios necessários para a avaliação da precisão intermediária seguem a mesma recomendação da repetitividade. A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada (RIBANI *et al.*, 2004).

Além da precisão do método é comum a avaliação da precisão instrumental, sendo calculado RSD (%) para o sinal medido de injeções repetitivas de um mesmo ensaio, ou seja, mesma amostra ou mesmo nível de concentração da curva analítica.

3.5.5 Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações. Um método é dito robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (INMETRO, 2003).

Alguns exemplos e variações são: estabilidade das soluções analíticas, tempo de extração; e em cromatografia líquida influência da variação de pH da fase móvel e da variação da composição da fase móvel dentre outras; em cromatografia gasosa temperatura, velocidade de fluxo e colunas de diferentes lotes/fabricantes, etc. (ANVISA, 2003). Se as alterações das condições da análise produzirem resultados dentro dos limites aceitáveis de seletividade, exatidão e precisão, o método pode ser considerado robusto e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (BRITO *et al.*, 2003; INMETRO, 2003; RIBANI, *et al.*, 2004; CASSIANO *et al.*, 2009).

A robustez do método também pode ser avaliada através da variação da matriz. PIRARD *et al.* (2007) desenvolveram um método multiresíduo para determinação de agrotóxicos em mel por OCLLE (Extração Líquido-Líquido em Coluna, do inglês *On-column Liquid-liquid Extraction*) usando terra diatomácea como suporte sólido inerte e LC-MS/MS – (Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas *tandem* Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography with Electrospray Ionization with Mass Spectrometry tandem Mass Spectrometry*). A robustez desse método foi avaliada frente a mais de cem tipos de mel coletados em diferentes áreas na Bélgica, e frente a outras matrizes, abelhas e ceras. Para a aplicação do método a abelhas e ceras foi necessária modificação no procedimento de preparo da amostra. Os resultados mostraram a robustez do método frente a diferentes tipos de matrizes.

3.6 Efeito matriz

A complexidade das amostras e o número de compostos que co-eluem com elas acabam gerando um problema durante a análise, denominado efeito matriz. Este efeito pode ser notado pela significativa diferença de resposta obtida em padrões preparados no solvente daqueles preparados no extrato da matriz (PRESTES, 2007).

O efeito matriz pode gerar sérios problemas analíticos, devido a possível superestimação da concentração dos analitos (ZROSTLÌKOVÁ *et al.*, 2001) ou diminuição da resposta do detector de um analito presente no extrato da amostra comparado ao mesmo analito em solvente orgânico (EURACHEM, 1998, HAJŠLOVÁ *et al.*, 1998;). A ocorrência e a intensidade do Efeito Matriz podem variar dependendo do caráter da matriz e do analito, e da razão entre analito e matriz (GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

Em GC, o efeito de matriz pode ocorrer nas seguintes partes do sistema cromatográfico: injetor, coluna ou detector. No injetor, o *liner* (tubo de vidro) é o principal responsável pelo efeito de matriz, pois os sítios ativos deste material podem adsorver ou induzir a degradação térmica de alguns analitos, promovendo assim o enriquecimento do sinal (SHENCK e LEHOTAY, 2000).

Estudos sobre efeito matriz relacionado ao injetor são mais freqüentes, por outro lado há poucos estudos na literatura que associam esse efeito à coluna e ao detector, mas se tem conhecimento que as conexões entre injetor e coluna, e as conexões entre coluna e detector também podem promover o efeito matriz (PINHO *et al.*, 2009).

Quando se faz uso de uma coluna capilar nova, inicialmente pouco ou nenhum efeito matriz é observado, após a realização de várias análises o efeito matriz começa a aparecer em razão das sucessivas injeções e contaminação do sistema cromatográfico (PINHO *et al.* 2009). O diâmetro interno da coluna também tem influência na magnitude do efeito matriz em uma análise (SHENCK e LEHOTAY, 2000).

Várias precauções podem ser usadas para eliminar ou reduzir o efeito matriz: Uma delas é reduzir a quantidade de componentes da matriz que co-eluem com os analitos no detector, para isto, métodos de extração mais seletivos e etapas mais eficientes de *clean-up* devem ser desenvolvidos. Além disso pode citar: (a) uso de

padrões preparados em brancos da matriz, (b) uso do método de adição padrão, (c) extensiva limpeza para reduzir componentes da matriz, (d) uso de padrões internos, com tempos de retenção próximos ou idênticos aos do analito, afetados similarmente aos analitos pelos componentes da matriz, (e) uso de *on-column* ou outras formas de injeção em GC para evitar o efeito de sítios ativos, (f) colocar componentes da matriz com a tentativa de preencher os sítios ativos e (g) compensação dos resultados calculados pelo fator de enriquecimento da matriz.

O uso de insertores desativados e/ou técnicas de injeção alternativas, como *splitless* pulsado ou *on-column*, pode ser muito efetivo na redução do efeito, mas são mais caras, e a baixa de robustez faz essas técnicas menos populares (SHENCK e LEHOTAY, 2000). Já o método de adição padrão tem a desvantagem de ser necessário uma curva analítica para cada amostra (PINHO *et al.* 2009). O uso de padrões preparados em extratos dos brancos é a opção mais comum utilizada pelos laboratórios para resolver o problema de efeito matriz (DIAS, 2010).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente, foi proposta a avaliação do método QuEChERS quanto à eficiência de extração de agrotóxicos na amostra de pêssego em calda. Para isso, foi utilizado o método QuEChERS modificado desenvolvido por RODRIGUES *et al.* (2010) e a determinação por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos (LC-DAD).

Devido ao pequeno número de analitos e a baixa sensibilidade alcançada durante o trabalho no LC-DAD, a segunda etapa do trabalho teve como objetivo avaliar os procedimentos de preparo de amostra baseados no método QuEChERS utilizando GC-MS para determinação. Portanto, as condições instrumentais e o estudo de validação para o LC-DAD foram abordados no artigo intitulado *Evaluation of the modified QuEChERS method for the extraction of insecticide and fungicide residues in processed peaches*. O procedimento de otimização para o LC-DAD, bem como a validação e os resultados estão discutidos na íntegra no ANEXO 1. O artigo foi submetido para publicação na revista *Analytical Methods*.

O desenvolvimento experimental incidiu no estudo do método QuEChERS para análise de multirresíduos de agrotóxicos em amostras de pêssego em calda. Após,

foram otimizadas as condições instrumentais do GC-MS e o método foi validado para amostras de pêssego com calda e drenado.

Estes estudos foram desenvolvidos no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), da Escola de Química e Alimentos (EQA), na Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

4.1 Seleção dos agrotóxicos

Os agrotóxicos alvo deste estudo foram definidos primeiramente pela cultura a ser avaliada (o pessegueiro), a partir de uma consulta nas páginas eletrônicas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT). Em seguida, contatou-se a EMATER-Pelotas, onde os trabalhos desenvolvidos são voltados para a agricultura familiar e ao desenvolvimento rural sustentável. O objetivo do contato com a Emater foi de obter informações a respeito dos compostos mais comumente aplicados na produção de pêssego na cidade de Pelotas. Além disso, para selecionar os analitos, foram consideradas as propriedades físico-químicas, a disponibilidade de padrões destes compostos no laboratório, e a possibilidade de determinação por cromatografia gasosa.

4.2 Seleção do padrão interno

O composto para ser selecionado para uso como padrão interno deve apresentar características semelhantes aos compostos analisados, não eluir no tempo de retenção igual aos analitos, apresentar boas respostas no sistema cromatográfico e não estar presente na amostra.

4.3 Instrumentação

- ✓ Agitador Vórtex modelo Certomat® MV-B. Braun. (Bioteck Internacional, Alemmar - Comercial e Industrial S.A.);

- ✓ Balança Analítica de precisão modelo FA 2104N, Bioprecisa;
- ✓ Centrífuga de tubos microprocessada modelo Quimis® Q222T (QUIMIS aparelhos científicos);
- ✓ Coluna capilar de sílica fundida: Rtx®-5MS (Restek) com dimensões 30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm de espessura do filme. Aquisição de dados pelo software GC Solution version 2 Shimadzu;
- ✓ Cromatógrafo a gás, GC-MS-QP 2010 Plus Shimadzu equipado com injetor split/splitless; auto-injetor AOC-20i, fonte de ionização por impacto de elétrons (EI) e filtro de massa quadrupolo (São Paulo, Brasil);
- ✓ Gás hélio para GC, pureza 99,999%; (White Marthins, São Paulo, Brasil);
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (100 – 1000 µL) (Labmate, Polônia; Digipet);
- ✓ pHmetro Hanna pH21 – eletrodo de vidro combinado (São Paulo, Brasil);
- ✓ Processador de alimentos, modelo Mega Master Plus RI 3170;
- ✓ Sistema de Purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3® Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA);
- ✓ Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics (Instruments Ltda., Escócia).

4.4 Reagentes, solventes e materiais

- ✓ Acetato de sódio anidro 99,5% (JT Baker, Mallinckrodt, NJ, USA);
- ✓ Acetonitrila, grau HPLC (J.T Baker, Mallinckrodt, NJ, USA);
- ✓ Ácido acético glacial 96% (Merck, RJ, Brasil);
- ✓ Água destilada;
- ✓ Água Ultrapura, purificada em sistema Direct-Q UV3® Millipore (resistividade 18,2 MΩ cm);
- ✓ Citrato de sódio diidratado (Sigma-Aldrich, USA);
- ✓ Citrato dissódico hidrogenado (Sigma-Aldrich, USA);
- ✓ Cloreto de sódio p.a. (Merck, RJ, Brasil);
- ✓ Detergente Extran® neutro (Merck, Brasil);
- ✓ Dispenser Boeco 10 - 50 mL;
- ✓ Frascos de vidro (*via*l), capacidade de 2,0 mL;

- ✓ Padrões analíticos: dimetoato 99,4%; fentiona 98,3%; fenitrotona 99,5%; malationa 96,1%; tricloform 97,0%; ciproconazol 99,8%; difenoconazol 99,0%; tebuconazol 99,6%; tiametoxam 99,7%; azoxistrobina 97%; diclorana 99,6%; e atrazina deuterada 99,6% (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil);
- ✓ Sorvente amina primária secundária (PSA) Bondesil (Varian, USA);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro (J.T. Baker, Japão);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas rosqueáveis, capacidade de 15 e 50 mL de capacidade (Sarstedt, Alemanha);
- ✓ Vidrarias em geral (balões volumétricos, pipetas volumétricas, béquer, etc).

4.5 Limpeza da vidraria

Todos os materiais utilizados para o trabalho (vidraria, tubos de polipropileno, espátulas, frascos de vidro (*vials*, balões volumétricos, etc.) foram lavados primeiramente com água da torneira e água destilada. Após, o material foi mergulhado em detergente neutro 5% por 24 h e enxaguados com água de torneira, água destilada e acetona. A seguir, foram secas em estufa a 50 °C, com exceção da vidraria volumétrica, e armazenadas em ambiente livre de poeira.

4.6 Controle de qualidade nas determinações

Para assegurar a qualidade dos resultados, alguns critérios foram aplicados durante a realização das análises. Foram realizadas diariamente análises “branco” das amostras e da vidraria, antes das análises, para verificar e eliminar falsos positivos por contaminação no processo de extração, instrumento, materiais ou reagentes utilizados durante todo o processo. Também foram realizadas injeções de uma solução da mistura dos padrões, enriquecida na concentração de 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e curvas de calibração preparadas diariamente para verificar a sensibilidade e linearidade na faixa de trabalho das concentrações. Assim, os erros de quantificação causados por efeitos de matriz, além de possíveis flutuações instrumentais podem ser evitados.

4.7 Preparo das soluções

As soluções estoque individuais contendo 1000 mg L^{-1} de cada agrotóxico (dimetoato, fenitrotiona, malationa, triclorfom, ciproconazol, difenoconazol, tebuconazol, tiametoxam, azoxistrobina, diclorana e atrazina deuterada) foram preparadas pela dissolução dos padrões sólidos em acetonitrila, considerando o grau de pureza. A solução de fentiona foi preparada através da diluição do padrão líquido em acetonitrila. Logo após, as soluções foram armazenadas em frasco âmbar e estocadas a $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ protegidas da luz. A partir das soluções estoque de 1000 mg L^{-1} foram preparadas soluções intermediárias de concentrações de 100 e 10 mg L^{-1} de cada composto em acetonitrila.

Foi preparada uma solução individual de cada analito e do padrão interno na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ e injetada no sistema GC-MS para determinação do tempo de retenção e espectro de massas de cada composto. Para a realização das etapas de otimização da separação cromatográfica e dos parâmetros de análise do espectrômetro de massas, foi preparada uma solução contendo a mistura dos 10 compostos e do padrão interno (atrazina deuterada) na concentração de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ (M10+PI).

Para avaliar os três procedimentos do método QuEChERS foi preparada uma solução contendo a mistura dos compostos a serem determinados por GC, na concentração de 2000 vezes o valor do limite de quantificação (LOQ) de cada analito (M10). A partir dessa solução, foram preparadas soluções 20 e 200 e vezes o LOQ.

4.8 Otimização da separação cromatográfica por GC-MS

Para otimizar o sistema cromatográfico, foram avaliados parâmetros como: programação de temperatura do forno, fluxo do gás de arraste, modo de injeção (*split* e *splitless*), temperaturas do injetor, da interface e da fonte de íons, volume de injeção e injeção pulsada. As análises foram realizadas no modo de Monitoramento do Íon Selecionado, do inglês *Selected Ion Monitoring* (SIM) no espectrômetro de massas acoplado ao GC e cada composto foi quantificado com base na razão entre a média da área do analito pela área do padrão interno.

O procedimento *autotuning*, para a calibração das massas do equipamento, foi avaliado mensalmente, ou sempre que necessário, no caso de quebra do vácuo do equipamento, usando perfluorotributilamina (PFTBA). Para os estudos, foi empregado um cromatógrafo a gás QP2010 Plus, Shimadzu, equipado com torre de injeção automática e amostrador com capacidade de 12 frascos, insensor para modo *split* e *splitless* de injeção contendo lã de vidro como recheio. Na separação de compostos foi utilizada coluna analítica capilar de baixa polaridade RTX 5MS de baixo sangramento, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e espessura de filme (fase estacionária) de 0,25 mm.

4.8.1 Programação da temperatura do forno

O controle da temperatura é um parâmetro essencial para obter uma boa separação cromatográfica dos componentes da amostra em menor tempo de análise. A programação da temperatura em GC é significativamente importante, uma vez que melhora a separação e diminui o tempo de análise (COLLINS, 2006). Em vista disso, diferentes programações de temperaturas no forno cromatográfico foram testadas.

A programação de temperatura do forno cromatográfico foi o primeiro parâmetro a ser otimizado. Para a realização dos testes foi utilizada a mistura M10+PI. Para escolher a melhor programação de temperatura do forno foi avaliada a separação cromatográfica. O forno do equipamento foi operado com programação de temperatura multilinear (estágios entre 60 e 300 °C).

4.8.2 Fluxo do gás de arraste

O gás de arraste utilizado para a separação cromatográfica foi o Hélio, e avaliou-se vazões de 1,2 e 1,5 mL min⁻¹, associados com programações de temperaturas do forno. Para isso foi utilizada a mistura M10+PI.

4.8.3 Otimização das temperaturas do injetor, interface e fonte de íons

Para avaliar a influência da temperatura do injetor na separação, foram testadas as temperaturas de 250 e 280 °C. Para a interface, foram testadas as

temperaturas de 280 e 300 °C. E para a fonte de íons, foram testadas as temperaturas de 230 e 280 °C.

4.8.4 Modo e volume de injeção *split* e *splitless*

Para otimizar o modo de injeção, no injetor *split/splitless*, iniciou-se os testes utilizando o modo *split* com taxa zero de divisão de fluxo, e depois foram realizados testes utilizando o modo *splitless*. Os dois modos de injeção foram avaliados pelo fato da diferença do volume de amostra que é injetado no cromatógrafo gasoso. Quando se realiza uma análise no modo *split*, apenas uma parte da amostra que é injetada através do injetor é direcionada para a cabeça da coluna cromatográfica, enquanto que no modo *splitless*, todo volume injetado é direcionada para a coluna. Para realizar a otimização, foi utilizada a solução M10 e volume de injeção no modo *splitless*. Foi avaliado volumes de 1 e 2 µL.

4.9 Amostragem e processamento das amostras de pêssego em calda

As amostras de pêssego em calda contendo adição de açúcar, provenientes do município de Pelotas/RS, foram adquiridas em um supermercado local e utilizadas para o estudo dos métodos QuEChERS, bem como na validação.

Primeiramente, as amostras foram separadas em dois conjuntos, uma para ser triturada juntamente com a calda (pêssego + calda) e outra para ser triturada sem a calda (amostra drenada). No processo de drenagem, a calda foi escoada com auxílio de uma peneira, obtendo-se portanto, os pêssegos sem a calda.

Cada amostra foi triturada em um processador de alimentos até completa homogeneização e acondicionada em freezer e em local escuro antes das determinações. Estas amostras foram analisadas preliminarmente (sem a adição dos agrotóxicos) para verificação da possível presença de alguns dos compostos em estudo.

4.10 Avaliação do método QuEChERS e quantificação por GC-MS

A determinação de resíduos de agrotóxicos, devido às concentrações dos analitos serem geralmente muito baixas, apresentarem propriedades químicas distintas, bem como a complexidade das matrizes, faz com que ocorra a necessidade de uma etapa prévia de preparo da amostra (PRESTES *et al.*, 2008). Além disso, deve-se levar em consideração a alta detectabilidade da técnica instrumental analítica empregada. Neste estudo, objetivou-se realizar a avaliação de diferentes métodos QuEChERS afim de obter o método que proporcione os melhores percentuais de recuperação e a menor interferência ocasionada pelos efeitos de matriz para a amostra de pêssego em calda.

Três procedimentos de extração utilizando o método QuEChERS foram avaliados. A escolha dos métodos foi baseada nos procedimentos QuEChERS original (ANASTASSÍADES *et al.*, 2003) e nas suas modificações: acetato (LEHOTAY *et al.*, 2005) e citrato (ANASTASSÍADES *et al.*, 2007). Estes dois últimos métodos foram selecionados por serem os métodos adotados para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos, como métodos de referência pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) e pela European Committee for Standardisation UE, respectivamente.

Afim de verificar o método mais eficiente para a extração dos agrotóxicos em estudo nas amostras de pêssego em calda, os três procedimentos foram avaliados em termos de recuperação (R%), efeito matriz (EM) e de eficiência do processo (EP). Para isto, foram utilizadas as amostras de pêssego em calda, denominadas branco da matriz.

