



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

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
EMPREGANDO MSPD, QuEChERS MODIFICADO E  
LC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE  
AGROTÓXICOS EM CEBOLA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Sherol Acosta Rodrigues**

**Rio Grande - RS, Brasil  
2010**

# **OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS EMPREGANDO MSPD, QuEChERS MODIFICADO E LC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM CEBOLA**

por

**Sherol Acosta Rodrigues**

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**  
**Co-orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Badiale Furlong**  
**Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves**

**Rio Grande, RS, Brasil**

**2010**

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

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

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
EMPREGANDO MSPD, QuEChERS MODIFICADO E  
LC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE  
AGROTÓXICOS EM CEBOLA**

elaborada por  
**Sherol Acosta Rodrigues**

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

**Comissão Examinadora**

---

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

---

**Prof. Dr. Renato Zanella (UFSM)**

---

**Prof. Dr. Márcio Raimundo Milani (FURG)**

---

**Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves (FURG)**

Rio Grande, 25 de janeiro de 2010

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel** pela oportunidade, pela orientação, pelo apoio e incentivo. Por acreditar em minha capacidade e não medir esforços para que este trabalho fosse realizado com qualidade. Obrigada!

Ao **Prof. Dr. Renato Zanella** pela disponibilidade em participar na defesa da dissertação e, por contribuir com suas sugestões para o final deste estudo.

Ao **Prof. Dr. Márcio Raimundo Milani** pela participação e sugestões na defesa da dissertação, e pelos ensinamentos enquanto professor.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Badiale Furlong** pela co-orientação, participação e sugestões no exame de qualificação, e pelos ensinamentos enquanto professora.

Ao **Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves** pela co-orientação, pelas contribuições no exame de qualificação, pelo aceite em participar da defesa da dissertação e pelos conhecimentos divididos durante o desenvolvimento deste estudo.

Aos meus pais, **Rudimar e Cleusa**, pelo amor, pelo apoio, pela minha educação, pelos exemplos de vida. Vocês foram incansáveis e não me deixaram desistir nunca, mesmo tendo que suportar a saudade e a distância. Obrigada por tudo. Amo vocês!

À minha irmã **Helena**, que apesar de tão pequenina encheu minha vida de alegria e felicidade. Seu sorriso amenizou os momentos difíceis e foi fonte de inspiração. Conte sempre comigo, te amo!

Ao meu noivo, **Jerônimo**, que sempre esteve ao meu lado. Por ter suportado a distância e a ausência em dias de estudo. Amor, obrigada pela sua generosidade, companheirismo e carinho, você foi fundamental neste caminho. Te amo muito.

À minha amiga **Adri**, pela amizade, pelas horas de estudo, pelo apoio, pela companhia diária, pelas conversas e, pelos momentos de descontração. Com certeza ter você como colega e companheira de laboratório foi um presente, conte sempre comigo.

À minha amiga **Sergi**, pela experiência compartilhada, pela paciência, pelo apoio e, pelas valorosas contribuições neste trabalho. Companheira de viagens e de

bons momentos de descontração agradeço por você ter me acolhido tão bem e ter se tornado uma grande amiga. Sentirei saudades da nossa convivência diária.

À minha amiga **Lizi**, pela receptividade, pelo apoio, pelas amplas discussões, pelos sábados de trabalho compartilhados, pela paciência e, pela disposição em me ajudar em todos os momentos. Você é uma pessoa muito especial, obrigada por tudo.

Aos meus colegas do LACOM com os quais convivi, e que contribuíram de diversas formas, tenho um carinho muito grande por todos. **Vivi, Márcia, Fabi, Lizi, Adri Demoliner, Adri Dias, Ana Raisal, Luis, Sergi, Maristela, Cátia, Ednei, Fábio, Nathiele, Maicon, Liziane e Débora**. Agradeço principalmente à **Vivi e a Márcia** pela amizade e disposição em ajudar de sempre.

Aos **colegas do Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental**, pelos momentos vividos durante o decorrer desses dois anos. Em especial, agradeço à **Jaque** por compartilhar comigo os momentos e as tensões antes de ingressarmos no mestrado.

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

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. Em especial, agradeço aqueles que incentivaram a minha iniciação científica como a **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Rosilene Maria Clementin**.