As amostras utilizadas neste estudo (pêssego drenado e com a calda) foram fortificadas adicionando uma quantidade da solução M10 de concentração 200 e 2000 LOQ, referentes à cada nível de fortificação para os compostos que diferem-se em seus limites de quantificação. O padrão interno foi adicionado ao extrato final (após a extração). Foram preparadas também, soluções padrão da mistura dos analitos diluídas em solvente e no extrato branco da matriz. Os procedimentos foram avaliados em dois níveis (1 e 10 vezes o LOQ), realizados em duplicata e injetados 3 vezes (n=6) no cromatógrafo a gás, para ambas amostras.

4.10.1 Método QuEChERS Original

Para o desenvolvimento do método QuEChERS Original (procedimento 1), pesou-se 10,0 g de amostra diretamente em um tubo de polipropileno (com capacidade de 50,0 mL); realizou-se a fortificação da amostra como descrito no item 4.6; adicionou-se 10,0 mL de MeCN como solvente extrator; agitou-se manualmente por 20 s e em agitador mecânico (vórtex) por 1 min; adicionou-se 4,0 g de sulfato de magnésio anidro (MgSO_4) para induzir a separação das fases (orgânica e aquosa); adicionou-se 1,0 g de NaCl para promover o efeito “*salting out*” dos analitos; repetiu-se a etapa de agitação manual e em vórtex e por fim, centrifugou-se a 5000 rpm durante 5 min. Para a etapa de limpeza empregando a técnica Extração em Fase Sólida Dispersiva (D-SPE), 1,0 mL do sobrenadante foi transferido para outro tubo de polipropileno (capacidade de 15,0 mL), contendo 150,0 mg de sulfato de magnésio anidro (MgSO_4) e 25,0 mg de amina primária secundária (PSA), em seguida agitado novamente por 20 s manualmente e centrifugado a 6000 rpm durante 1 min. Ao volume final de extrato (1,0 mL), foi adicionado 50 μL de solução 1,0 mg L^{-1} de padrão interno. Uma alíquota do sobrenadante “limpo” foi injetada no GC-MS para análise.

4.10.2 Método QuEChERS acetato

O método QuEChERS acetato (procedimento 2), tem por finalidade o tamponamento do meio (pH 4,8) utilizando ácido acético e acetato de sódio.

Pesou-se 15,0 g de amostra diretamente em um tubo de polipropileno (com capacidade de 50,0 mL); realizou-se a fortificação da amostra como descrito no item 4.6; adicionou-se 15,0 mL de MeCN acidificada com 1% de ácido acético (v/v) para a extração; agitou-se manualmente por 1 min; adicionou-se 6,0 g de sulfato de magnésio anidro (MgSO_4); adicionou-se 1,5 g de acetato de sódio anidro (CH_3COONa); repetiu-se a etapa de agitação manual e por fim, centrifugou-se a 5000 rpm durante 1 min.

Posteriormente, 1,0 mL do sobrenadante foi transferido para outro tubo de polipropileno (capacidade de 15,0 mL), contendo 150,0 mg de MgSO_4 e 50,0 mg de PSA, em seguida agitado novamente por 20 segundos manualmente e centrifugado a 5000 rpm durante 5 min. Ao volume final de extrato (1,0 mL), foi adicionado 50 μL de

solução $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de padrão interno. Uma alíquota do sobrenadante “limpo” foi injetada no sistema cromatográfico.

4.10.3 Método QuEChERS citrato

O Método QuEChERS citrato (procedimento 3), tem por finalidade o tamponamento do meio (pH entre 5,0 e 5,5) utilizando sais citrato.

Pesou-se 10,0 g de amostra diretamente em um tubo de polipropileno (com capacidade de 50,0 mL); realizou-se a fortificação da amostra como descrito no item 4.6; adicionou-se 10,0 mL de MeCN para a extração; agitou-se manualmente por 20 s e em agitador mecânico (vórtex) por 1 min; adicionou-se 4,0 g de MgSO_4 ; adicionou-se 1,0 g de sal NaCl; adicionou-se 1,0 g de citrato de sódio diidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 0,5 g de citrato dissódico hidrogenado ($\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$); repetiu-se a etapa de agitação manual e em vórtex e por fim, centrifugou-se a 4000 rpm durante 2 min. Posteriormente, 1,0 mL do sobrenadante foi transferido para outro tubo de polipropileno (capacidade de 15,0 mL), contendo 150,0 mg de MgSO_4 e 25,0 mg de PSA, em seguida agitado novamente por 20 s manualmente e centrifugado a 4000 rpm durante 2 min. Ao volume final de extrato (1,0 mL), foi adicionado 50,0 μL de solução $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de padrão interno. Uma alíquota do sobrenadante “limpo” foi injetada no sistema cromatográfico para análise.

4.11 Validação do método

O método foi validado empregando figuras analíticas de mérito como: limite de detecção, limite de quantificação, curvas analíticas (calibração externa no solvente, superposição na matriz e curva trabalho), linearidade, exatidão (recuperação) e precisão (repetitividade e precisão intermediária). Estes parâmetros são os sugeridos para validação de métodos analíticos pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO (INMETRO, 2010) e pela ANVISA. Também foi avaliado o efeito matriz, como sugerido pelo guia de validação para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos da Comissão Europeia (SANCO, 2010) além da eficiência do processo (MATUSZEWSKI *et al.*, 2003).

4.11.1 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LODs) e os limites de quantificação (LOQs) foram estimados pela relação sinal/ruído (s/n) calculada pelo *software* do equipamento que estabelece um $s/n \geq 3$ para o LOD e $s/n \geq 10$ para o LOQ. A relação sinal/ruído foi comprovada experimentalmente e também calculada pelo *software* do equipamento.

Os limites instrumentais foram obtidos através de padronização externa no solvente, pelo preparo de soluções analíticas de diferentes concentrações em acetonitrila. Uma vez definido os limites instrumentais, para a definição dos limites do método, as amostras foram fortificadas nas concentrações equivalentes ao LOQ do instrumento e submetidas ao processo de extração para confirmar experimentalmente estes valores.

Os limites do método QuEChERS não apresentam fator de pré-concentração, pois a proporção utilizada no preparo de amostra é de 1,0 g de amostra para 1,0 mL de extrato.

4.11.2 Curva analítica, curva trabalho e linearidade

A linearidade do instrumento foi avaliada utilizando calibração externa no solvente (acetonitrila) e do método foi avaliada pela construção da curva por superposição na matriz e também pela curva trabalho.

Para a curva trabalho, as amostras de pêssigo em calda foram fortificadas aos níveis estipulados, com a solução padrão da mistura dos analitos, passando então pela etapa de preparo de amostra selecionada. Esta curva é feita para avaliar a performance do método proposto e pode ser empregada na validação do método, nos cálculos de recuperação (TSAI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010). As curvas analíticas foram preparadas em seis níveis de concentração iniciando pelo LOQ de cada analito. Ambas foram preparadas adicionando uma quantidade de solução padrão da mistura (M10) em seis níveis de concentração. O padrão interno foi adicionado ao volume final (1,0 mL) das soluções preparadas para cada curva, pipetando-se 50 μL de solução de concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os preparos destas soluções são descritas no item 4.7.

Para a construção das curvas analíticas e trabalho, foram preparados três conjuntos de soluções:

✓ Conjunto 1

As soluções foram preparadas através de diluições da solução padrão da mistura dos analitos (M10) em solvente (acetonitrila);

✓ Conjunto 2

As soluções foram preparadas a partir de diluições da solução padrão da mistura (M10) no extrato da matriz, extraído pelo método QuEChERS selecionado (pós extração);

✓ Conjunto 3

As soluções foram obtidas a partir da extração das amostras de pêssago em calda fortificadas com a solução padrão da mistura (M10) (pré extração).

A curva trabalho foi preparada em duplicata para cada nível e injetada três vezes, sendo um $n=6$. Comparações das áreas dos picos obtidos pelos conjuntos das soluções 1 e 2 são indicativos de efeito matriz. Comparações das áreas obtidas pelos conjuntos das soluções 1 e 3 são indicativos de um efeito matriz combinado com a potencial recuperação dos analitos (eficiência do processo).

Os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do *software* do GC-MS. A partir destes dados foi avaliado o coeficiente de correlação linear (r), a linearidade do instrumento e do método.

4.11.3 Exatidão (recuperação)

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método analítico podem ser, através do uso de materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão (RIBANI *et al.*, 2004). Neste caso, o método de ensaio de recuperação é estudado.

A recuperação pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito, em pelo menos três níveis: baixo, médio e alto (INMETRO, 2010).

A exatidão do método de extração foi avaliada através da fortificação das amostras de pêssego em calda (drenado e com calda) nos níveis 1,0; 10,0 e 50,0 vezes o LOQ de cada analito. Para preparar o nível do LOQ os extratos das matrizes foram fortificados pipetando 50 µL da solução 20 LOQ; para os níveis de 10 e 50 vezes o LOQ, pipetou-se 50 e 250 µL da solução 200 LOQ, respectivamente (conjunto 2). Para preparar as soluções do conjunto 3, as amostras foram fortificadas antes da extração. Para a fortificação da amostra nos níveis do LOQ e de 10 LOQ, pipetou-se volumes de 50 e 500 µL (da solução 200 LOQ) respectivamente. Para a fortificação da amostra ao nível de 50 LOQ, pipetou-se 250 µL da solução 2000 LOQ. O padrão interno foi adicionado ao volume final de cada solução. Os testes foram realizados em duplicata e injetados três vezes no sistema cromatográfico (n=6).

As recuperações foram determinadas pela comparação das médias das áreas dos picos de cada composto obtidos no conjunto 3 pelas obtidas no conjunto 2 (equação 1):

$$\text{Recuperação(\%)} = \left(\frac{\text{Conjunto3}}{\text{Conjunto2}} \right) \times 100 \quad (1)$$

sendo:

Conjunto 2= Média das áreas da amostra fortificada após a extração (pós-fortificação)

Conjunto 3= Média das áreas da amostra fortificada antes da extração (pré-fortificação)

4.11.4 Precisão

A precisão instrumental foi avaliada a partir de injeções sucessivas de solução analítica padrão com a mistura dos agrotóxicos (n=3) para todas as concentrações da faixa linear e estimada através do desvio padrão relativo (RSD).

A precisão do método foi avaliada em função da repetibilidade e da precisão intermediária. Para a repetibilidade, as amostras foram fortificadas em diferentes níveis em duplicata, seguindo todo o procedimento de extração através do método QuEChERS selecionado, e injetadas em triplicata no mesmo dia, pelo mesmo analista

e nas mesmas condições cromatográficas. A partir das seis determinações foi calculado o RSD. A precisão intermediária RSD_{pi} foi realizada da mesma forma que a repetibilidade, porém em diferentes dias. Para os cálculos dos RSD utilizou-se a equação 2, apresentada a seguir:

$$RSD(\%) = \frac{s}{X_m} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

X_m = média de uma série de medidas (replicatas).

4.11.5 Efeito matriz

A ocorrência do efeito matriz deve ser avaliada e compensada na validação do método, uma vez que, a exatidão e a precisão das análises podem sofrer influência da matriz, gerando uma avaliação errônea dos resultados. Dentre as formas usuais de corrigir esse efeito durante as análises, e que foram adotados no procedimento, foi o uso de solução padrão preparada no extrato e a etapa de limpeza do extrato no processo de extração (PINHO, *et al.*, 2009).

Para avaliar o efeito matriz, os cálculos podem ser realizados por meio de comparações das curvas de calibração externa no solvente e pela sobreposição na matriz (ECONOMOU, *et al.*, 2009; SANCO, 2010). Neste estudo, os cálculos de EM foram baseados no trabalho de Matuszewski e colaboradores. Portanto, realizou-se a comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas em acetonitrila e daquelas obtidas com soluções analíticas preparadas nos extratos das matrizes (PRESTES, 2007) em dois níveis de concentração da faixa linear (1,0 e 10,0 LOQ). O cálculo foi efetuado através da equação 3 (MATUSZEWSKI, *et al.*, 2003):

$$EM(\%) = \left(\frac{\text{Conjunto2}}{\text{Conjunto1}} \right) \times 100 \quad (3)$$

onde:

Conjunto 1 = Média das áreas das soluções preparadas através de diluições da solução padrão de trabalho no solvente (acetonitrila)

Conjunto 2 = Média das áreas obtidas pela injeção das soluções analíticas de cada analito, preparada no extrato da matriz (pêssego em calda), pós-fortificação

As soluções do conjunto 1, foram preparadas, pipetando-se 50 µL de uma solução M10 de concentração 20 LOQ e adicionou-se 950 µL de acetonitrila, para o nível baixo. Para o nível intermediário, pipetou-se 50 µL de uma solução M10 de concentração 200 LOQ e adicionou-se 950 µL de acetonitrila, respectivamente. Às soluções finais, contendo um volume de 1,0 mL, adicionou-se 50 µL da solução de 1000 µg L⁻¹ do padrão interno.

As soluções do conjunto 2, foram preparadas da mesma maneira do conjunto 1 e nas mesmas concentrações porém, os padrões dos agrotóxicos (M10) foram diluídos a 1,0 mL utilizando o extrato da matriz de pêssego em calda. Ao volume final de cada solução, o padrão interno foi adicionado.

Além disso, uma amostra “branco” foi realizada sem adição de padrões, apenas o padrão interno foi adicionado.

O EM calculado desta forma pode ser referido como um efeito matriz “absoluto”. No qual, valores de EM igual a 100% representa que não há efeito matriz; valores acima de 100% indicam enriquecimento de sinal e deve ser determinada com cuidado. Quando os valores são inferiores a 100%, há uma supressão de sinal (KRUIVE *et al.*, 2008). Este aspecto da avaliação do efeito matriz é altamente relevante para o desenvolvimento de métodos cromatográficos seletivos.

4.12 Eficiência do Processo

A eficiência do processo (EP), (VARGA *et al.*, 2011), inclui tanto os efeitos de matriz como também a recuperação. Pode ser útil para monitorar estes dois parâmetros e também torna mais fácil escolher entre os procedimentos de extração. A eficiência do processo é calculada conforme a equação 4:

$$EP(\%) = \frac{\text{Conjunto3}}{\text{Conjunto1}} \times 100 \quad (4)$$

onde:

Conunto 1= Média das áreas dos picos cromatográficos dos analitos no solvente (solução padrão);

Conjunto 3= Média das áreas dos picos cromatográficos dos analitos extraídos da matriz pré-fortificada;

Valores de EP próximos a 100%, geralmente indicam que as recuperações do método estão próximas a 100% e o efeito matriz é baixo. Diferenças entre EP% e recuperação indicam que deve ser utilizada a curva construída no extrato da matriz para a determinação das recuperações, pois o efeito matriz é alto (KRUVE *et al.*, 2008).

4.13 Aplicabilidade do método e robustez

Após a validação, o método foi aplicado para 3 diferentes marcas de pêssego em calda, provenientes de diferentes fabricantes, da cidade de Pelotas.

Amostras para aplicabilidade do método foram coletadas considerando uma porção de 20% do total de enlatados de pêssego em calda disponíveis nas prateleiras do supermercado. Para isso, foram selecionadas três diferentes marcas que foram denominadas “A1”, “B1” e “C1” para a amostra drenada e “A2”, “B2” e “C2” relativas à amostra com calda (amostra não drenada).

A seleção da marca dos enlatados foi referente ao local da sua fabricação, ou seja, na cidade de Pelotas. Diferentes lotes também foram avaliados na aplicabilidade do método.

A robustez do método foi verificada através da eficiência de extração e quantificação, aplicadas para a matriz de pêssego *in natura*. Neste caso, o pêssego utilizado foi avaliado sem a casca devido ao processo de industrialização, o qual é realizada a etapa de descascamento sendo submetido a um tratamento alcalino e então é levado à fervura para ser enlatado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção dos agrotóxicos

Dada a grande diversidade dos agrotóxicos em estudo, é importante conhecer a classificação quanto à sua ação e o grupo químico a que pertencem. A Tabela 4 apresenta a lista dos agrotóxicos selecionados para o estudo, com as características químicas e os limites máximos de resíduos permitidos (LMR) segundo a ANVISA, CODEX *alimentarius* (CODEX-EUA) e a União Européia (*European Union* - E.U). As propriedades físico-químicas dos compostos selecionados, são mostradas na Tabela 5.

O dimetoato, atualmente, não faz parte dos compostos registrados para o cultivo do pêssego, porém, segundo informações da EMATER ele ainda é muito utilizado pelos agricultores.

O composto triclorfom, atualmente é um agrotóxico excluído da listagem da ANVISA, mas o seu uso no cultivo do pêssego na região de Pelotas foi mencionado durante a pesquisa na Emater. Também foi registrado o vasto uso de fenitrotiona nas culturas do pessegueiro por muito tempo. Hoje, esse composto não é mais autorizado para o cultivo segundo a ANVISA, mas por ter sido amplamente utilizado pelos agricultores nas lavouras de pêssego, optou-se em incluí-lo no estudo.

5.2 Seleção do padrão interno

A atrazina deuterada foi escolhida como padrão interno nas determinações por GC-MS por apresentar todos os requisitos de uma substância de padrão interno; além de estar disponível no laboratório.

Tabela 4 – Fórmula estrutural, toxicidade, classe, grupo químico, limites máximos de resíduos (LMR) e Ingestão Diária Aceitável (IDA) para os agrotóxicos selecionados

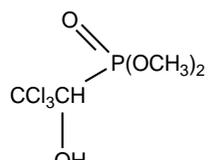
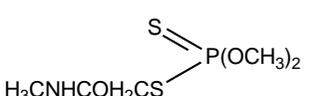
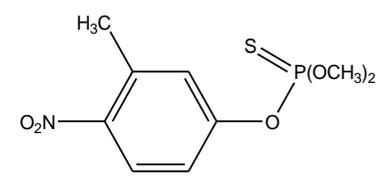
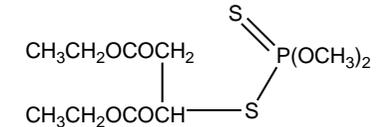
Agrotóxico Fórmula estrutural	Toxicidade ^e	Classe	Grupo Químico	LMR (mg kg ⁻¹)			IDA ^d (mg kg ⁻¹ p.c)
				ANVISA ^a	CODEX-EUA ^b	E.U. ^c	
Triclorfom 	II	Inseticida	Organofosforado	----	-----	0,5	0,01
Dimetoato 	II	Acaricida Inseticida	Organofosforado	----	0,5	0,02	0,002
Fenitrotiona 	II	Inseticida Formicida	Organofosforado	----	1,0	0,01	0,005
Malationa 	III	Acaricida Inseticida	Organofosforado	6,0	1,0	0,02	0,3

Tabela 4 - Continuação

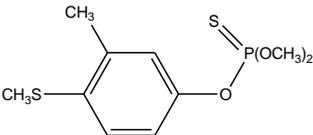
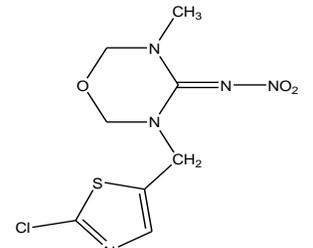
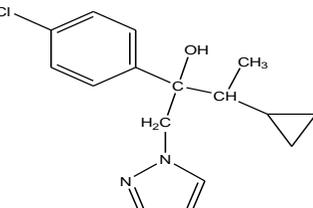
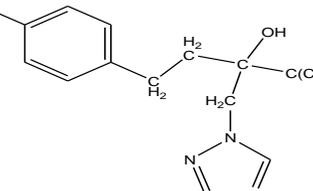
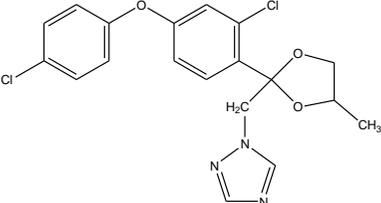
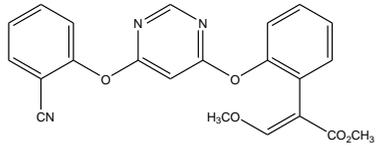
<p>Fentiona</p> 	II	Inseticida	Organofosforado	0,05	----	----	0,007
<p>Tiametoxam</p> 	III	Inseticida	Neonicotinóide	0,02	----	0,3	0,02
<p>Ciproconazol</p> 	III	Fungicida	Triazol	0,1	----	0,1	0,01
<p>Tebuconazol</p> 	IV	Fungicida	Triazol	0,1	1,0	2,0	0,03

Tabela 4 - Continuação

<p>Difenoconazol</p> 	I	Fungicida	Triazol	2,0	0,5	0,5	0,6
<p>Azoxistrobina</p> 	III	Fungicida	Estrobilurina	0,5	----	0,2	0,02

Fonte: ^(a)ANVISA, 2011. ^(b)CODEX ALIMENTARIUS; ^(c)Limites de Resíduos permitidos pela União Européia; ^(d)Índice Diário Aceitável; ^(e) I – extremamente tóxico; II – muito tóxico; III – moderadamente tóxico; IV – pouco tóxico.

Tabela 5 - Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos selecionados

Agrotóxico	MM (g mol ⁻¹)	pK _a	K _{ow} P log	Solubilidade em água (g L ⁻¹)	Pressão de vapor (mPa)
Triclorfom	257,4	10,3	0,4	120	0,21 (20 °C)
Dimetoato	229,3	2,0	0,7	23,3	0,25 (25 °C)
Fenitrotiona	277,2	---	3,43	0,014	18,0 (20 °C)
Malationa	330,4	n.d*	2,7	0,145	5,3 (30 °C)
Fentiona	278,3	---	4,8	0,0042	0,74 (20 °C)
Tiametoxam	291,7	n.d*	-0,1	4,1	6,6.10 ⁻⁶ (25 °C)
Ciproconazol	291,8	3,5-10,0	3,1	0,093	2,6.10 ⁻² (25 °C)
Tebuconazol	307,8	b.f*	3,7	0,036	1,7.10 ⁻³ (20 °C)
Difenoconazol	406,3	1,1	4,4	0,015	3,3.10 ⁻⁵ (25 °C)
Azoxistrobina	403,4	-0,67 ^a	2,5	0,06	1,1.10 ⁻⁷ (20 °C)

Fonte: TOMLIN, 2003; exceto: ^aMONTES *et al.*, 2009; n.d = não dissocia / b.f= base muito fraca; (*) Dados de Base das Propriedades dos Pesticidas (PPDB), 2010

5.3 Otimização e seleção das condições cromatográficas no GC-MS

Para os testes da otimização das condições cromatográficas, foi utilizada uma solução da mistura dos 10 analitos incluindo o padrão interno (M10+PI) na concentração de 1,0 mg L⁻¹ prepara em solvente (acetonitrila).

5.3.1 Programação da temperatura do forno e fluxo do gás de arraste

Na Tabela 6, são apresentadas as programações de temperaturas do forno, o fluxo do gás de arraste (Hélio), o modo de injeção e os testes de temperaturas do injetor, interface e fonte de íons. Os testes do número 1 ao 9, referem-se às condições instrumentais utilizando modo de injeção *Split* (com

taxa zero de divisão de fluxo), temperatura do injetor de 250 °C, temperatura da interface de 280 °C e temperatura da fonte de íons de 230 °C, variando a programação de temperatura do forno cromatográfico e o fluxo do gás de arraste.

Para realização dos testes da programação do forno, partiu-se 60 e 70 °C devido ao composto triclorfom eluir em um tempo curto de análise (logo no início do cromatograma).

Tabela 6 - Testes com diferentes programações de temperatura do forno cromatográfico e fluxo do gás de arraste

Fluxo do gás de arraste: 1,2 mL min ⁻¹			
Número do teste	Programação	Tempo de análise	Observações
1	60 °C por 1 min, 10 °C min ⁻¹ até 300 °C, por 30 min.	30 min	Primeiro analito eluiu em 9 min; coeluição de compostos
2	60 °C por 1 min, 10 °C min ⁻¹ até 160 °C, 3 °C min ⁻¹ até 200 °C, 10 °C min ⁻¹ até 300 °C por 20 min.	37 min	Primeiro analito eluiu em 9 min, coeluição de compostos e aumento do tempo de análise
3	60 °C por 1 min, 10 °C min ⁻¹ até 160 °C, 5 °C min ⁻¹ até 200 °C, 10 °C min ⁻¹ até 300 °C por 20 min.	34 minutos	Primeiro analito eluiu em 9 min, os compostos que coeluem se uniram mais intensamente
4	60 °C por 1 min, 10 °C min ⁻¹ até 160 °C, 2 °C min ⁻¹ até 180 °C, 20 °C min ⁻¹ até 300 °C por 20 min.	32 minutos	Primeiro analito eluiu em 9 min, aumento do ruído e oito minutos entre a eluição do primeiro e o segundo composto
5	60 °C por 1 min, 10 °C min ⁻¹ até 160 °C, 2 °C min ⁻¹ até 180 °C, 50 °C min ⁻¹ até 250 °C, 20 °C min ⁻¹ até 300 °C por 10 min.	29 minutos	Diminuiu o tempo de análise
6	Fluxo do gás de arraste: 1,5 mL min⁻¹		
7	60 °C por 1 min, 10 °C min ⁻¹ até 160 °C, 2 °C min ⁻¹ até 180 °C, 50 °C min ⁻¹ até 250 °C, 20 °C min ⁻¹ até 300 °C por 5 min.	28 minutos	Diminuiu o tempo de eluição do primeiro analito (8,63 min), e de análise
8	70 °C por 1 min, 10 °C min ⁻¹ até 160 °C, 3 °C min ⁻¹ até 170 °C, 65 °C min ⁻¹ até 250 °C, 20 °C min ⁻¹ até 300 °C por 5 min.	22 minutos	Diminuiu o tempo de eluição do primeiro analito (7,65 min), e de análise porém, com coeluição dos analitos
9	70 °C por 1 min, 10 °C min ⁻¹ até 160 °C, 25 °C min ⁻¹ até 190 °C, 65 °C min ⁻¹ até 250 °C, 30 °C min ⁻¹ até 300 °C por 5 min.	18 minutos	Separação total dos analitos e diminuição do tempo de análise

As condições otimizadas para a programação das temperaturas do forno cromatográfico foram: 70 °C por 1 min; 10 °C min⁻¹ até 160 °C; 25 °C min⁻¹ até 190 °C; 65 °C min⁻¹ até 250 °C; 30 °C min⁻¹ até 300 °C por 5 min e fluxo do gás de arraste de 1,5 mL min⁻¹.

Após definido a melhor programação do forno e o fluxo de Hélio (teste 9), outra combinação de condição cromatográfica foi avaliada (teste 10). O teste 10 teve a finalidade de tentativa de aumento de resposta por meio das temperaturas do injetor, interface e da fonte de íons, bem como, através do modo e volume de injeção associadas às condições otimizadas no teste 9 (programação do forno e fluxo do gás de arraste). Para uma melhor representação dos resultados, o teste 9 passa a ser chamado de **condição 1** e o teste 10 de **condição 2**. Esses testes estão descritos na seção a seguir.

5.3.2 Testes das temperaturas do injetor, da interface e da fonte de íons e modo *Splitless*

A temperatura do injetor deve ser alta o suficiente para vaporizar completamente os analitos, minimizando o tempo de permanência no injetor para evitar a ocorrência de degradação. Para isso aumentou-se a temperatura do injetor para 280 °C. A temperatura da interface também é um fator essencial para obter um bom desempenho durante a análise. Esta deve ser igual ou maior que a temperatura final da coluna. Caso isso não ocorra, pode haver condensação dos compostos na interface. Portanto, a temperatura na interface foi aumentada para 300 °C. A temperatura da fonte de íons foi testada aumentando para 280 °C, com isso pode-se melhorar a ionização dos compostos e aumentar a detectabilidade. Com estes valores de temperaturas, o equipamento é operado dentro dos padrões adequados para a análise.

O modo de injeção sem divisão de fluxo (*splitless*) é o modo mais adequado para a análise de compostos de nível traço, no qual ocorre a transferência da maior parte da amostra vaporizada contida no injetor para o interior da coluna.

A Tabela 7, mostra resumidamente os parâmetros instrumentais do GC e do MS para as condições 1 e 2 avaliadas.

Tabela 7 – Resumo dos parâmetros avaliados nas condições 1 e 2 de análise

Parâmetros	Condição 1	Condição 2
Temperatura do injetor	250 °C	280 °C
Temperatura da interface	280 °C	300 °C
Temperatura da fonte de íons	230 °C	280 °C
Modo de injeção	<i>split</i>	<i>splitless</i>
Volume de injeção	Taxa zero de fluxo	2 µL

Condições utilizando a programação do forno e fluxo de gás otimizados no teste 9.

Tentativas de aumento de resposta analítica por meio do aumento de volume injetado, associado com programas de temperatura do injetor, também foram testadas nos trabalhos de Kirchner, *et al.* (2004) e de Hoh e Mastovska, (2008).

A Figura 6 apresenta o gráfico que compara as condições 1 e 2 em função da resposta do equipamento.

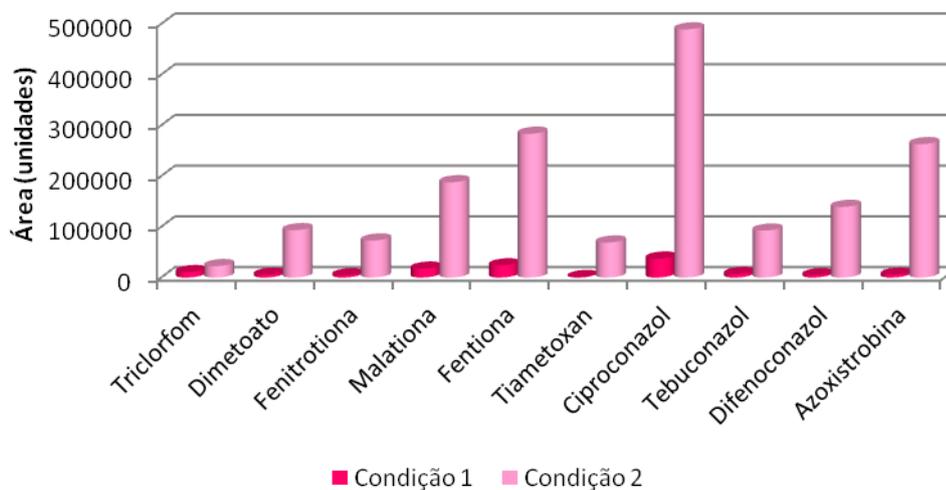


Figura 6 - Comparação entre as áreas obtidas através das condições 1 e 2 no GC-MS

Através da Figura 6, fica claro que a condição 2 permite o aumento da resposta instrumental, portanto, foi a condição selecionada.

Também foi avaliado o volume de injeção de 1 e 2 µL além do modo de injeção sem pulso de pressão e o modo de injeção pulsado em 150 kPa durante 2,30 min.

Na Figura 7, o gráfico representa a comparação das áreas dos analitos obtidas quando injetados volumes de solução de 1 e 2 μL no GC-MS. Os resultados mostram que houve um aumento expressivo na detectabilidade de todos os analitos quando se utiliza um maior volume de injeção pois, maior é a quantidade de massa de analito injetado no sistema cromatográfico portanto, o volume de injeção de 2 μL foi escolhido. Para minimizar problemas ao sistema cromatográfico devido à injeção de maior quantidade de amostra (pelos seus co-extrativos e componentes da matriz) foram realizadas limpezas da coluna passando através desta, acetonitrila até obtenção de um cromatograma limpo.

Trabalhos envolvendo GC-MS encontrados na literatura comprovam o resultado obtido neste estudo (STAJNBAHER e ZUPANCIC-KRALJ, 2003; ALBERO, *et al.*, 2005)

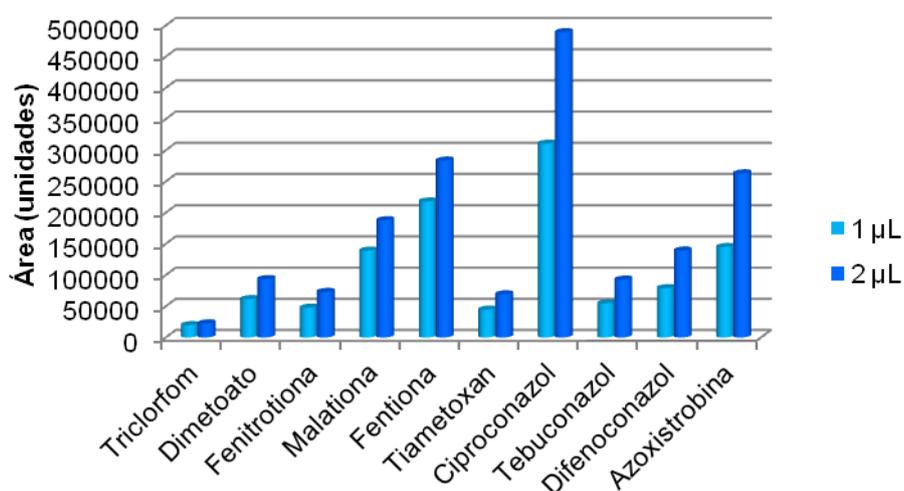


Figura 7 - Gráfico comparativo entre os volumes de injeção de 1 e 2 μL no GC-MS, utilizando a condição 2

A Figura 8, mostra os resultados para o teste de injeção por pulso de pressão (pulsada) modo em que, por um período de tempo, a pressão é aumentada no injetor, durante 2,3 min e sem pulso de pressão.

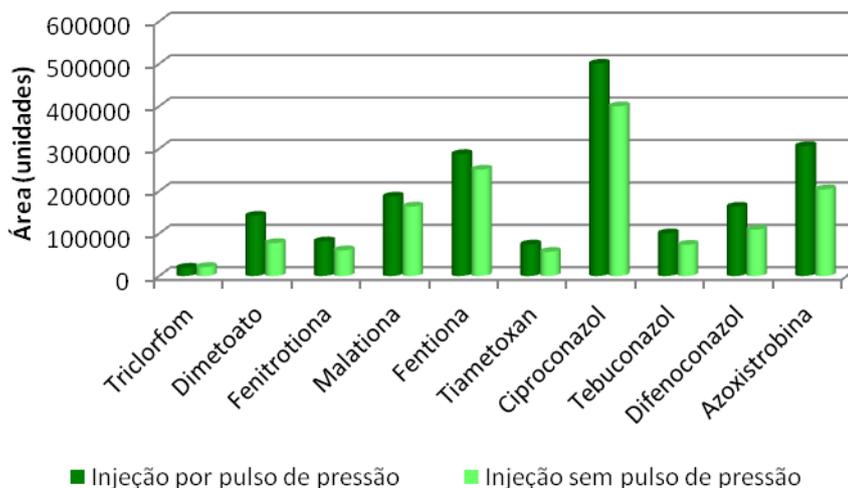


Figura 8 - Comparação entre os valores de área de cada composto utilizando injeção por pulso de pressão e sem pulso de pressão

Em geral, ao utilizar a injeção por pulso de pressão, observa-se que houve um aumento nas áreas dos analitos porém, as diferenças encontradas, não foram significativas (ANOVA, $p > 0,05$). Outra desvantagem observada ao utilizar injeção por pulso de pressão, foi o aumento do ruído da linha de base no cromatograma. Portanto, foi escolhido trabalhar com o modo de injeção sem pulso de pressão.

Com a etapa de otimização das condições instrumentais de análise, foi possível aumentar a detectabilidade do método, possibilitando uma melhor resposta analítica para a determinação dos agrotóxicos. As condições instrumentais utilizadas para o método GC-MS estão descritas nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 – Programação da temperatura do forno cromatográfico otimizada, totalizando um tempo de análise de 18 min

Taxa ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo de espera (min)
--	70,0	1,0
10,0	160,0	0,0
25,0	190,0	0,0
65,0	250,0	0,0
30,0	300,0	5,0

Tabela 9 – Condições cromatográficas otimizadas para o método utilizando GC-MS

GC	
Coluna capilar	RTX 5MS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm)
Volume de injeção	2 µL
Temperatura do injetor	280 °C
Modo de injeção	<i>Splitless</i> , sem alta pressão (97 kPa)
Fluxo de gás Hélio	1,5 mL min ⁻¹
MS	
Temperatura da fonte EI	280 °C
Temperatura da interface	300 °C
Modo de monitoramento	<i>SIM</i>
Fonte de ionização	EI (70 eV)

A Tabela 10, mostra o tempo de retenção dos analitos e do padrão interno, bem como, janelas de aquisição, no modo SIM, resultante das programações dos parâmetros de análise otimizados, para o cromatógrafo a gás e para o espectrômetro de massas.