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 - PPGQTA  
Universidade Federal do Rio Grande - FURG  
OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS EMPREGANDO MSPD, QuEChERS  
MODIFICADO E LC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM  
CEBOLA  
AUTORA: SHEROL ACOSTA RODRIGUES  
ORIENTADOR: PROF. Dr. EDNEI GILBERTO PRIMEL  
Rio Grande, 25 de janeiro de 2010

A cebola (*Allium Cepa L*) tem grande importância social e econômica. É considerada um alimento funcional devido à presença de compostos bioativos em sua composição. O sistema de plantio empregado é a agricultura familiar. No Brasil a cebola é plantada do sul ao nordeste do país, e os estados de Santa Catarina (SC), Rio Grande do Sul (RS) e Paraná (PR) têm grande destaque com relação à produção nacional. Em 2007, o RS produziu 161.530 toneladas de cebola. Entretanto, a cultura é atacada por várias doenças, o que pode acarretar o uso indiscriminado de agrotóxicos quando as Boas Práticas Agrícolas não são respeitadas. Por isso, resíduos de agrotóxicos podem ser encontrados em alimentos, afetando a segurança alimentar. Neste trabalho, a determinação dos agrotóxicos dimetoato, metalaxil-M, tebuconazol, azoxistrobina e difenoconazol em cebola empregando Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD), QuEChERS modificado e Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em *tandem* com fonte de ionização por *Electrospray* (LC-ESI-MS/MS). Para o método empregando MSPD e LC-ESI-MS/MS foram utilizados 0,5 g de amostra, 1,0 g de C18 reutilizada e 10,0 mL de acetonitrila. Após a otimização dos parâmetros de extração e fragmentação dos compostos, o método foi validado avaliando-se curva analítica, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão (recuperação). Todas as curvas analíticas apresentaram valores de  $r$  maiores que 0,99. Os Limites de Quantificação (LOQs) para o método estiveram na faixa de 0,01 - 0,1 mg kg<sup>-1</sup>. Foram encontradas recuperações entre 83,3 – 120,4% para a repetibilidade e entre 78,7 e 120,2% para a precisão intermediária, com RSD de 1,7 a 15,4% para todos os compostos. Para o método empregando QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS foram utilizados 10,0 g de amostra, 4,0 g de MgSO<sub>4</sub> anidro e 10,0 mL de acetonitrila. Todas as curvas analíticas apresentaram valores de  $r$  maiores que 0,99. Os LOQs para o método, variaram entre 0,0005 - 0,05 mg kg<sup>-1</sup>. As recuperações foram entre 65,2 – 120,6% para a repetitividade e entre 61,8 e 116,7% para a precisão intermediária, com RSD de 2,0 a 20% para todos os compostos. Com relação ao Efeito Matriz (EM) avaliado para todos os compostos pelos dois métodos, MSPD proporcionou menor EM para os compostos estudados do que QuEChERS modificado. Entretanto, os EM para ambos os métodos foram compensados com calibração por superposição na matriz. Os métodos apresentaram vantagens com relação à métodos tradicionais de preparo de amostra, como não necessitar aplicação de etapa de *clean-up* e, utilizar pouco volume de solvente orgânico. Os limites de quantificação dos métodos ficaram abaixo dos limites máximos de resíduos permitidos pela legislação brasileira para os compostos em cebola. O método empregando MSPD foi aplicado para determinação de resíduos destes agrotóxicos em amostras de cebola coletadas na região. Resíduos de agrotóxicos não foram encontrados nas amostras analisadas.

Palavras-chave: agrotóxicos; cebola; MSPD; QuEChERS; LC-ESI-MS/MS

## ABSTRACT

Master's Thesis

Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental - PPGQTA  
Universidade Federal do Rio Grande - FURG

OPTIMIZATION AND VALIDATION OF METHODS USING MSPD, QuEChERS,  
LC-ESI-MS/MS FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDE IN ONION

AUTHOR: SHEROL ACOSTA RODRIGUES

ADVISOR: EDNEI GILBERTO PRIMEL, M. S., Ph. D.