Tabela 10 – Tempo de retenção, íons característicos e monitorados de cada analito e janelas de aquisição, por ordem de eluição

Analitos	Grupo químico	Tempo de retenção (min)	Íons monitorados (m/z)	Janela de aquisição (intervalo de tempo em min)
1- Triclorfom	Organofosforado	7,66	84, 109 e 145	(A) 7,5 – 9,0
2- Dimetoato	Organofosforado	12,30	87, 93 e 125	(B)
PI- Atrazina d		12,36	178, 205 e 220	9,0 – 13,0
3- Fenitrotiona	Organofosforado	13,09	109, 125 e 277	
4- Malationa	Organofosforado	13,13	93, 127 e 173	(C)
5- Fentiona	Organofosforado	13,21	109, 125 e 278	13,0 – 13,6
6- Tiametoxam	Neonicotinóide	13,35	132, 182 e 247	
7- Ciproconazol	Triazol	13,91	139, 222 e 224	(D)
8- Tebuconazol	Triazol	14,30	125, 163 e 250	13,7 – 15,0
9- Difenconazol	Triazol	16,72	265, 323 e 325	(E)
10- Azoxistrobina	Estrobilurina	17,14	344 , 388 e 403	15,0 – 18,0

Íons em negrito representam os íons de maior intensidade, selecionados para quantificação; . (PI) – Padrão Interno

O maior problema encontrado nessas combinações dos parâmetros cromatográficos foi o efeito gerado pelo ruído da linha de base do cromatograma. Durante o tempo de 12,0 até 14,0 min de análise, este efeito é mais acentuado, isto ocorre devido às altas taxas de aquecimento programadas nesta faixa de tempo (Figura 9). Com isso o sinal do ruído da linha de base é mais intenso, além do surgimento de picos de silanol, muito próximos aos tempos de retenção dos analitos no cromatograma, dificultando a identificação visual dos analitos no modo TIC. Entretanto, a espectrometria de massas soluciona o problema na identificação e confirmação dos resultados pois, no modo de monitoramento SIM, após a ionização, o MS faz a separação de somente um íon específico, o que aumenta a sensibilidade, uma vez que os íons correspondentes ao ruído são ejetados sem chegar ao detector (VÉKEY, 2001).

Os fragmentos gerados para cada pico são diferentes e característicos de cada analito, distinguindo assim claramente um pico do outro.

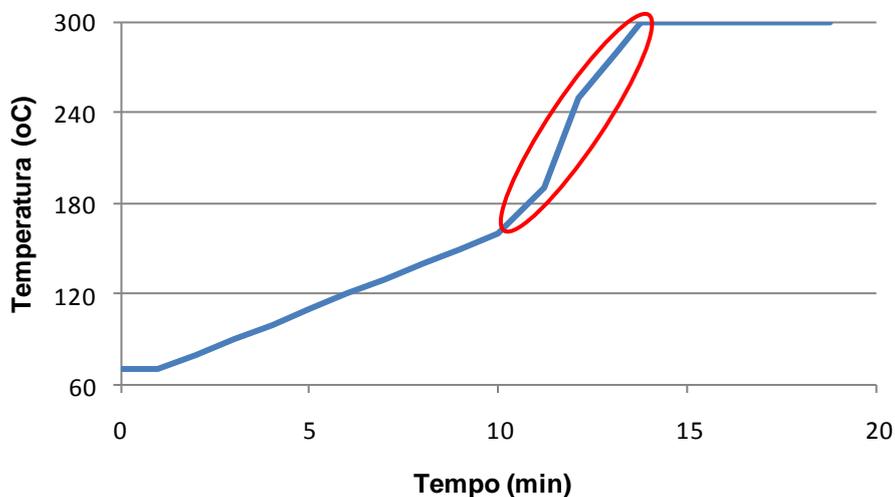


Figura 9 - Faixa de aumento das taxas de aquecimento

O cromatograma da mistura de padrões M10+PI, com as melhores condições cromatográficas para o método é apresentado na Figura 10. A figura 11 mostra os analitos por janelas de aquisição, em intervalo de tempos, representadas pelas letras A, B, C, D e E. Os analitos estão representados por números em ordem de eluição sendo identificados na Tabela 10. Nesta figura é possível visualizar claramente a separação cromatográfica dos analitos.

O *solvent cut time* foi de 7,0 min, para que, ocorra a saída do solvente no qual foi preparada a solução da mistura, do sistema cromatográfico sem ser detectado, a fim de evitar possíveis danos ao detector. O tempo de análise foi de 18 min.

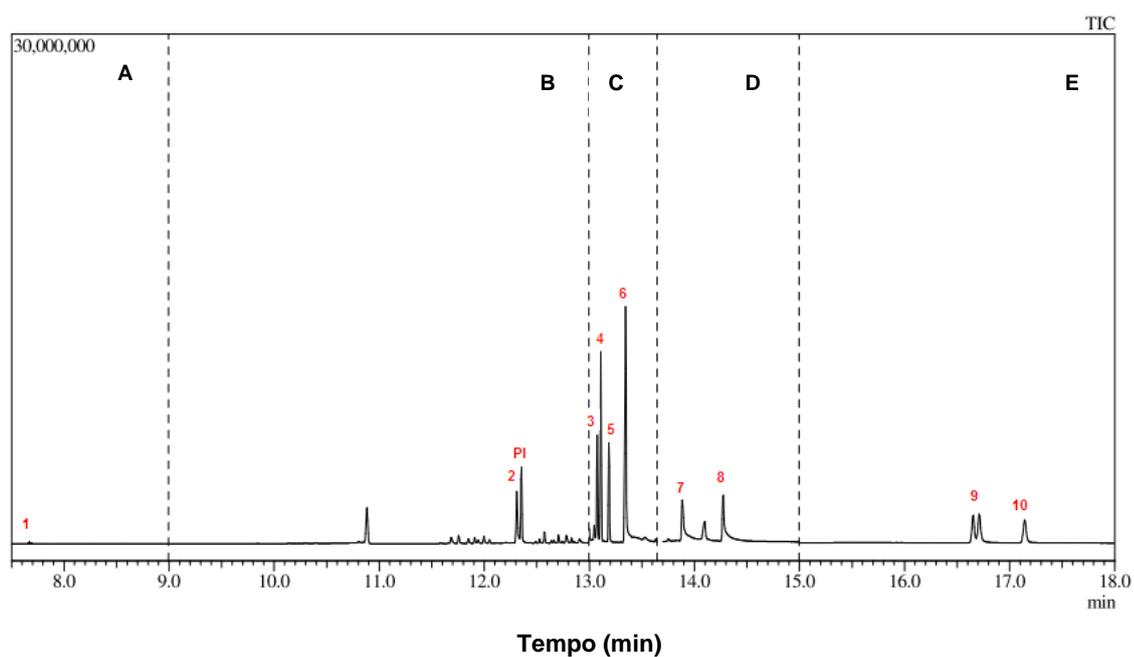


Figura 10 - Cromatograma do Íon Total para os 10 agrotóxicos estudados na concentração de 5 mg L⁻¹ nas condições otimizadas para o GC-MS

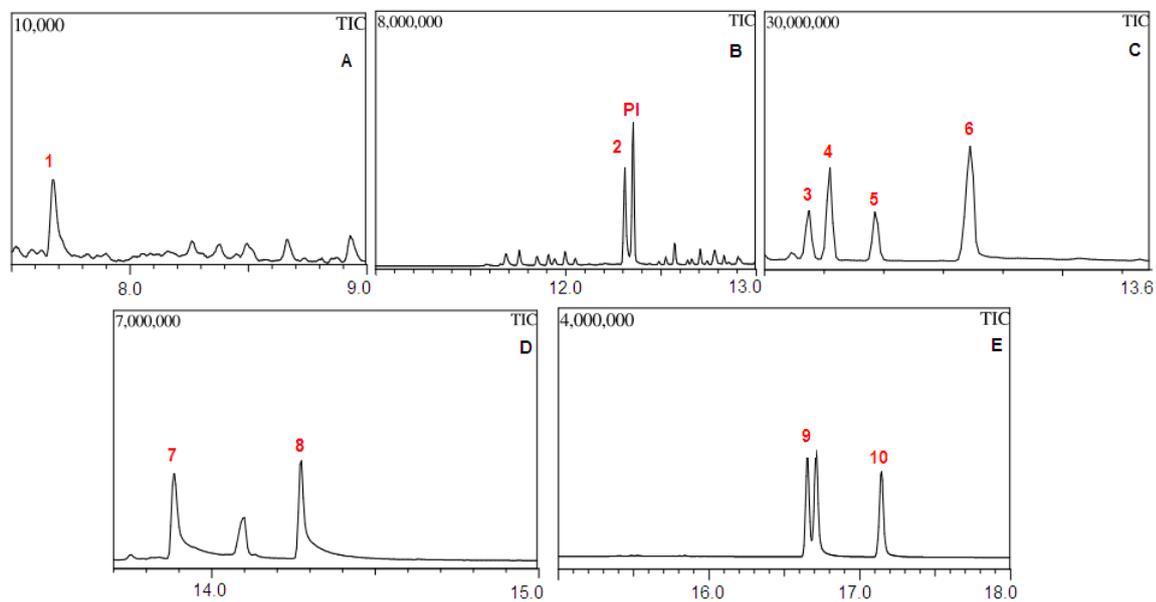


Figura 11 - Íons dos analitos monitorados por janelas de aquisição em intervalos de tempo (min)

5.4 Estudo dos métodos QuEChERS original, citrato e acetato

O preparo de amostra é uma etapa crítica de um método multirresíduo devido as muitas diferenças nas propriedades físico-químicas dos agrotóxicos para serem extraídos simultaneamente da matriz (Walorczyk *et al.*, 2011).

Para a escolha do método mais eficiente para extração dos agrotóxicos estudados, em amostras de pêssego em calda drenado e com calda, foram avaliados os métodos original, citrato e acetato em termos de R%, EP e EM.

A eficiência do processo foi usada para monitorar a recuperação e o EM, e também para facilitar na escolha entre os procedimentos de extração. Para a realização dos testes, utilizou-se amostras do extrato de pêssego em calda drenado e com calda fortificadas ao nível do LOQ e 10 vezes o LOQ de cada analito. O procedimento de extração para cada método está descrito no item 4.10.

5.4.1 Avaliação da eficiência de recuperação e EM

Primeiramente, estas variações no método QuEChERS estudado, foram avaliados em função da eficiência da extração (recuperação) e do EM para cada analito. Além disso, optou-se em realizar o estudo em dois níveis de fortificação (baixo e intermediário), pois assim é possível avaliar a eficiência e os possíveis efeitos de matriz desde o ponto mais baixo da curva analítica, no qual é mais suscetível a erros analíticos e um ponto mais alto, para uma maior confiabilidade.

A Tabela 11, apresenta o número de compostos que obtiveram resultados de recuperação entre 70-120% e de EM entre 80-120% ao nível do LOQ e de 10 vezes o LOQ, para o pêssego em calda drenado e com calda.

Tabela 11 – Comparação entre os métodos original, citrato e acetato em função do número de agrotóxicos que apresentam recuperações entre 70-120% e EM entre 80-120%

Matriz de pêssego em calda	Original	Citrato	Acetato	Nível	
	Número de compostos				
Drenado	4	<u>7</u>	4	1 LOQ	Efeito matriz
Com calda	<u>7</u>	5	4		
Drenado	5	<u>7</u>	3	10 LOQ	
Com calda	7	<u>8</u>	5		
Drenado	<u>9</u>	7	7	1 LOQ	Recuperação
Com calda	<u>8</u>	7	<u>8</u>		
Drenado	<u>10</u>	9	9	10 LOQ	
Com calda	<u>10</u>	7	<u>10</u>		

De acordo com os resultados, a maioria dos agrotóxicos apresentaram bons percentuais de recuperação, e poucos foram influenciados pelo efeito matriz, quando comparados os métodos original e citrato.

Em função da eficiência da extração (recuperação), não se observou diferenças significativas entre os três métodos QuEChERS avaliados (ANOVA, $p > 0,05$). Isso pode ser explicado em função do pH do meio e da estabilidade dos analitos. Os métodos acetato e citrato possuem a função do tamponamento do meio, com valores de pH 4,8 e de 5,0-5,5, respectivamente. O original, neste estudo, obteve valor de pH de 4,0-5,0 para o pêssego em calda drenado e de 5,0-6,0 para o pêssego com calda. O método original apresentou uma faixa de pH das amostras muito próximas às dos métodos tamponados, e isso pode ser explicado pelo fato do amadurecimento do pêssego. Neste estágio, que é ideal para o consumo, com a evolução da maturação, os frutos perdem rapidamente a acidez pois, diminui o teor de ácidos orgânicos e ocorre também o aumento de açúcares (CHITARRA, 1990) levando a pHs próximos a 5,0. Além disso, os compostos estudados apresentam tanto caráter ácido como básico, isso pode ser visto através do

pKa (Tabela 5) e portanto, um pH do meio entre 4,0-5,0 proporciona boas recuperações para compostos sensíveis meio ácido, além de garantir estabilidade para aqueles sensíveis em meio alcalino (PRESTES, *et al.*, 2009).

5.4.2 Escolha do procedimento de extração em função da EP

Para selecionar o método mais eficiente na extração dos agrotóxicos em amostras de pêssego em calda drenado e com calda, de forma a relacionar a recuperação e o EM, utilizou-se a EP.

A EP auxilia na escolha do método de extração, uma vez que, ela envolve tanto a recuperação quanto o efeito matriz dos analitos. Neste trabalho, objetivou-se escolher um único método, que responda de forma eficiente para a extração do maior número de agrotóxicos e com menor efeito matriz para ambas as matrizes.

Para realizar a avaliação da EP, os analitos foram categorizados dentro de três grupos (menor que 80%, entre 80 e 120% e maiores que 120%), considerando uma faixa de $\pm 20\%$; valores mais próximos a 100% indicam que o processo é eficiente.

As Figuras 12 e 13, mostram a relação entre os três métodos estudados, nos níveis do LOQ e de 10 LOQ para as matrizes de pêssego em calda drenado e com calda.

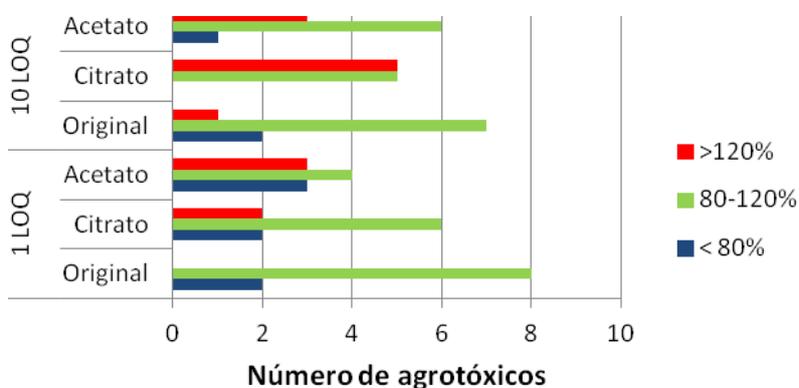


Figura 12 - Eficiência do processo para os métodos original, citrato e acetato para o pêssego em calda drenado

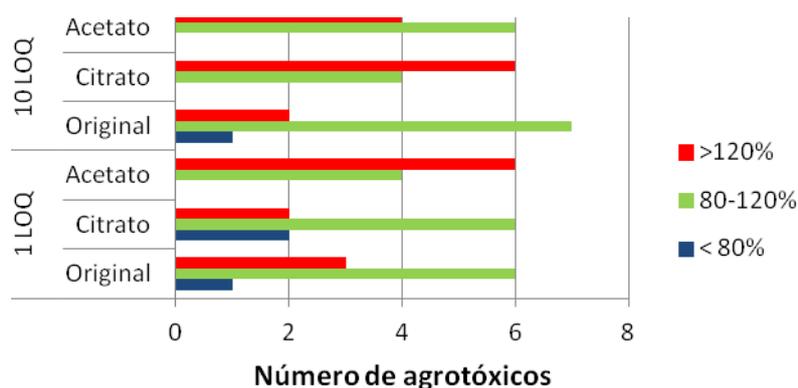


Figura 13 - Eficiência do processo para os métodos original, citrato e acetato para o pêssego com calda

Percebe-se claramente que para ambas as amostras estudadas, o método QuEChERS original apresentou um processo mais eficiente na extração dos agrotóxicos. O método original foi o escolhido para as extrações em ambas as amostras, uma vez que, apresentou melhores percentagens de EP, além de ser, entre os três métodos, mais prático, utiliza menos solvente quando comparado ao acetato e menos reagentes para o procedimento, no caso dos sais citrato.

5.5 Validação do método por GC-MS para determinação multirresíduo de agrotóxicos em pêssego em calda

Para a validação, todas as soluções analíticas foram preparadas em solvente (acetonitrila) e nos extratos de pêssego com calda e drenado, extraídos através do método QuEChERS original. Utilizando estas duas soluções, é possível avaliar o efeito da presença do extrato da matriz nas determinações dos parâmetros analíticos de validação.

5.5.1 Limites de detecção e limites de quantificação

A Tabela 12 descreve os limites de detecção (LODi) e de quantificação (LOQi) para o instrumento e os limites obtidos pelo método (LODm e LOQm),

bem como a relação do sinal de área do composto medido dividido pelo ruído (S/N), estabelecido pelo *software* do equipamento. Os valores de LOD e de LOQ (instrumento e método) foram calculados como descrito no item 4.11.1. Dados para uma comparação dos valores de LOQs e LODs obtidos neste trabalho com os LMR estabelecidos pelos órgãos vigentes, para resíduos de agrotóxicos em pêssego, são encontrados na Tabela 4.