January 25th, 2010, Rio Grande, RS, Brazil

The Onion (*Allium Cepa L*) has a social and economical importance. It is considered a functional food due to the presence of bioactive compounds in its composition. The planting system used is the familiar agriculture. In Brazil the onion is cultivated from south to northeast and the Santa Catarina (SC), Rio Grande do Sul (RS) and Paraná (PR) states have an important participation in the onion national production. In 2007, the RS produced 161.530 tons of onions. However, the crop is attacked by various diseases, which leads to the indiscriminate use of pesticides when the good agricultural practices are not observed. Because of this, residues of these compounds can be found in foods affecting food security. In this study, the determination of the pesticides dimethoate, metalaxyl-M, tebuconazole, azoxystrobin and difenoconazole in onion was performed using Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD), modified QuEChERS and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in tandem with Electrospray Ionization source (LC-ESI-MS/MS). For the method using MSPD and LC-ESI-MS/MS 0.5 g of sample, 1.0 g of C18 reused and 10.0 mL of acetonitrile were used. After the extraction and fragmentation optimization, the method was validated by evaluating the analytical curve, linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), precision (repeatability and intermediate precision) and accuracy (recovery). All calibration curves showed  $r$  values higher than 0.99. The LOQs of the method ranged between 0.01 and 0.1 mg kg<sup>-1</sup>. The recoveries ranged between 83.3 to 120.4% for repeatability and between 78.7 and 120.2% for intermediate precision with RSD from 1.7 to 15.4% for all compounds. For the method employing modified QuEChERS and LC-ESI-MS/MS 10.0 g of sample, 4.0 g MgSO<sub>4</sub> and 10.0 mL of acetonitrile were used. All calibration curves showed  $r$  values higher than 0.99. The LOQs of the method were between 0.0005 and 0.05 mg kg<sup>-1</sup>. The recoveries ranged between 65.2 and 120.6% for repeatability and between 61.8 and 116.7% for intermediate precision, with RSD from 2.0 to 20% for all compounds. Regarding to the Matrix Effect (ME) which was evaluated for all compounds by both methods, MSPD provided less ME than modified QuEChERS. However, the ME for both methods was compensated with matrix-matched calibration. The methods showed advantages such as not require the clean-up step, use inexpensive instrumentation for sample preparation and low volume of organic solvents. The LOQs of the methods were below the maximum residue levels allowed for these compounds in onions. The method employing MSPD was applied for determination of residues of these pesticides in onion samples which were collected in the region of Rio Grande. No pesticide residues were found in the samples.

Keywords: pesticides; onion; MSPD; QuEChERS; LC-ESI-MS/MS

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção de cebola, em toneladas, no Estado do Rio Grande do Sul (Fonte: IBGE, lavoura temporária 2007) .....	21
Figura 2 - Vendas de defensivos agrícolas no Brasil, janeiro - fevereiro, ano - 2008 versus 2009 (milhões R\$). Fonte: SINDAG, 2009.....	28
Figura 3 - Sintomas do ataque da tripes em cebola. Fonte: EMBRAPA, 2007 .....	31
Figura 4 - Diagrama da ESI, da formação dos íons na solução antes de serem introduzidos no MS. Fonte: HARRIS, 2001 .....	43
Figura 5 - Diagrama de blocos de um sistema LC-MS. Fonte: SKOOG, 2008.....	44
Figura 6 - Sistema de Espectrometria de Massas em <i>tandem</i> . Fonte: adaptado de SKOOG, 2008 .....	44
Figura 7 - Comparação entre os cromatogramas obtidos, (a) por LC-UV e (b) por LC-MS para análise de morangos contendo carbendazim. Fonte: FERNANDEZ-ALBA, 2005 .....	46
Figura 8 - Sistema de infusão pós-coluna. Fonte CASSIANO <i>et al.</i> , 2009.....	49
Figura 9 - Comparação da resposta do EM empregando três diferentes preparos de amostra. Fonte KRUIVE <i>et al.</i> , 2008 .....	51
Figura 10 - Passos típicos da extração por MSPD. Adaptado de BARKER, 2007 ....	55
Figura 11 - Fluxograma representativo do método QuEChERS original. Fonte: PRESTES <i>et al.</i> , 2009.....	59
Figura 12 - Cromatogramas dos compostos em diferentes vazões de fase móvel, (a) 0,4 mL min <sup>-1</sup> ; (b) 0,3 mL min <sup>-1</sup> ; (c) 0,2 mL min <sup>-1</sup> . Ordem de eluição: dimetoato, metalaxil-M, azoxistrobina, tebuconazol e difenoconazol; padrão de 1 mg L <sup>-1</sup> .....	81
Figura 13 - Cromatogramas no modo MRM contendo as duas fragmentações monitoradas para cada composto .....	84
Figura 14 – Recuperações (%) dos agrotóxicos empregando diferentes massas de C18 para 0,5 g de amostra; 3 h de interação pós-fortificação (nível de 1,0 mg Kg <sup>-1</sup> ); dispersão por 5 min e eluição com 10,0 mL de acetonitrila. As barras de erro indicam valores de RSD .....	86
Figura 15 – Recuperações (%) dos agrotóxicos em diferentes tempos de interação após a etapa de fortificação (nível 1,0 mg Kg <sup>-1</sup> ). As barras de erro indicam valores de RSD.....	87
Figura 16 - R% e RSD dos agrotóxicos em diferentes tempos de dispersão; 0,5 g de amostra; 1,0 g de C18; 1 h após a fortificação (nível de 1,0 mg Kg <sup>-1</sup> ); eluição da coluna de MSPD com 10,0 mL de acetonitrila. As barras de erro indicam valores de RSD.....	88
Figura 17 - R% dos agrotóxicos empregando diferentes solventes de eluição; 0,5 g de amostra; 1,0 g de C18 reutilizada; 1 h após a fortificação (nível de 1,0 mg Kg <sup>-1</sup> ); 5 min dispersão e 10,0 mL de solvente. As barras de erro indicam valores de RSD ...	89
Figura 18 - R% dos agrotóxicos por MSPD; 0,5 g de amostra + 1,0 g de suporte sólido, 1 h pós-fortificação (nível de 1,0 mg Kg <sup>-1</sup> ), 5 min de dispersão, eluição com 10,0 mL de acetonitrila. As barras de erro indicam valores de RSD .....	90