Tabela 12 – Limites de detecção (LODi) e quantificação instrumental (LOQi), limites de detecção (LODm) e quantificação pelo método QuEChERS Original (LOQm) e a relação sinal/ruído (S/N) obtidas pelo GC-MS

Agrotóxico	LODi	LOQi	S/N	LODm	LOQm	S/N
	$\mu\text{g L}^{-1}$			$\mu\text{g kg}^{-1}$		
Triclorfom	0,3	1,0	11	0,3	1,0	11
Dimetoato	0,7	2,5	8	0,7	2,5	8
Fenitrotiona	0,7	2,5	20	0,7	2,5	11
Malationa	0,3	1,0	9	3,0	10,0	12
Fentiona	0,07	0,25	11	0,7	2,5	14
Tiametoxam	0,7	2,5	21	3,0	10,0	9
Ciproconazol	0,1	0,5	15	0,3	1,0	9
Tebuconazol	0,3	1,0	12	0,3	1,0	12
Difenoconazol	0,3	1,0	6	0,3	1,0	8
Azoxistrobina	0,3	1,0	16	0,3	1,0	14

Como não existem limites na legislação brasileira, americana e europeia para pêssego em calda, foram utilizados os valores de LMR para pêssego *in natura* como parâmetro para referência. Além disso, em uma revisão bibliográfica realizada durante o período entre os anos de 2002 a 2012, nenhum trabalho foi encontrado que abordasse determinações de agrotóxicos em amostras de pêssego em calda, somente para sucos industrializados e para o fruto *in natura*, fato que evidencia a importância desse trabalho. Avaliando os resultados observa-se que todos os compostos foram detectados na faixa de concentração entre 0,3 e 3,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Neste caso, o método atingiu limites de quantificação inferiores aos LMR segundo a ANVISA, Codex Alimentarius e E.U. (ver Tabela 4). Em diversos estudos que empregam GC-MS para

determinação destes compostos, verifica-se que os valores de LOQ obtidos no método proposto, estão de acordo com os apresentados na literatura (Lesueur *et al.*, 2008) e até mesmo são inferiores quando comparados com os encontrados nos trabalhos de LIAPS *et al.* (2003), SILVA *et al.* (2008) e DANIS *et al.* (2011).

O método desenvolvido não apresenta fator de diluição e/ou concentração, entretanto devido à diferenças de sensibilidade de alguns analitos, quando solubilizados na matriz, no GC-MS, LOQi e LOQm foram diferentes para os compostos malationa, fentiona, tiametoxam e ciproconazol.

5.5.2 Curva analítica, curva trabalho e linearidade

A faixa linear de todas as curvas analíticas foram construídas a partir do LOQ do método de cada composto, em seis níveis de concentração. Devido os LOQs do método terem variado para alguns analitos, conseqüentemente as faixas lineares desses compostos também variaram. A seguir são descritas as faixas utilizadas nas curvas de calibração em $\mu\text{g L}^{-1}$ e em $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Faixas de 1,0 – 100,0, \rightarrow 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0 e 100,0;

Faixas de 2,5 – 250,0 \rightarrow 2,5; 12,5; 25,0; 50,0; 125,0 e 250;

Faixas de 10,0 – 1000,0 \rightarrow 10,0; 50,0; 100,0; 200,0; 500,0 e 1000,0.

Os parâmetros de linearidade obtidos para os compostos em estudo para a calibração do instrumento, estão descritos na Tabela 13. As equações das curvas analíticas foram obtidas através do conjunto de soluções dos padrões dos agrotóxicos preparados em solvente (acetonitrila).

Tabela 13 – Faixa linear, equação de reta e coeficiente de correlação linear (r) para os agrotóxicos estudados

Agrotóxico	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Padronização externa no solvente	r
Triclorfom	1,0 – 100,0	$y = 1,095054 x - 2,4818 \cdot 10^{-2}$	0,999
Dimetoato	2,5 – 250,0	$y = 0,4524409x - 4,001386 \cdot 10^{-2}$	0,999
Fenitrotiona	2,5 – 250,0	$y = 0,2544747x - 2,117514 \cdot 10^{-2}$	0,999
Malationa	10,0 – 1000,0	$y = 0,9056134x - 0,3505694$	0,999
Fentiona	2,5 – 250,0	$y = 1,576321x - 0,1117602$	0,999
Tiametoxam	10,0 – 1000,0	$y = 0,4627292x - 0,1474784$	0,999
Ciproconazol	1,0 – 100,0	$y = 1,296259x - 1,491661 \cdot 10^{-2}$	0,999
Tebuconazol	1,0 – 100,0	$y = 0,5138662x - 1,692677 \cdot 10^{-2}$	0,999
Difenoconazol	1,0 – 100,0	$y = 0,3699345x - 4,294879 \cdot 10^{-3}$	0,999
Azoxistrobina	1,0 – 100,0	$y = 0,7847733x - 3,037839 \cdot 10^{-2}$	0,999

De acordo com os valores de r obtidos para a padronização externa no solvente ($r > 0,99$), pode-se concluir que o modelo de regressão linear de cada composto mostrou-se adequado para a calibração instrumental no GC-MS.

A partir da construção da curva para calibração do instrumento, foram construídas as curvas de calibração por superposição da matriz e a curva trabalho. Equações das retas e coeficientes de regressão linear são apresentadas respectivamente nas Tabelas 14 e 15, para as matrizes de pêssego em calda drenado e para o pêssego com a calda.

Tabela 14 – Equações das curvas por superposição da matriz e coeficientes de correlação linear para amostras de pêssego drenado e com calda

Analitos	Pêssego em calda drenado		Pêssego com calda	
	Equação da reta	r	Equação da reta	r
Triclorfom	$y = 0,8088651x + 7,956584 \cdot 10^{-2}$	0,999	$y = 1,346602x - 2,073925 \cdot 10^{-2}$	0,999
Dimetoato	$y = 0,11383x + 2,141813$	0,988	$y = 1,742513x + 0,4657625$	0,999
Fenitrotiona	$y = 0,4459717x + 9,582372 \cdot 10^{-3}$	0,999	$y = 0,4381786x + 2,040284 \cdot 10^{-2}$	0,998
Malationa	$y = 0,8981376x + 0,1657131$	0,999	$y = 0,9316466x + 0,155284$	0,998
Fentiona	$y = 1,353052x + 3,676922 \cdot 10^{-2}$	0,999	$y = 1,35438x + 8,263022 \cdot 10^{-2}$	0,998
Tiametoxam	$y = 0,3814049x + 0,1321306$	0,999	$y = 0,4710758x + 3,529425 \cdot 10^{-2}$	0,999
Ciproconazol	$y = 1,556128x + 4,539615 \cdot 10^{-3}$	0,998	$y = 1,644323x + 3,90089 \cdot 10^{-2}$	0,998
Tebuconazol	$y = 0,49358841x + 0,4322301$	0,996	$y = 0,6359287x + 2,01342 \cdot 10^{-2}$	0,998
Difenoconazol	$y = 0,5455937x + 2,401253 \cdot 10^{-2}$	0,996	$y = 0,777272x - 9,47072 \cdot 10^{-3}$	0,998
Azoxistrobina	$y = 1,245902x + 2,537879 \cdot 10^{-2}$	0,998	$y = 1,666309x - 3,185141 \cdot 10^{-2}$	0,999

Tabela 15 – Equações das curvas obtidas através da curva trabalho e coeficientes de correlação linear para amostras de pêssego drenado e com calda (n=6)

Analitos	Pêssego em calda drenado		Pêssego com calda	
	Equação da reta	r	Equação da reta	r
Triclorfom	$y = 0.161212x + 6,607315 \cdot 10^{-2}$	0,996	$y = 0,6128848x + 0,1089597$	0,996
Dimetoato	$y = 1.438926x + 0,9766141$	0,998	$y = 0,6080319x + 0,4876204$	0,999
Fenitrotiona	$y = 0.4417815x - 1,985612 \cdot 10^{-2}$	0,998	$y = 0,4132352x - 1,236345 \cdot 10^{-2}$	0,998
Malationa	$y = 0.8512558x - 0,1733064$	0,999	$y = 0,8394173x - 2,583115 \cdot 10^{-2}$	0,999
Fentiona	$y = 1.399543x - 4,69156 \cdot 10^{-4}$	0,998	$y = 1,229811x + 1,731204 \cdot 10^{-2}$	0,999
Tiametoxam	$y = 0.4294175x + 3,818936 \cdot 10^{-2}$	0,999	$y = 0,3232857x - 0,1384716$	0,999
Ciproconazol	$y = 1.4334x + 6,600041 \cdot 10^{-2}$	0,999	$y = 1,13986x - 2,550566 \cdot 10^{-2}$	0,999
Tebuconazol	$y = 0.5961753x + 0,4521884$	0,998	$y = 0,4252012x + 9,522456 \cdot 10^{-4}$	0,999
Difenoconazol	$y = 0.9003571x + 3,341218 \cdot 10^{-3}$	0,999	$y = 0,5870337x - 1,887163 \cdot 10^{-2}$	0,999
Azoxistrobina	$y = 1.805008x - 9,967854 \cdot 10^{-3}$	0,999	$y = 1,364284x - 4,200973 \cdot 10^{-2}$	0,999

Os agrotóxicos apresentaram coeficiente de correlação linear maior que 0,996, em todas as curvas analíticas construídas, somente com exceção do dimetoato que apresentou um r igual a 0,988 para a curva de sobreposição na matriz. Todos os valores de r para os compostos em estudo estão de acordo com os valores recomendados segundo as orientações da ANVISA e INMETRO, os quais sugerem valores de r igual a 0,99 e acima de 0,90, respectivamente. A curva trabalho foi construída com a finalidade de verificar a linearidade de todo o método analítico, abrangendo desde a etapa de preparo de amostra até as análises no GC-MS, o que demonstrou uma boa linearidade para todos os compostos estudados.

Através dos dados para a construção das curvas analíticas, e análise das equações das retas obtidas no GC-MS, é possível concluir que o modelo de regressão linear é adequado para as determinações analíticas em estudo.

A faixa linear variou para alguns agrotóxicos, devido a diferença nos LOQs desses compostos, permanecendo os mesmos para as curvas por superposição na matriz e curva trabalho, para ambas as matrizes de pêssego em $\mu\text{g kg}^{-1}$.

5.5.3 Exatidão e precisão

O procedimento para os ensaios de recuperação para a determinação de agrotóxicos nas amostras de pêssego com calda e drenado foi estimado de acordo como está descrito no item 4.12.3, extraídos pelo método QuEChERS Original. O procedimento deste método está descrito no item 4.11.1.

Os resultados de recuperação e de precisão para as determinações por QuEChERS Original e GC-MS nas amostras de pêssego em calda drenado e com calda são apresentados na Tabela 16, respectivamente. Os ensaios foram realizados em três níveis de concentração diferentes, uma vez que, a eficiência do método pode variar em função da quantidade do composto adicionado. As extrações foram realizadas em duplicata e injetadas três vezes no sistema cromatográfico, sendo assim, um $n=6$. Neste trabalho, seguiu-se a recomendação de validação de métodos cromatográficos, na qual as

recuperações devem estar entre 70 e 120% e a precisão com valores de RSD menor ou igual a 20% (RIBANI et al., 2004; SANCO, 2012).

Tabela 16 - Recuperação (R%) e precisão (RSD) empregando o método QuEChERS Original e GC-MS em amostras de pêssego em calda drenado e com calda fortificadas em três níveis (baixo, intermediário e alto)

Agrotóxicos	Níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Pêssego com calda drenado		Pêssego com calda	
		R%	RSD%	R%	RSD%
Triclorfom	1,0	92,0	8,9	123,7	2,2
	10,0	96,6	1,5	119,5	14,8
	50,0	90,7	6,4	68,6	5,1
Dimetoato	2,5	135,4	3,6	124,6	6,0
	25,0	104,3	14,9	107,5	3,1
	125,0	106,1	10,4	100,3	19,8
Fenitrotiona	2,5	101,8	8,1	100,8	2,2
	25,0	99,4	3,1	104,6	2,4
	125,0	101,0	9,7	100,7	9,1
Malationa	10,0	83,4	12,3	87,2	12,7
	100,0	97,1	9,9	87,0	5,3
	500,0	87,5	9,2	98,9	2,7
Fentiona	2,5	98,3	3,8	84,1	1,6
	25,0	97,2	4,6	104,7	4,7
	125,0	92,1	8,3	94,6	8,6
Tiametoxam	10,0	108,5	9,5	89,8	7,7
	100,0	99,1	8,6	95,7	4,5
	500,0	104,5	13,0	96,1	12,6
Ciproconazol	1,0	96,8	4,3	90,8	10,7
	10,0	95,9	2,4	103,7	11,2
	50,0	100,0	11,1	100,5	3,1
Tebuconazol	1,0	117,5	3,6	83,2	4,2
	10,0	89,1	9,6	99,8	3,6
	50,0	118,6	11,2	96,1	10,1
Difenoconazol	1,0	99,0	7,3	87,9	4,3
	10,0	100,6	3,7	97,3	3,9
	50,0	120,4	9,1	105,7	13,0
Azoxistrobina	1,0	91,2	2,1	77,2	16,8
	10,0	88,3	6,6	91,0	4,7
	50,0	117,5	9,4	113,5	5,0

A partir dos resultados apresentados na Tabela 16, os valores obtidos nos ensaios de recuperação para o pêssego em calda drenado foram satisfatórios para a maioria dos analitos estando entre 83,4 e 120,4%, com exceção do dimetoato que apresentou um valor de 135,4% no valor do LOQ do método. Todos os analitos apresentaram valores de RSD de acordo com as normas de recomendação, sendo menores que 14,9%.

Para o pêssego com a calda, as recuperações foram entre 68,6 e 124,6%, com RSD inferiores a 19,8%. Neste caso, esses valores são considerados satisfatórios, já que essas faixas estão correlacionadas com a complexidade da amostra e do método empregado, podendo ser ampliadas ou restringidas.

Na Tabela 17, são mostrados os valores de recuperação (R%) e precisão intermediária (RSD_{pi}) para cada analito e seus respectivos níveis de fortificação. As análises foram realizadas em dois níveis de concentração, selecionados a partir do LOQ e 10 vezes o LOQ de cada composto, preparados em duplicata e injetados três vezes no sistema cromatográfico ($n=6$).

Para a precisão intermediária, os testes foram realizados pelo mesmo analista, em dia diferente à repetitividade. Os valores de RSD% também estiveram dentro da faixa estabelecida, pois foram menores que 18,4% para o pêssego em calda drenado. Para o pêssego com calda, os RSD_{pi} foram inferiores a 19,9% para todos os compostos, com exceção do tiametoxam que obteve um valor de 23,2%.

A precisão das análises empregando QuEChERS Original e GC-MS foram adequadas para quantificação de elementos traços em matrizes complexas, já que neste estudo, a maioria dos analitos apresentaram valores de RSD_r e RSD_{pi} de acordo com os valores regulamentados pelas normas de validação ($RSD < 20\%$).

Tabela 17 – Percentuais de recuperação (R%) e RSD_{pi} para a precisão intermediária do método QuEChERS Original e GC-MS em amostras de pêsego em calda drenado e com calda fortificadas em dois níveis (baixo e intermediário)

Agrotóxicos	Níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Pêssego com calda drenado		Pêssego com calda	
		R (%)	RSD _{pi} (%)	R (%)	RSD _{pi} (%)
Triclorfom	1,0	94,5	5,2	99,9	14,8
	10,0	137,6	4,9	91,2	15,8
Dimetoato	2,5	93,2	9,3	145,5	19,9
	25,0	78,0	7,9	113,7	12,3
Fenitrotiona	2,5	100,9	10,7	43,9	10,9
	25,0	102,9	5,8	92,4	10,3
Malationa	10,0	117,9	11,3	82,2	12,2
	100,0	99,3	4,6	97,0	11,3
Fentiona	2,5	86,3	10,5	89,0	6,5
	25,0	101,5	9,8	98,3	12,1
Tiametoxam	10,0	104,6	13,4	81,3	23,2
	100,0	73,9	18,4	95,0	6,4
Ciproconazol	1,0	102,7	12,8	57,6	14,7
	10,0	90,6	10,6	109,8	10,0
Tebuconazol	1,0	107,5	3,9	105,7	8,4
	10,0	138,6	9,6	115,5	7,2
Difenoconazol	1,0	134,1	3,4	93,8	6,0
	10,0	83,0	14,3	105,3	2,9
Azoxistrobina	1,0	117,0	14,0	119,6	9,9
	10,0	82,2	17,2	108,2	6,8

5.5.4 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado em termos de percentual da razão obtida pelo cálculo do EM, o qual está descrito no item 4.11.5.

Os valores de efeito matriz para cada composto e cada amostra foram obtidas ao realizar o estudo dos métodos QuEChERS e são os mesmos valores utilizados para o estudo da validação, por serem as mesmas amostras utilizadas durante o desenvolvimento do método.

A Tabela 18, apresenta os valores de efeito matriz sobre as amostras de pêsego para os 10 agrotóxicos selecionados, nos níveis do LOQ e 10 vezes o LOQ de cada composto.

Tabela 18 – Resultados do efeito matriz para os agrotóxicos em estudo nas amostras de pêsego em calda drenado e com calda

Agrotóxico	Pêssego em calda drenado		Pêssego com calda	
	EM (%)			
	1LOQ	10LOQ	1LOQ	10LOQ
Triclorfom	78,7	74,5	42,6	62,5
Dimetoato	172,4	193,9	129,7	101,0
Fenitrotona	101,7	118,6	118,9	117,6
Malationa	135,2	127,7	119,1	119,7
Fentiona	96,3	105,5	94,8	108,3
Tiametoxam	77,1	82,6	137,1	170,1
Ciproconazol	89,1	90,8	89,8	112,0
Tebuconazol	183,9	168,7	87,7	106,9
Difenoconazol	92,1	104,7	94,7	110,6
Azoxistrobina	131,0	123,5	98,3	145,7

De acordo com a Tabela acima, verifica-se que não houve uma grande diferença na resposta dos analitos, com relação aos efeitos de enriquecimento e de supressão, frente à matriz analisada. Para uma melhor compreensão dos dados, todos os analitos foram categorizados dentro de três grupos (menor que 80%, entre 80 e 120% e maiores que 120%). Valores próximos a 100% representa que não há efeito matriz ou é insignificante (Matuszewski et al. 2003), para isso, considerou-se os valores entre -20 e +20%, se estiverem acima ou abaixo ($\pm 20\%$) é considerado um efeito matriz alto (ECONOMOU *et al.*, 2009).

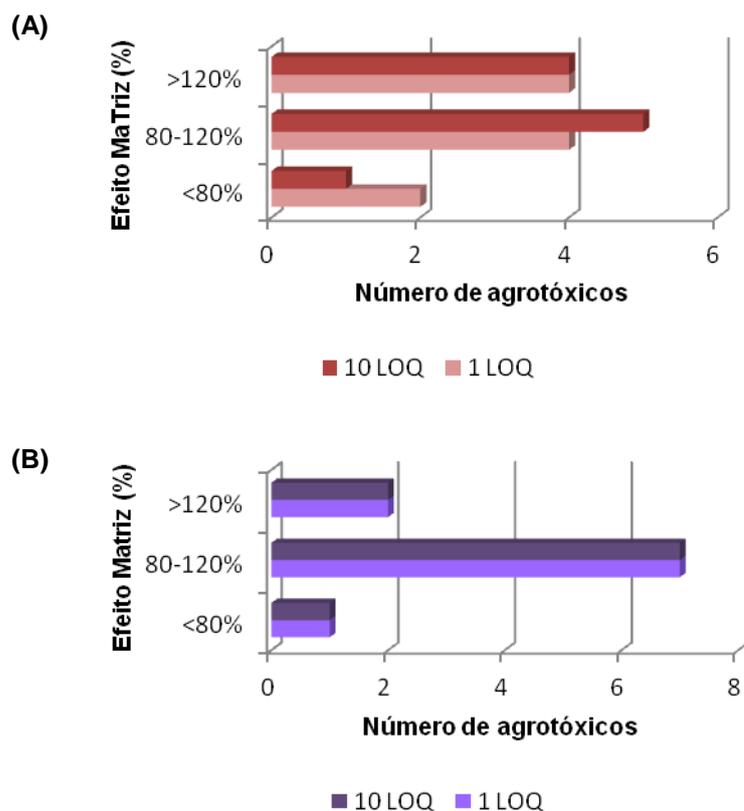


Figura 14 - Distribuição das diferentes respostas dos agrotóxicos para o efeito matriz nos níveis do LOQ e 10 LOQ em (A) para a amostra de pêsego em calda drenado e em (B) para a amostra de pêsego com calda

Para uma comparação entre as duas matrizes, optou-se em discutir este efeito no nível de 10 LOQ, pois, o efeito matriz pode facilmente tornar-se maior, em níveis baixos de concentração, como no caso do LOQ, porque pode haver um decréscimo na razão de concentração do analito/concentração da matriz.

Nota-se na Figura 14, que para a amostra **A**, houve um maior número de analitos com aumento ou redução da resposta cromatográfica induzida pela matriz (50% dos analitos) quando comparados com a amostra **B**, observando portanto, um efeito matriz em 30% dos analitos. Este fato pode ser explicado por conter uma quantidade maior de água na amostra B, sendo proveniente da calda, o que dilui a quantidade de co-extrativos da matriz bem como a quantidade de pêsego (proporção de pêsego/calda em torno de 1:1).

A amostra de pêsego em calda drenado, apresentou um maior número de analitos com enriquecimento de sinal em vista do pêsego com calda, sendo o dimetoato, malationa, tebuconazol e azoxistrobina, enquanto que para a

amostra de pêssgo junto com a calda, somente tiametoxam e azoxistrobina apresentaram sinal positivo. Dentre os compostos que sofrem enriquecimento de sinal, o dimetoato foi que apresentou o efeito mais acentuado. Compostos contendo grupamentos $-P=O$ (organofosforados), como é caso do dimetoato segundo estudos, são mais suscetíveis ao efeito matriz. (HAJSLOVÁ *et al.*, 1998; PINHO *et al.*, 2009). Assim como, compostos mais polares, nesse caso o tebuconazol e tiametoxam e os compostos de elevada massa molar (acima de 400 g mol^{-1}) como a azoxistrobina. A elevada massa molar dificulta a volatilização e menor quantidade de analito é introduzida na coluna cromatográfica quando preparado em solvente puro, produzindo menores respostas (SANCHEZ-BRUNETE *et al.*, 2005).

O efeito matriz positivo em GC-MS, segundo Pinho e colaboradores, é frequentemente associado aos componentes da matriz que evitam que certos analitos sejam adsorvidos ao liner/insensor pois, quando a solução é preparada em solvente puro, os sítios ativos do liner estão disponíveis para a retenção dos analitos. Assim, quantidades menores dos analitos são transferidas para a coluna e o detector. Quando a análise é realizada em um extrato fortificado, ocorre a competição entre os componentes da matriz e os analitos pelos sítios ativos do liner, isso resulta numa maior resposta do detector para os analitos provenientes do extrato da matriz.

Um efeito matriz negativo, ou supressão de sinal, também pôde ser observado, porém, para apenas um analito em ambas as amostras. Uma possível explicação para isso, é que em GC-MS, esse efeito ocorre mais raramente, e pode ser relacionado com os componentes da matriz que de alguma forma se degradam ou reagem com o analito, gerando assim, o efeito negativo na matriz.

Fentiona, e difenoconazol apresentaram efeito matriz insignificante ou mínimo para ambas as matrizes. Dimetoato e tebuconazol foram praticamente nulos o efeito da matriz quando em amostras de pêssgo com a calda.

Logo, para obter resultados confiáveis para a quantificação dos resíduos de agrotóxicos nessas amostras e corrigir efeitos indesejáveis nas análises, o uso da superposição da matriz e do padrão interno (que minimiza o efeito matriz) devem ser adotados. Além disso, cabe ressaltar que quando se

trabalha com matrizes complexas, como neste caso, o efeito matriz já é esperado. Para minimizar esse efeito, o uso da etapa de limpeza é empregado na maioria dos casos de extração por QuEChERS, tornando-se uma alternativa recomendada, por causar menos danos ao sistema cromatográfico (HAJSLOVÁ *et al.*, 1998).

5.6 Eficiência do processo

A eficiência do processo (EP) envolve tanto a recuperação como o efeito matriz (EM). Geralmente, quando ocorre enriquecimento de sinal provocado pelo efeito matriz ocasiona um aumento da eficiência do processo e a supressão de sinal pode causar baixa eficiência de processo, mesmo com elevadas recuperações (VARGA *et al.*, 2011). Além de avaliar simultaneamente a recuperação e o efeito matriz envolvido nos analitos, a eficiência do processo pode ser utilizada como uma ferramenta para facilitar na seleção do método bem como auxilia na visualização desses efeitos, caso contrário, a seleção do método torna-se dificultado quando procede-se uma análise de diversos analitos simultaneamente.

O cálculo para a EP está descrito no item 4.11.6. As Figuras 15 e 16, apresentam o gráfico que ilustra a comparação entre as taxas de recuperação, efeito matriz e eficiência do processo, obtidas para o pêssego em calda drenado e com calda. Valores de EP próximos a 100%, geralmente indicam que as recuperações do método estão próximas a 100% e o efeito matriz é baixo.

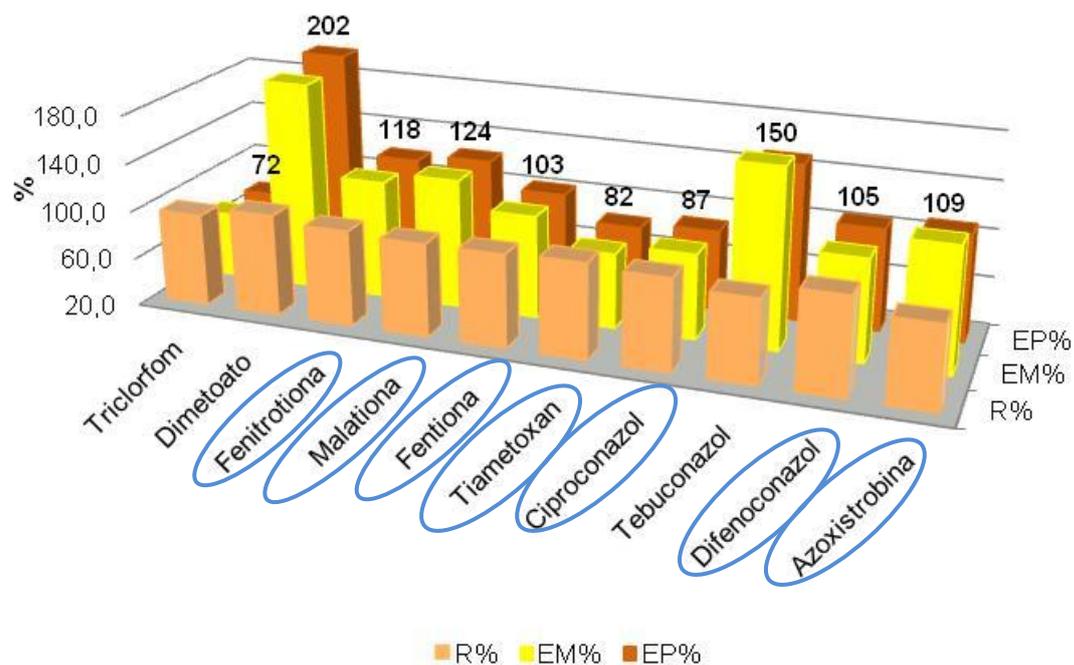


Figura 15 - Gráfico da relação entre R%, EM e EP para o pêssego em calda drenado, no nível de 10 LOQ

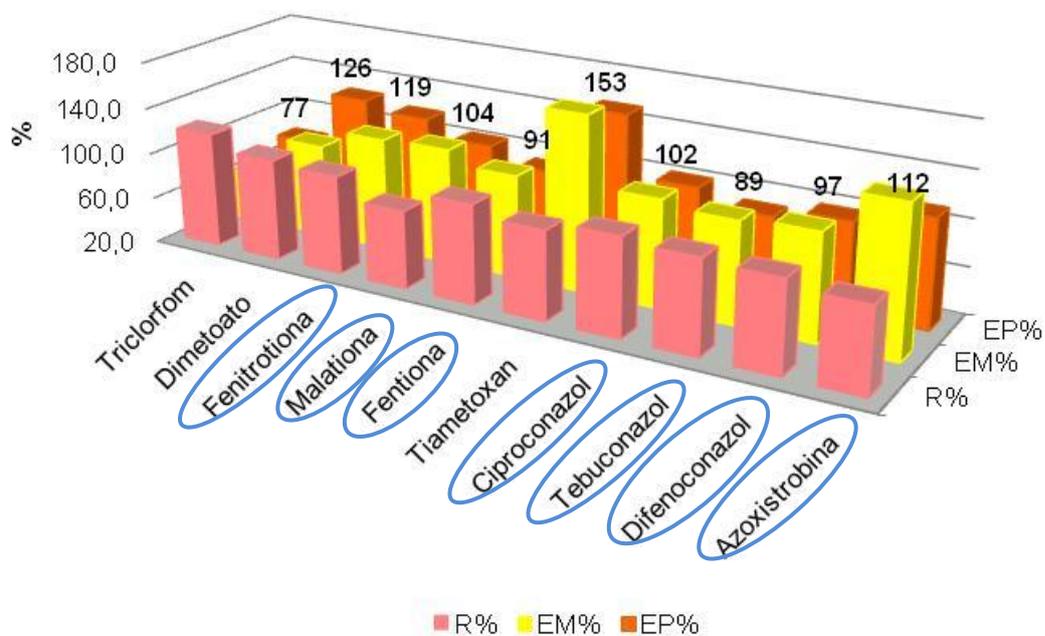


Figura 16 - Gráfico da relação entre R%, EM% e EP% para o pêssego com a calda, no nível de 10 LOQ

Como pode ser observado nas Figuras 15 e 16, a eficiência do processo foi satisfatória para sete dos dez agrotóxicos estudados em ambas as matrizes (fenitrotiona, malationa, fentiona, ciproconazol, difenoconazol e azoxistrobina), somente diferencia-se para o ciproconazol na matriz de pêsego em calda drenado e para o tebuconazol na matriz de pêsego com calda.

Isso indica que para estes analitos, o processo é eficiente resultando em boas recuperações e um baixo efeito matriz. Para o restante dos analitos, nos quais a EP foi alta ou baixa de 100%, indica que ocorreu um efeito de enriquecimento ou supressão de sinal, mesmo com altas recuperações. Altas porcentagens de EP também foram encontrados no estudo de Varga *et al.* (2011), para determinação de anti-hipertensivos e anti-ulcerosos. (EP>150%).

5.7 Robustez

A robustez do método QuEChERS Original para extração dos 10 agrotóxicos foi avaliada frente à variação da matriz, através da fortificação da amostra de pêsego *in natura* do tipo dupla finalidade (mesa e indústria). Para realizar os ensaios, selecionou-se dois pontos da curva analítica, um baixo (o LOQ) e um ponto intermediário (50 LOQ) de cada composto, e submetidos ao método de extração para avaliar R% e RSD, o EM e EP foram avaliados ao nível de 50 LOQ. As análises foram realizadas em duplicatas e injetadas no sistema cromatográfico três vezes (n=6).

Os resultados para as avaliações estão descritos na Tabela 19.

Tabela 19 – Percentuais de Recuperação, RSD, EM e EP da robustez do método para amostra de pêsego *in natura* (n=6)

Analito	Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	R%	RSD%	EM%	EP%
Triclorfom	1,0	107,0	11,1	----	----
	50,0	107,5	8,5	129,7	139,4
Dimetoato	2,5	99,0	17,4	----	----
	125,0	112,1	19,8	325,3	364,5
Fenitrotiona	2,5	91,3	13,3	----	----
	125,0	89,1	9,0	175,1	156,0

Malationa	10,0	49,9	10,4	----	----
	500,0	92,6	5,9	132,6	122,8
Fentiona	2,5	95,3	12,0	----	----
	125,0	77,5	8,5	115,8	89,7
Tiametoxam	10,0	80,7	7,0	----	----
	500,0	92,3	6,2	131,0	121,0
Ciproconazol	1,0	99,5	17,7	----	----
	50,0	70,5	11,7	93,5	65,9
Tebuconazol	1,0	126,1	7,8	----	----
	50,0	76,4	9,3	113,1	86,4
Difenoconazol	1,0	84,8	10,6	----	----
	50,0	75,3	17,3	249,3	187,7
Azoxistrobina	1,0	69,8	10,9	----	----
	50,0	85,3	18,0	273,1	233,0

(----) Nesse nível não foram realizados testes para EM% e EP%; valores em vermelho para o EM indicam enriquecimento de sinal, valores em preto sem efeito expressivo; valores em vermelho para a EP indicam que é afetada pelo EM.

Para a amostra de pêsego *in natura*, verifica-se influência positiva da matriz para a maioria dos compostos, sendo mais pronunciado para fenitrotona, dimetoato, difenoconazol e azoxistrobina. Para as amostras de pêsego *in natura* e em calda, os compostos que apresentaram efeito matriz positivo mais pronunciado, foram o dimetoato e a azoxistrobina. Uma diferença no efeito matriz entre essas amostras é observado nos compostos triclorfom, fenitrotona e difenoconazol. Pode-se concluir que, para a matriz de pêsego *in natura*, a matriz sofre influência expressiva para a maioria dos compostos avaliados e para corrigir esse efeito, as recuperações devem ser calculadas através da padronização externa na matriz.

Além disso, foi realizada a avaliação do desempenho global do método aplicado para a amostra de pêsego *in natura*, o qual foi verificado por meio da eficiência do processo. Como pode-se observar na Tabela 19, a EP foi alta para a maioria dos analitos, isto porque o efeito matriz pronunciado é o enriquecimento de sinal, elevando assim os valores da eficiência do processo.

Os resultados apresentados na Tabela 19, mostram as recuperações para os analitos ficaram entre 50 e 126%. Todos os compostos apresentaram valores de RSD% menores que 20%. Portanto, o método demonstrou ser robusto para a extração e determinação de resíduos de agrotóxicos em

amostras de pêssego *in natura*, com quantificação confiável para todos os agrotóxicos estudados.

Com o método desenvolvido, é possível realizar uma avaliação global da qualidade do pêssego, no que refere-se à resíduos de agrotóxicos, tanto para o pêssego *in natura*, quanto após os processos de industrialização. É importante ressaltar que, as amostras para a avaliação da robustez, não foram coletadas diretamente na indústria antes do processamento. Portanto, pequenas diferenças nos resultados entre as amostras *in natura* e processadas, podem ser naturais da composição de cada amostra, além da possibilidade de serem de diferentes produtores e épocas, por isso, comparações entre os resultados do pêssego *in natura* e os processados não foram feitas.

5.8 Aplicabilidade do método

O método empregando QuEChERS Original e GC-MS, após validado, foi aplicado para determinação de resíduos dos agrotóxicos triclorfom, dimetoato, fenitrotiona, malationa, fentiona, tiametoxam, ciproconazol, tebuconazol, difenoconazol e azoxistrobina, em amostras de pêssego em calda. O método foi aplicado para a determinação destes resíduos nas matrizes com calda e drenado em três marcas comerciais de pêssego em calda.

As três marcas (A, B e C) foram nomeadas em “A1”, “B1” e “C1” referentes à matriz de pêssego em calda drenada e “A2”, “B2” e “C2” relativas à matriz triturada juntamente com a calda. As amostras das marcas B e C são referentes aos enlatados de pêssego em calda com adição de açúcar e as amostras pertencentes à marca A, são de enlatados de pêssego em calda sem adição de açúcar no processo de industrialização.

Para a identificação dos compostos que deram sinal positivo nas amostras, utilizou-se o tempo de retenção, dois íons, um para identificação e outro para confirmação, além da razão entre os íons (do inglês *íon ratio*). A curva por superposição na matriz foi construída para a quantificação dos analitos e o uso do padrão interno para correção do efeito matriz (TEXEIDÓ *et al.*, 2008).

Verificou-se sinal de resíduos de agrotóxicos também para o pêssego *in natura*, quando realizadas injeções do extrato branco da matriz. Os compostos verificados são triclorfom, dimetoato, malationa e difenoconazol.

Os compostos ciproconazol e fentiona, pelo tempo de retenção e pelo íon de maior intensidade, foram detectados sinais nas amostras porém, através da confirmação entre a razão dos seus íons, a presença desses compostos foram avaliados como falso-positivo nas análises, portanto não foi considerado como resíduo detectado.

Tabela 20 – Resíduos de agrotóxicos detectados nas amostras de pêssego *in natura* e nas amostras de pêssego em calda processado

Agrotóxicos detectados	Pêssego <i>in natura</i> ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Pêssego em calda drenado (A,B e C) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Pêssego com calda (A,B e C) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Triclorfom	40	n.d.	n.d.
Dimetoato	60	C → 36	C → 330
Malationa	910	n.d.	n.d.
Tebuconazol	n.d.	A → 684 B → 389 C → 525	A → 117 B → 212 C → 430

(n.d) Não foi detectado resíduos na amostra

De acordo com a Tabela 20, o composto dimetoato foi detectado nas amostras “C1” e “C2, os valores de concentração detectados nessas amostras ultrapassam os limites máximos permitidos pela legislação europeia. Com a detecção de dimetoato nas amostras, pode ser constatado que há irregularidades no cultivo pois, esse é um composto que atualmente não consta na listagem dentre os agrotóxicos permitidos para o pessegueiro. Os dados experimentais ainda são confirmados pelas informações fornecidas através da EMATER, a qual ainda registra a aplicação de dimetoato nas culturas, atualmente.