Figura 19 – Recuperações (%) para diferentes formas de quantificação e valores de EM% para todos os compostos empregando MSPD. As barras de erro indicam valores de RSD. As barras de erro indicam valores de RSD .....	91
Figura 20 - Esquema do procedimento para MSPD otimizado.....	92
Figura 21 - Comparação entre o método QuEChERS modificado, no nível de 1,0 mg kg <sup>-1</sup> , com e sem emprego da etapa de <i>clean-up</i> . As barras de erro indicam valores de RSD.....	93
Figura 22 - Valores de Recuperação (%) e RSD para os compostos em relação aos reagentes adicionados no processo de extração. As barras de erro indicam valores de RSD.....	94
Figura 23 - Comparação entre as recuperações dos compostos por QuEChERS, nível de fortificação 1,0 mg kg <sup>-1</sup> , empregando diferentes formas de quantificação e EM% para todos os compostos.....	95
Figura 24 - Esquema do procedimento realizado para o método QuEChERS modificado.....	97
Figura 25 - Recuperações (R%) e RSD (RSD%), nível de fortificação 1,0 mg kg <sup>-1</sup> , para os métodos empregando MSPD e QuEChERS modificado.....	98
Figura 26 - Avaliação do efeito matriz para o método empregando MSPD e para o método empregando QuEChERS modificado.....	100

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos cientificamente comprovados da cebola .....	22
Tabela 2 - Agrotóxicos e organismos alvo .....	25
Tabela 3 - Comercialização de agrotóxicos por estado brasileiro em 2006 .....	27
Tabela 4 - Classificação dos agrotóxicos em relação a sua toxicidade.....	29
Tabela 5 - Classe, grupo químico, LMR e intervalo de segurança para agrotóxicos aplicados em cebola na região de Rio Grande.....	33
Tabela 6 - Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos selecionados para estudo	34
Tabela 7 – Publicações sobre EM, empregando ESI como fonte de ionização .....	52
Tabela 8 - Condições empregadas no sistema cromatográfico.....	80
Tabela 9 - Resultado da otimização das condições de fragmentação para determinação dos agrotóxicos no espectrômetro de massas .....	83
Tabela 10 - Metodologias empregadas no método QuEChERS original, no método de Lesueur e colaboradores e no método utilizado neste trabalho .....	96
Tabela 11 - Principais diferenças dos métodos empregando MSPD e QuEChERS .	99
Tabela 12 - Resultados obtidos para calibração dos agrotóxicos, empregando MSPD, no sistema LC-ESI-MS/MS .....	101
Tabela 13 - Resultados obtidos para calibração dos agrotóxicos, empregando QuEChERS, no sistema LC-ESI-MS/MS .....	101
Tabela 14 - Limites de detecção e quantificação instrumental ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e dos métodos ( $\text{mg Kg}^{-1}$ ) .....	102
Tabela 15 - Recuperação, $\text{RSD}_r$ e $\text{RSD}_{pi}$ do método empregando MSPD e LC-ESI-MS/MS para os agrotóxicos em amostras de cebola fortificadas em diferentes níveis .....	104
Tabela 16 - Recuperação, $\text{RSD}_r$ e $\text{RSD}_{pi}$ do método empregando QuEChERS e LC-ESI-MS/MS para os agrotóxicos em amostras de cebola fortificadas em diferentes níveis.....	105

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\mu$  - micro ( $10^{-6}$ )

$\Omega$  - ohm

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*

APCI - Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

API - Ionização a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*

ASE – Extração Acelerada com Solvente, do inglês *Accelerated Solvent Extraction*

C18 - sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano

CAS - *Chemical Abstracts Service*

CODEX - *Codex Alimentarius*

CCPR - *Codex Alimentarius Committee on Pesticide Residues*

d.i. - diâmetro interno

DDT - 2,2 bis(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano

DL - dose letal

DLLME - Micro Extração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Extraction*

ECD - Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Electron-Capture Detection*

EM - Efeito Matriz, do inglês *matrix effect*

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ESI - Ionização por *Electrospray*, do inglês *Electrospray Ionization*

eV - elétron-Volt

FAO - *Food Agriculture Organization*

GARP - Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas

GC - Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

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

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICH - *International Conference on Harmonisation*

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia

INPEV - Instituto Nacional de Processamento de Embalagens Vazias

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

$K_{ow}$  - Coeficiente de partição octanol-água

LC - Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LC-ESI-MS/MS - Cromatografia Líquida com Fonte de Ionização por Electrospray acoplada à Espectrometria de Massas *tandem* Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography coupled with Electrospray Ionization with Mass Spectrometry tandem Mass Spectrometry*

LLE - Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*

LMR - Limite Máximo de Resíduos

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

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

$m/z$  - razão massa-por-carga

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MRM - Monitoramento de Múltiplas Reações, 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*

OMS - Organização Mundial da Saúde

PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

p.a. - grau pró-análise

pH - potencial hidrogeniônico

PI - Padrão Interno

$P_{ka}$  - potencial de dissociação ácida

PSA - Amina primária secundária, do inglês *Primary Secondary Amine*

QuEChERS - Rápido, Fácil, Barato, Eficiente, Robusto e Seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

$r$  - Coeficiente de correlação linear

$R$  - Recuperação

RE - Resolução (legislação)