O tebuconazol foi encontrado nas três marcas comerciais de pêssego em calda analisadas, contendo a maior concentração entre os compostos

detectados. De acordo com a ANVISA, todas as concentrações estão acima dos limites permitidos.

Para a amostra de pêssigo *in natura*, resíduos dos agrotóxicos triclorfom, dimetoato e malationa, foram encontrados. Verificou-se também resíduos de difenoconazol porém abaixo do LOQ do método.

As Figuras 17 e 18, apresentam gráficos que ilustram os resultados das análises em que foram detectados resíduos dos agrotóxicos.

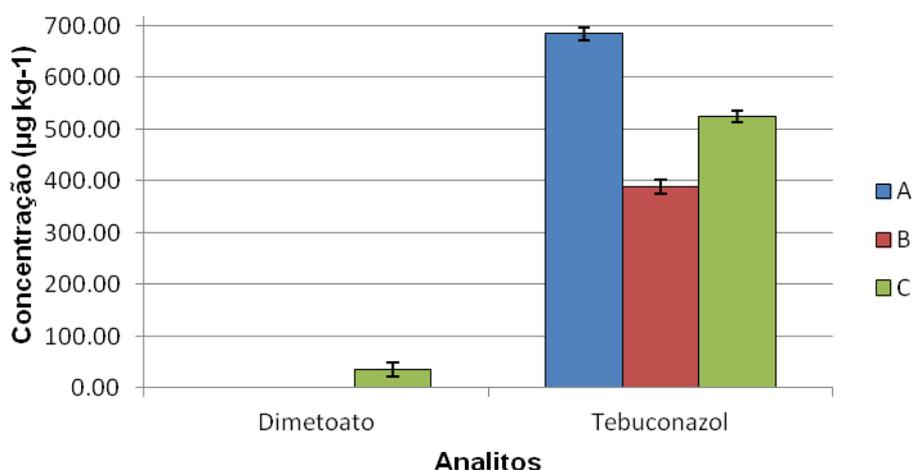


Figura 17 - Concentrações de resíduos dos agrotóxicos detectados nas amostras A, B e C para o pêssigo em calda drenado

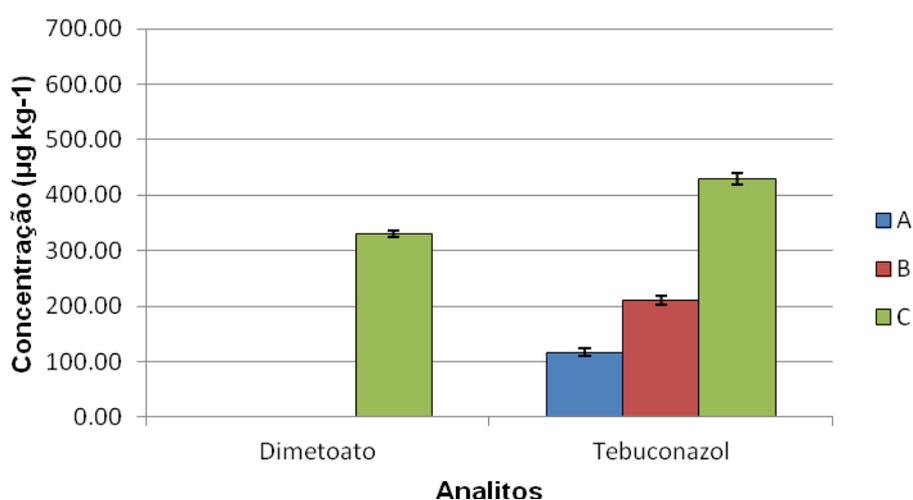


Figura 18 - Concentrações de resíduos dos agrotóxicos detectados nas amostras A, B e C para o pêssigo analisado com a calda

Ao comparar as matrizes de pêssego em calda drenado e com calda, (Figuras 17 e 18) é possível perceber que para o dimetoato houve um aumento na concentração detectada, quando avaliado no pêssego com a calda (Figura 18) enquanto que, observa-se para o tebuconazol um decréscimo na concentração nessa mesma matriz.

Uma possível explicação para o decréscimo e o aumento da concentração dos resíduos de agrotóxicos nessas matrizes, é devido à propriedade físico-química relacionada ao coeficiente de partição octanol-água (K_{OW}) desses compostos. Portanto, compostos com alto K_{OW} , apresentam maior tendência à hidrofobicidade. Isso explica o decréscimo da concentração de tebuconazol quando avaliado juntamente com a calda pois, este tende a ser encontrado mais abundantemente no fruto do que na calda, e neste caso, pode ter havido uma diluição pela adição da calda no fruto. Enquanto que, para o dimetoato, de acordo com seu valor de K_{OW} ($\text{Log } K_{OW} = 0,7$), ele é menos hidrofóbico portanto, esse composto não apresenta tendência em se acumular no fruto, e sim em água, que neste caso está relacionado com a calda. Isso pode ser confirmado nos gráficos das Figuras 17 e 18, que maior concentração deste composto é encontrado quando é avaliada a matriz de pêssego juntamente com a calda.

A composição do pêssego em calda enlatado é uma mistura de pêssegos, água e açúcar. Uma vez adicionado açúcar no processo de industrialização poderia se pensar em uma contaminação por resíduos de agrotóxicos provenientes do açúcar adicionado, porém, os compostos detectados dimetoato e tebuconazol não são registrados na ANVISA para aplicação na cultura da cana-de-açúcar, sendo então provenientes possivelmente da aplicação no pessegueiro.

As Figuras 19, 20 e 21, referem-se aos picos de dimetoato e tebuconazol detectados nas amostras, no modo SIM.

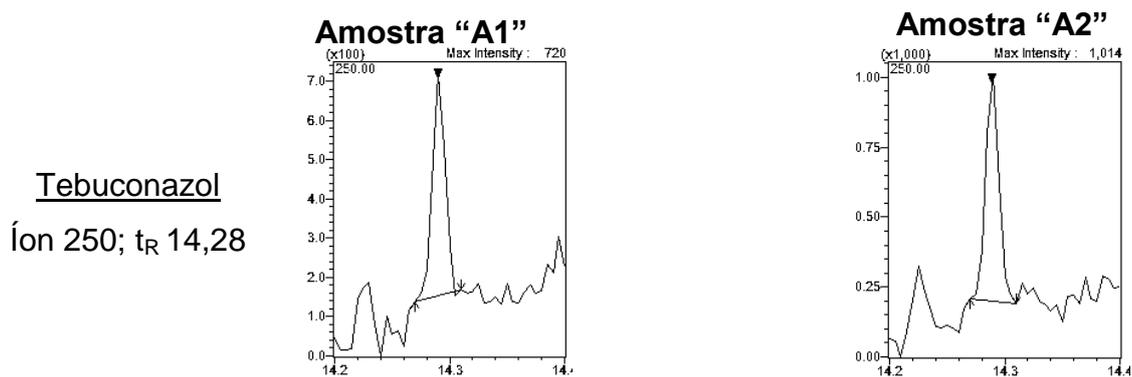


Figura 19 - Confirmação do sinal positivo para resíduos de tebuconazol nas amostras de pêssgo em calda para a marca A

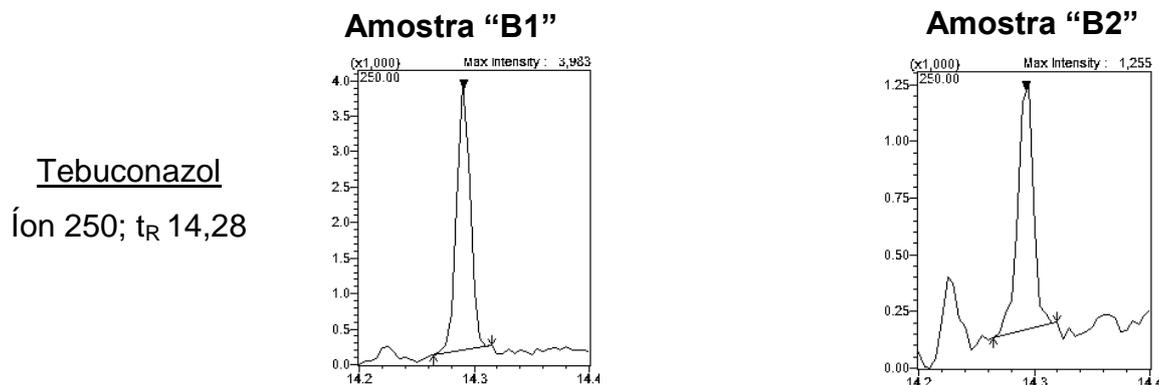


Figura 20 - Confirmação do sinal positivo para resíduos de tebuconazol nas amostras de pêssgo em calda para a marca B

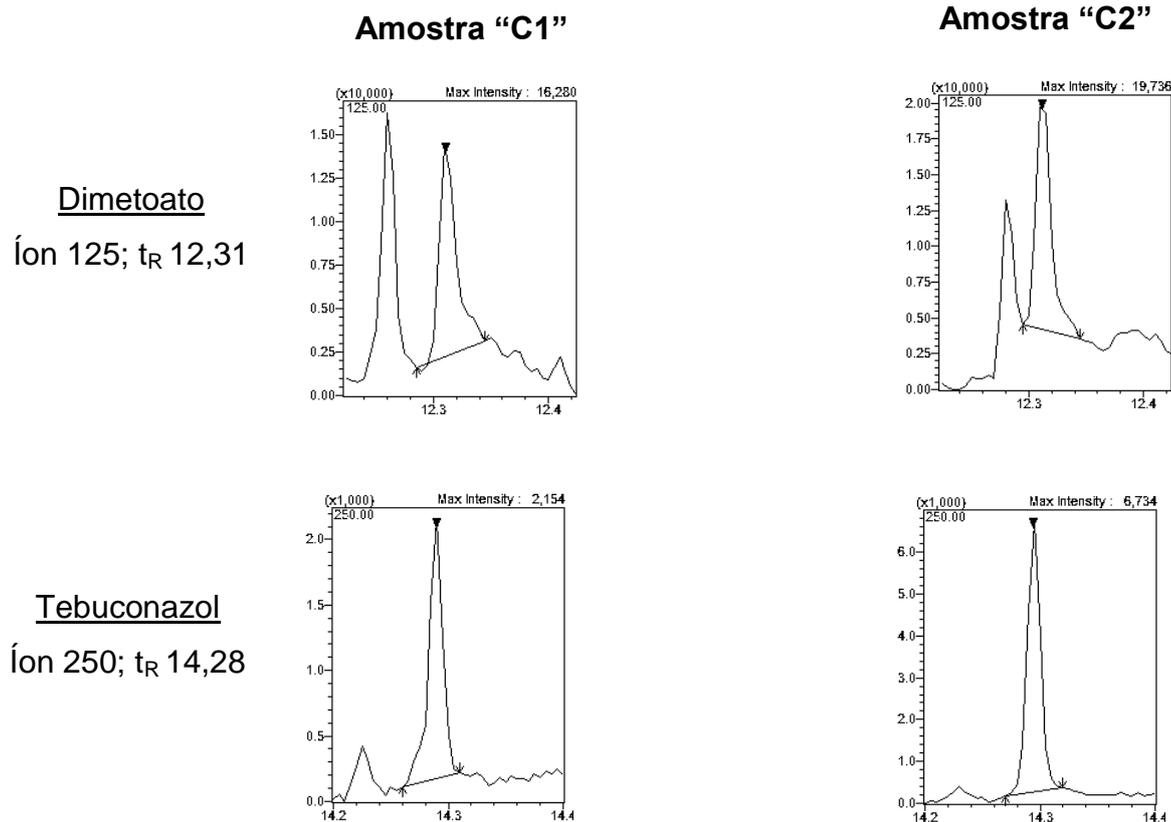


Figura 21 - Confirmação do sinal positivo para resíduos de dimetoato e tebuconazol nas amostras de pêsego em calda para a marca C

A Figura 22 mostra a detecção do tebuconazol em uma das amostras de pêsego em calda drenado, monitorando seus três íons característicos na janela de aquisição do cromatograma, bem como, a identificação do composto utilizando o íon de maior intensidade e confirmado pelo segundo íon menos intenso.

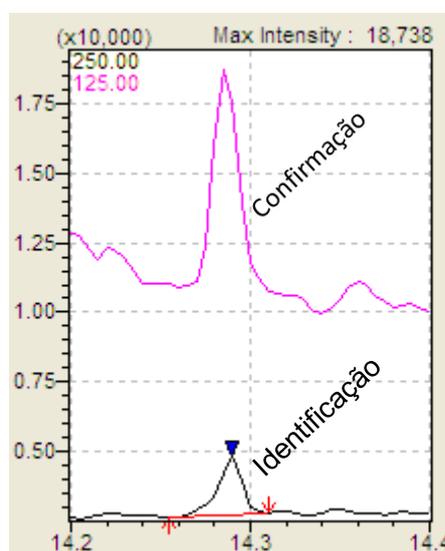
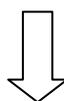
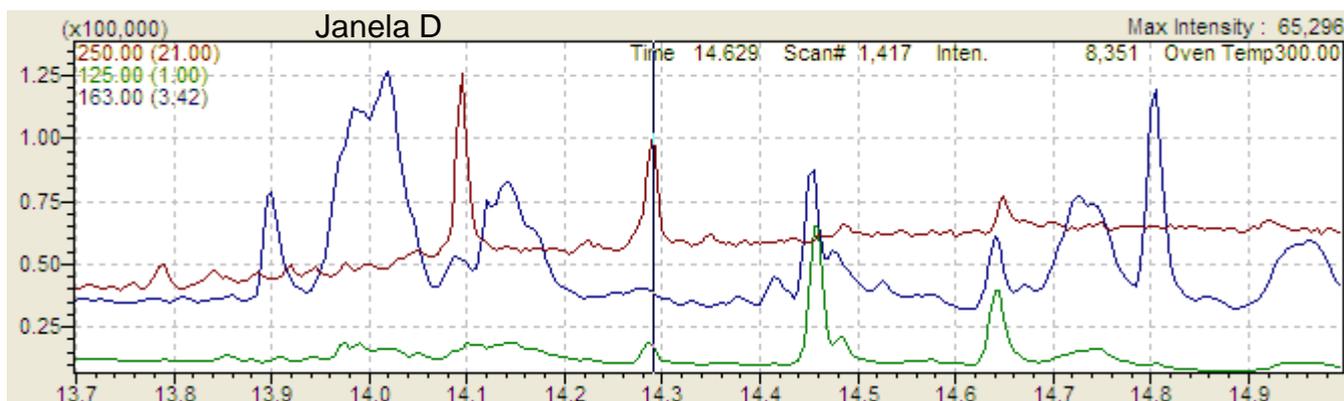


Figura 22 - Representação da detecção de tebuconazol em uma das amostras de pêsego em calda drenado, monitorando um íon para identificação e outro para confirmação

De uma forma em geral, os resultados encontrados neste trabalho, vão de acordo com os presentes na literatura, em relação aos resíduos de agrotóxicos em alimentos após as operações de processamento. Embora não tenha sido o objetivo deste estudo avaliar as amostras antes dos processos de industrialização, é possível concluir que mesmo com todas as etapas envolvidas durante a fabricação dos enlatados de pêsego em calda, resíduos de agrotóxicos podem ser encontrados nesses alimentos.

Dentre os processos que foram mencionados no item 3.1.3, cabe ressaltar o processo da pelagem ou descascamento. A retirada da pele/casca

dos pêssegos por meio de uma solução alcalina com NaOH, pode influenciar em uma contaminação do fruto pelos agrotóxicos que estiverem presentes na sua superfície externa. O meio externo alcalino obtido através desse procedimento pode facilitar a migração de compostos básicos para o interior do fruto pois, o meio externo é desfavorecido para estes grupos de compostos.

O inseticida dimetoato e o fungicida tebuconazol possuem modo de ação sistêmico, ou seja, podem penetrar nos tecidos da planta, sendo mais difícil sua remoção através dos processos aplicados na industrialização.

6. CONCLUSÕES

A otimização das condições cromatográficas foi realizada, permitindo a identificação e quantificação dos compostos em estudo, em um tempo de análise de 18 min. As curvas analíticas apresentaram valores de r maiores que 0,99 para as faixas de concentração avaliadas. A partir da construção da curva trabalho foi possível quantificar os analitos presentes nas amostras com confiança corrigindo possíveis erros sistemáticos da etapa do preparo de amostra, além de avaliar a linearidade do método.

Os limites de quantificação do método apresentaram valores variando entre 1,0 e 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, o que representa uma vantagem por se tratar de uma matriz complexa.

O método QuEChERS original, apresentou melhor eficiência para a extração de agrotóxicos em matrizes de pêssego em calda drenado e com calda quando comparado com métodos acetato e citrato.

Os resultados de recuperação ficaram entre 68 e 124% e com valores de RSD menores que 19% para a maioria dos analitos, valores dentro dos recomendados pelo INMETRO e SANCO, além de ser um método unificado para extração dos agrotóxicos nas matrizes de pêssego em calda drenado e com a calda.

No entanto, foi observado que alguns compostos tiveram efeito matriz, com efeitos positivo para o dimetoato, malationa, tebuconazol e azoxistrobina na matriz para o pêssego em calda drenado e para o tiametoxam e azoxistrobina

para a matriz de pêssego com calda, sendo então, necessária a correção utilizando o extrato da matriz.

O método mostrou ser robusto, uma vez que, foi avaliado em uma matriz com composição diferente, ou seja, a fruta *in natura* sem sofrer as etapas de fervura e da adição de água e açúcar, do processo de fabricação do pêssego em calda. Além disso, a amostra foi coletada em épocas diferentes àquelas das amostras para a validação do método, podendo então demonstrar diferenças na composição do fruto devido à época do plantio, condições climáticas e produtor.

A aplicação do método validado foi bem sucedida uma vez que, evidenciou quantidades de resíduos superiores aos limites máximos permitidos para os agrotóxicos utilizados na cultura do pessegueiro e também cuja utilização não é permitida, como é o caso do dimetoato, segundo as orientações da ANVISA. Isto demonstra uma importante demanda por um maior controle sobre a qualidade desses alimentos por parte dos órgãos fiscalizadores. Evidencia-se também, a importância de avaliar a ocorrência de resíduos de agrotóxicos em pêssego em calda, levando em consideração os altos valores detectados nas amostras, mesmo depois de todo o processo de industrialização (descascamento, fervura e enlatamento).