rpm - rotação por minuto

RSD - Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

$RSD_{pi}$  - Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

$RSD_r$  - Desvio Padrão Relativo para Repetitividade

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*

$t_R$  - tempo de retenção

USE - Extração por Ultra-som, do inglês *Ultrasonic Extraction*

UV - ultravioleta

v/v - volume por volume

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Cebola.....</b>	<b>19</b>
3.1.1	Origem.....	19
3.1.2	Histórico.....	19
3.1.3	Produção e Importância Sócio-econômica .....	20
3.1.4	Importância Terapêutica e Composição .....	22
<b>3.2</b>	<b>Agrotóxicos.....</b>	<b>23</b>
3.2.1	Conceitos.....	23
3.2.2	Classificação .....	24
3.2.3	Histórico e Consumo .....	25
3.2.4	Toxicidade .....	28
3.2.5	Uso de agrotóxicos em cebola .....	30
3.2.6	Agrotóxicos selecionados para o estudo .....	32
<b>3.3</b>	<b>Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas.....</b>	<b>41</b>
3.3.1	Monitoramento de Reações Múltiplas.....	45
3.3.2	Detector .....	45
<b>3.4</b>	<b>Efeito Matriz em LC-ESI-MS/MS.....</b>	<b>45</b>
<b>3.5</b>	<b>Preparo de amostra para extração de agrotóxicos em alimentos .....</b>	<b>52</b>
3.5.1	MSPD .....	54
3.5.2	QuEChERS .....	58
<b>3.6</b>	<b>Validação de métodos cromatográficos.....</b>	<b>61</b>
3.6.1	Curva analítica e linearidade .....	62
3.6.2	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	64
3.6.3	Exatidão.....	65
3.6.4	Precisão.....	66
3.6.5	Robustez .....	67
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>67</b>
<b>4.1</b>	<b>Instrumentação.....</b>	<b>67</b>
<b>4.2</b>	<b>Reagentes, solventes, adsorventes e materiais .....</b>	<b>68</b>
<b>4.3</b>	<b>Preparo das soluções analíticas .....</b>	<b>69</b>
<b>4.4</b>	<b>Otimização do sistema cromatográfico LC-ESI-MS/MS para determinação dos compostos.....</b>	<b>69</b>
4.4.1	Seleção da fase móvel e da vazão .....	70
4.4.2	Preparo da fase móvel.....	70
4.4.3	Otimização dos parâmetros para fragmentação dos compostos no MS.....	70
<b>4.5</b>	<b>Otimização do procedimento para MSPD.....</b>	<b>71</b>
4.5.1	Quantidade de amostra e adsorvente .....	71
4.5.2	Tempo de interação após a fortificação.....	72
4.5.3	Tempo de dispersão da amostra com o adsorvente.....	73
4.5.4	Seleção do solvente de eluição .....	73
4.5.5	C18 versus outros adsorventes .....	74
4.5.6	Efeito Matriz empregando MSPD .....	74
<b>4.6</b>	<b>Otimização do procedimento QuEChERS modificado .....</b>	<b>75</b>
4.6.1	Avaliação da influência da etapa de <i>clean-up</i> na exatidão do método .....	75
4.6.2	Influência do NaCl na recuperação dos compostos .....	76
4.6.3	Efeito Matriz empregando QuEChERS modificado .....	76
<b>4.7</b>	<b>Validação dos métodos.....</b>	<b>76</b>

4.7.1	Curva analítica e linearidade .....	77
4.7.2	Limites de detecção e quantificação.....	77
4.7.3	Exatidão.....	78
4.7.4	Precisão.....	79
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>5.1</b>	<b>Otimização do sistema cromatográfico LC-ESI-MS/MS para determinação dos compostos.....</b>	<b>80</b>
5.1.1	Otimização dos parâmetros para fragmentação dos compostos no MS.....	82
<b>5.2</b>	<b>Otimização do procedimento para MSPD.....</b>	<b>85</b>
5.2.1	Razão amostra:C18.....	85
5.2.2	Tempo de interação após a etapa de fortificação .....	86
5.2.3	Tempo de dispersão da amostra com o adsorvente.....	87
5.2.4	Seleção do solvente de eluição .....	88
5.2.5	C18 <i>versus</i> outros suportes sólidos.....	89
5.2.6	Efeito matriz empregando MSPD .....	90
5.2.7	Procedimento para MSPD otimizado.....	91
<b>5.3</b>	<b>Otimização do procedimento QuEChERS modificado .....</b>	<b>92</b>
5.3.1	Avaliação da influência da etapa de <i>clean-up</i> na exatidão do método .....	92
5.3.2	Influência da adição NaCl na recuperação dos compostos .....	93
5.3.3	Efeito Matriz empregando QuEChERS modificado .....	94
5.3.4	Procedimento QuEChERS otimizado .....	95
<b>5.4</b>	<b>MSPD <i>versus</i> QuEChERS modificado .....</b>	<b>97</b>
<b>5.5</b>	<b>Validação dos métodos.....</b>	<b>100</b>
5.5.1	Curva analítica e linearidade .....	100
5.5.2	Limites de detecção e limites de quantificação.....	101
5.5.3	Exatidão.....	102
5.5.4	Precisão.....	103
<b>5.6</b>	<b>Aplicabilidade .....</b>	<b>106</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>109</b>
<b>8</b>	<b>TRATAMENTO DE RESÍDUOS GERADOS.....</b>	<b>109</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>110</b>
<b>10</b>	<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO TRABALHO.....</b>	<b>119</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O crescimento demográfico faz aumentar a demanda por alimentos. Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2009), a produção mundial de alimentos precisa crescer cerca de 70% até 2050 para suprir as necessidades da população que deve crescer em torno de 2,3 bilhões de pessoas.