Esses e outros aspectos indicam a necessidade e a importância de pesquisas com enfoque à qualidade dos alimentos que são distribuídos para os consumidores, além da preocupação ambiental, uma vez que, esses impactos são difíceis e de longo tempo para reparação e, muitas vezes, são irreversíveis.

Portanto, conclui-se que o método mostrou-se adequado à análise simultânea de multiclassés de agrotóxicos em pêssego em calda além de atender ao objetivo de comparar a diferença de avaliação da matriz de pêssego drenado ou com juntamente com a calda.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Aplicação do método validado para o monitoramento de resíduos de agrotóxicos durante todas as etapas da fabricação do pêssego em calda, avaliando as amostras antes e após o processamento industrial;
- ✓ Aplicar para os pêssegos in natura, com casca e sem casca.

8. TRATAMENTO DE RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos gerados pelo método QuEChERS foram coletados, separados em frascos escuros, rotulados e armazenados adequadamente aguardando procedimento a ser adotado pela instituição ou serem aplicados nos processos oxidativos avançados para a degradação dos resíduos de agrotóxicos gerados no decorrer do trabalho.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários) - http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 19 de abril de 2010.

ALBERO, B., *et al.* Multiresidue determination of pesticides in juice by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v. 66, p. 917-924, 2005.

ANASTASSIADES, M., *et al.* Crop Protection, Public Health. **Environmental Safety**, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, p. 2007, 439.

ANASTASSIADES, M., *et al.* Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-43, 2003.

ANDERSSON, A.; PALSHEDEN, H. Comparison of the efficiency of different GLC multi-residue methods on crops containing pesticide residues. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 339, p.365, 1991.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Pesquisa de ingrediente ativo**. Disponível em http://www4.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_pesquisa_ingrediente.asp. Acesso em 16 de março de 2010.

ATHANASOPOULOS, P. E., *et al.* Degradation of methamidophos on soultanina grapes on the vines and during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 91, p. 235–240, 2005.

BARBOSA L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004. 215p.

BARCELÓ, D.; HENNION, M. C. **Trace determination of pesticides and their degradation products in water**. 3. ed. The Netherlands: Elsevier, 1997. 542 p.

BCPC- **British Crop Production Council**. Disponível em <http://www.bcpc.org/>. Acesso em março de 2011.

BLASCO, C., *et al.* Simultaneous determination of imidacloprid, carbendazim, methiocarb and hexythiazox in peaches and nectarines by liquid chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica ACTA**, v. 461, p.109–116, 2002.

BLASCO, C. *et al.* Analysis of pesticides in fruits by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–ion trap–triple stage mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1098, p. 37–43, 2005.

BOOBIS A. R., *et al.* Cumulative risk assessment of pesticide residues in food. **Toxicology Letters**, v.180, p.137–150, 2008.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 junho 2003. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.html>. Acesso em 12 maio de 2011.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7802/1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 jan 2002. Disponível em: www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm. Acesso em 23 de maio de 2011.

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

CABRERA, L. C. *et al.* Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região Sul do Estado do RS. **Química Nova**, v. 31, p.1982-1986, 2008.

CALDAS, S. S. Otimização e validação de métodos empregando DLLME, SPE, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em água subterrânea. 2009. 145p. Dissertação (Mestrado em Química) – FURG, Rio Grande, RS.

CASSIANO, M. N., *et al.* Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, p. 1021-1030, 2009.

CHAVARRI, M. J. *et al.* Pesticide residues in field-sprayed and processed fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84:1253–1259 (online: 2004)

CHEN, G., *et al.* A multi-residue method for fast determination of pesticides in tea by ultra performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry combined with modified QuEChERS sample preparation procedure. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1406–1411, 2011.

CHIN, H. B. The effect of processing on residues in foods: the food processing industry's database, in Pesticide residues and food safety: A harvest of viewpoints. **American Chemical Society**, p.175–181, 1991.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL-FAEPE, 1990, 320 p.

CIOLA, R. **Fundamentos de Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 1998. 178 p.

CODEX ALIMENTARIUS- **Codex Alimentarius Commission on Methods of Analysys and Sampling**. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net>. Acesso em 29 janeiro de 2012.

COLLINS, C. H., *et al.* **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 456 p.

CVUA (CHEMISCHES UND VETERINÄRUNTERSUCHUNGSÄMTER STUTTGART). Disponível em <<http://www.quechers.com>>. Acesso em fevereiro de 2012.

DANIS, T. G., *et al.* Evaluation of pesticides residues in Greek peaches during 2002–2007 after the implementation of integrated crop management. **Food Chemistry**, v. 126, p. 97–103, 2011.

DIAS, A. N. Determinação simultânea de glicerol livre e total, mono-, di- e triglicerídeos em biodiesel etílico de girassol, mamona e da mistura sebo e soja empregando GC-FID. 2010. 133 p. Dissertação (Mestrado em Química) – FURG, Rio Grande. RS.

DORS G. C., *et al.* Distribution of Pesticide Residues in Rice Grain and its Coproducts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1921-1930, 2011.

ELKINS E. R. Effect of commercial processing on pesticide residues in selected fruits and vegetables. **Journal of the Association off Official Analytical Chemists**, v.72, p. 533–535, 1989.

EMATER-PELOTAS - **Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural**. Disponível em <http://www.emater.tche.br/site/>. Acesso em 26 de fevereiro de 2012.

EMBRAPA - **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pessego/CultivodoPessego/cap05.htm>. Acesso em 13 de abril de 2012.

EURACHEM Guide. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. LGC (Teddington) Ltd, 1998. Disponível em: <http://www.eurachem.org/guides/valid.pdf>. Acesso em: 20 março 2012.

FAO - **Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, 2005**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/faostat/collections?hasbulk=0&subset=FoodQuality&language=EN>. Acesso em 15 março de 2012.

FAO – **Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação**. Disponível em <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em 13 de abril de 2012.

FERRER, C., *et al.* Pesticide residue analysis of fruit juices by LC–MS/MS direct injection. One year pilot survey. **Talanta**, v. 83, p. 1552-1561, 2011.

GIHP (General Inspectorate for Health Protection). **Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs**, General Inspectorate for Health Protection, 6th ed., The Hage, 1996.

GONZÁLEZ, R. R., *et al.* Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 76, p. 211 – 225, 2008.

Hajslová, J., *et al.* Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 800, p. 283-295, 1998.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2008. 868 p.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2003. 876 p.

HERBERT, C. G.; JOHNSTONE, R. A. W. **Mass Spectrometry Basics**. Florida: CRC Press; 2002.

HOH, E.; MASTOVSKA, K. Large volume injection techniques in capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1186, p. 2-15, 2008.

HOLLAND, P. T., *et al.* Effects of storage and processing on pesticide residues in plant products. IUPAC Reports on Pesticides (31). **Pure and Applied Chemistry**, v. 66(2), p. 335–356, 1994.

HOWSAM, M. *et al.* Organochlorine exposure and colorectal cancer risk. **Environmental Health Perspectives**, v.112, p.1460–1466, 2004.

IBGE – **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: - <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=rs&tema=lavourapermanent> e2010. Acesso em 13 de abril de 2012.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL) DOQ-CGCRE-008: **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Revisão 03 - Brasília, 2010. 20p. INMETRO, 2010

JARDIM, I. C.; ANDRADE, J. A. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Quimica Nova**, v. 32, p. 996-1012, 2009.

KAUSHIK, G., *et al.* Food processing a tool to pesticide residue dissipation – a review. **Food Research International**, v. 42, p. 26–40, 2009.

KHAN, B. A., *et al.* Determination of residues of trichlorfon and dimethoate on guava using HPLC. **Food Chemistry**, v. 114, p. 286-288, 2009.

KEIKOTLHAILE B. M., *et al.* Effects of food processing on pesticide residues in fruits and vegetables: A meta-analysis approach. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1–6, 2010.

KINSELLA, B., *et al.* Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. **Journal Chromatography A**, v. 1216, p. 7977-8015, 2009.

KIRCHNER, M., *et al.* Practical aspects of splitless injection of semivolatile compounds in fast gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1055, p. 159-168, 2004.

KOESUKWIWAT, U., *et al.* Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 626, p.10 , 2008.

KONTOU, S., *et al.* Stability of the dithiocarbamate pesticide maneb in tomato homogenates during cold storage and thermal processing. **Food Additives and Contaminants**, v. 21(11), p. 1083–1089, 2004.

KRUBE, A., *et al.* Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, p. 58-66, 2008.

LANÇAS, F. M., *Validação de Métodos Cromatográficos de Análise*, 6ª ed., São Carlos, Editora RiMa, 2004.

LEDOUX, M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. **Journal Chromatography A**, v.1218, p. 1021-1036, 2011.

LEHOTAY, S. J., *et al.* Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 615-629, 2005.

LESUEUR, C., *et al.* Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. **Food Control**, v.19, p. 906-914, 2008.

LIAPIS, K. S., *et al.* Rapid multi-residue method for the determination of azinphos methyl, bromopropylate, chlorpyrifos, dimethoate, parathion methyl and phosalone in apricots and peaches by using negative chemical ionization ion trap technology. **Journal of Chromatography A**, v. 996, p. 181–187, 2003.

MARTINEZ-VIDAL, J. L., *et al.* Validation of a gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry based method for the quantification of pesticides in food commodities. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 365, 2006.

MATUSZEWSKI, B.K., *et al.* Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v.75, p. 3019-3030, 2003.

MONTES, R., *et al.* Solid-phase extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction for the sensitive determination of selected fungicides in wine. **Journal of chromatography A**, v. 1216, p. 5459-5466, 2009.

NOGUEIRA, A. M. P. Análise isotópica da variabilidade natural do carbono-13 e avaliação energética em néctares de pêsego – *Prunus pérsica* (L. Batsch). Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP - Campos de Botucatu, SP. 2008.

OTAKE, T., *et al.* Multiresidue analysis and monitoring of pesticides in rice by pressurized liquid extraction. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 44, p. 423–427, 2009.

PAN, J., *et al.* Analysis of pesticide multi-residues in leafy vegetables by ultrasonic solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.15, p. 25–32, 2008.

PANG, G. F., *et al.* Multi-residue method for the determination of 450 pesticide residues in honey, fruit juice and wine by double-cartridge solid phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatographic-tandem mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, p. 777-810, 2006.

PAYÁ P., *et al.* Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass

spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 1697, 2007.

PICÓ, Y., *et al.* Pesticide residue determination in fruit and vegetables by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 153-173, 2000.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. D. Calibration: A review for analytical chemists. **Química Nova**, v. 19, p. 268-277, 1996.

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

PIRARD, C., *et al.* Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1152, p. 116-123, 2007.

PIZZUTTI, I. R., *et al.* Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. **Journal of Chromatography A**, v.1142, p. 123, 2007.

PRESTES, O. D. Desenvolvimento e Validação de Método Multirresíduo para Determinação de Pesticidas em Arroz Polido utilizando Método Quechers Modificado, Clean-Up Dispersivo e GC-MS (NCI-SIM). 2007. 108 p. Dissertação (Mestrado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS.

PRESTES, O. D., *et al.* QuEChERS- Um Método Moderno de Preparo de Amostra para Determinação Multirresíduo de Pesticidas em Alimentos por Métodos Cromatográficos Acoplados à Espectrometria de Massas. **Química Nova**, v.32, p.1620-1634, 2009.

PRIMEL, E. G. Aplicação da Extração em Fase Sólida e técnicas cromatográficas para a determinação de herbicidas em águas de superfície e acompanhamento da degradação a campo e no laboratório. 2003. 170 p. Tese (Doutorado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS.

RADIŠIĆ, M., *et al.* Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 113, p. 712-719, 2009.

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

RIGATTO, P. Correlações entre as abordagens concorrencial e institucional: caso do setor de frutas e conservas do Rio Grande do Sul. **Revista Eletrônica de Administração (REAd)**, v. 5, p. 1-22, 1999.

ROMERO-GONZALEZ R., *et al.* Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 76, p. 211–225, 2008.

SALIM S. Tratado de fruticultura. Piracicaba, São Paulo: FEALQ, 1998.

SANCHEZ-BRUNETE, C., *et al.* Determination of pesticide residues by GC-MS using analyte protectants to counteract the matrix effect. **Analytical Sciences**. v. 21, p. 1291-1296, 2005.

SANCO, COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Document n° SANCO/2007/3131. Method validation and quality control procedures for Pesticide residues analysis in food and feed**. 3^a Ed., Bruxelas, Bélgica. 31/10/2007.

SANCO, COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Document n° SANCO/12495/2011. Method validation and quality control procedures for Pesticide residues analysis in food and feed**. Upsala, Suécia. 01/01/2012.

SCHWARZENBACH, R. P., *et al.* Environmental Organic Chemistry, Wiley-Interscience: USA, 1995.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. **Agrotóxicos e Ambiente**. Embrapa Informações Tecnológicas - Brasília, 2004, p. 400.

SILVA, D. G. M., *et al.* Simultaneous determination of eight pesticide residues in coconut using MSPD and GC-MS. **Talanta**, v. 76, p. 680-684, 2008.

SINDAG – **Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola**. Disponível em http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=1399. Acesso em 18 de abril de 2012.

SCHENCK, F. J. *et al.* A Rapid Multiresidue Method for Determination of Pesticides in Fruits and Vegetables by Using Acetonitrile Extraction/Partitioning and Solid-Phase Extraction Column Cleanup. **Journal of AOAC International**, v. 91, p. 422, 2008.

SHENCK, F. J., LEHOTAY, S. J. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food. **Journal of Chromatography A**, v. 868, p. 51 – 61, 2000.

SHIMELIS, O., *et al.* Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis. **Journal Chromatography A**, v.1165, p. 18, 2007.

SKOOG, D. A. *et al.* **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson, 2006. 999 p.

SOLIMAN, K. M. Changes in concentrations of pesticide residues in potatoes during washing and home preparation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 887–891, 2001.

STAJNBAHER, D; ZUPANCIC-KRALJ, L. Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1015, p. 185-198, 2003.

STAN, H. J. Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection: State-of-the-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evaluation. **Journal of Chromatography A**, v.892, p. 347, 2000.

TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos)- Versão 2, segunda edição, Campinas-SP, 2006.

TAYLOR, M. J., *et al.* Multi-residue method for rapid screening and confirmation of pesticides in crude extracts of fruits and vegetables using isocratic liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 982, p. 225–236, 2002.

TEXEIDÓ, E., *et al.* Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1185, p. 102–108, 2008.

TOMLIN, C. D. S. **The e-Pesticide Manual, Thirteenth Edition, Version 3.0.** Londres, 2003. CD-ROM.

THOMPSON, M., *et al.* Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 835-855, 2002.

TROSKEN, E. R., *et al.* Quantitation of 13 azole fungicides in wine samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1083, p. 113-119, 2005.

TSAI, W. H., *et al.* Application of dispersive liquid–liquid microextraction and dispersive micro-solid-phase extraction for the determination of quinolones in swine muscle by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, p. 56–62, 2009.

UYGUN, U., *et al.* Residue levels of malathion and its metabolites and fenitrothion in post-harvest treated wheat during storage, milling and baking. **Food Chemistry**, v. 92, p. 643–647, 2005.

VALENTINI, S. R., *et al.* Validação de métodos analíticos. **Arquivos do Mudi**, v. 11, p. 26-31, 2007.

VARGA, R., *et al.* Determination of antihypertensive and anti-ulcer agents from surface water with solid-phase extraction – liquid chromatography –

electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 83, P.1447–1454, 2011.

VEKÉY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 227 – 236, 2001.

ZROSTLÍKOVA, J., *et al.* Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 937, p. 73-86, 2001.

WALORCZYK, S., *et al.* Multiresidue determination of 160 pesticides in wines employing mixed-mode dispersive-solid phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 85, p. 1856-1870, 2011.

WANG, S., *et al.* Application of matrix solid-phase dispersin and liquid chromatography- mass spectrometry to fungicide residue analysis in fruits and vegetables. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 673-685, 2007.

WANG, Y., *et al.* Determination of triazines in honey by dispersive liquid–liquid microextraction high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4241-4246, 2010.

WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, v. 125, p. 803–812, 2011.

10. PRODUÇÕES CIENTÍFICAS REFERENTE AO TRABALHO

✓ COSTA, F. P. ; PRIMEL, E. G. ; CALDAS, S. S. ; SILVEIRA, M. A. K. . **Otimização de metodologia analítica empregando LC-DAD para a determinação de agrotóxicos em pêssego**. 4º Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins - SIMCRO, 2010. Campos do Jordão – SP. Anais do 4º Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins - SIMCRO, 2010.

✓ COSTA, F. P. ; SILVEIRA, M. A. K. ; BOLZAN, C. M. ; GUIMARAES, B. S. ; SOARES, B. M. ; CALDAS, S. S. ; PRIMEL, E. G. **Otimização e validação de método empregando QuEChERS modificado e LC-DAD para a determinação de agrotóxicos em pêssego em calda**. XVIII Encontro de

Química da Região Sul (SBQ Sul), 2010. Curitiba – PR.

Anais do XVIII Encontro de Química da Região Sul, 2010.

✓ COSTA, F. P. ; SILVEIRA, M. A. K. ; GUIMARÃES, B. de S. ; BOLZAN, C. M. ; CALDAS, S. S. ; PRIMEL, E. G. **Otimização de método empregando LC-DAD para a determinação dos agrotóxicos multiclasses em pêssego.** IX Mostra de Produção Universitária – MPU, 2010. Rio Grande – RS.

✓ COSTA F. P. ; BOLZAN C. M. ; GUIMARÃES B. S. ; SILVEIRA M. A. K. ; CALDAS S. S. ; PRIMEL G. P. **Otimização e validação de método empregando QuEChERS modificado e LC-DAD para a determinação de agrotóxicos organofosforado, triazol, estrobilurina e cloroaromático em pêssego,** I Fórum Acadêmico Integrado de Química (FAIQ), 2010. Rio Grande – RS.

✓ COSTA F. P. ; CALDAS S. S.; GUILHERME J. R. ; SILVEIRA M. A. K. GUIMARÃES B. S. ; PRIMEL G. P. **Otimização de método empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS para determinação simultânea de dez agrotóxicos em pêssego em calda.** X Mostra de Produção Universitária – MPU, 2011. Rio Grande – RS.

✓ COSTA F. P. ; GUILHERME J. R. ; SILVEIRA M. A. K. ; CALDAS S. S. ; PRIMEL G. P. **Validação de método para a determinação de fungicidas e inseticidas em pêssego empregando o método QuEChERS e HPLC-DAD.** 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. (SBQ Nacional), 2011. Florianópolis – SC. Apresentação oral na seção de Alimentos e bebidas.