Entre os alimentos mais consumidos mundialmente está a cebola, com produção mundial em torno de 55 milhões de toneladas. A cebola (*Allium Cepa L*) é considerada um alimento funcional devido às propriedades antioxidantes e anticancerígenas, consequência da presença de compostos bioativos como a quercetina em sua composição (ROLDÁN *et al.*, 2008; DINI *et al.*, 2008).

Com tudo, a cultura de cebola é atacada por várias doenças de origem fúngica, bacteriana, viral e nematológica, que podem ocorrer no campo, na pós-colheita, no transporte, no armazenamento e na comercialização. As doenças fúngicas são as de maior número e geralmente mais destrutivas, entretanto, podem ser mais fáceis de controlar. Estas doenças podem provocar desde danos leves até perdas muito grandes, dependendo do patógeno envolvido, do nível de resistência da planta, das condições ambientais, do tipo de manejo dado à cultura e mesmo da eficácia das medidas de controle empregadas (EMBRAPA, 2004).

Assim, a busca pela boa produtividade agrícola incentiva o uso indiscriminado de agrotóxicos. O emprego destes compostos é necessário, mas o não cumprimento das Boas Práticas Agrícolas pode afetar a segurança alimentar propiciando a ocorrência de resíduos de agrotóxicos em diferentes cultivos, inclusive em cebola. Por isso, a determinação de resíduos de agrotóxicos em cebola depende de métodos eficientes de extração que atendam às exigências das legislações da área.

Geralmente, as análises qualitativas e quantitativas incluem uma etapa preliminar de preparo da amostra, a qual é fundamental para garantir a eficiência do processo analítico. Especialmente, quando o método é aplicado para determinação de resíduos em matrizes complexas.

O preparo de amostra a ser empregado em um método analítico é dependente das características da matriz, das propriedades do analito e do nível de concentração da substância a ser determinada. Em geral, as etapas típicas incluídas no preparo da amostra são: amostragem, homogeneização, extração, *clean-up* e



concentração seguido pela determinação final. Entre os muitos métodos que existem para extrair agrotóxicos de alimentos podem ser citados a Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD, do inglês, *matrix solid-phase dispersion*) e o método QuEChERS, (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). Estes foram desenvolvidos como alternativa para problemas relacionados aos métodos mais tradicionais de preparo de amostra, que empregam elevado volume de solventes orgânicos, em geral demorados e trabalhosos.

Para determinação de agrotóxicos são empregadas técnicas cromatográficas bem estabelecidas como a Cromatografia Líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*) e a Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*). Essas técnicas podem ser acopladas a diferentes detectores, sendo que alta seletividade e sensibilidade são alcançados pelo acoplamento com a Espectrometria de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*).

O desenvolvimento de métodos que apresentem alta sensibilidade e seletividade, que utilizem pequeno volume de solventes orgânicos, que sejam mais rápidos e mais simples, exemplifica o papel fundamental da Química Analítica na questão da segurança alimentar.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é desenvolver e validar métodos para determinar resíduos de agrotóxicos em cebola empregando MSPD, QuEChERS modificado e Cromatografia Líquida com Fonte de Ionização por Eletrospray acoplada à Espectrometria de Massas, *tandem*, Espectrometria de Massas (LC-ESI-MS/MS), enfocando o preparo da amostra através da otimização da técnica MSPD e do método QuEChERS modificado.

Para desenvolver e validar os métodos foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Selecionar os principais agrotóxicos empregados na cultura de cebola;
- Otimizar os parâmetros instrumentais do LC-ESI-MS/MS como, por exemplo, fase móvel, pH, vazão, colunas cromatográficas, energia do cone, energia de colisão, temperatura da fonte, fluxo do gás de dessolvatação para determinação dos compostos em estudo;
- Otimizar os principais parâmetros que afetam a eficiência da extração por MSPD;
- Propor modificações no método QuEChERS, proposto por LESUEUR *et al.* (2008);
- Validar os métodos empregando MSPD, QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação dos agrotóxicos em cebola, avaliando a influência do Efeito Matriz (EM) na exatidão dos métodos;
- Demonstrar a aplicabilidade do método empregando MSPD e LC-ESI-MS/MS na determinação de resíduos de agrotóxicos em cebola.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Cebola

##### 3.1.1 Origem

Espécies pertencentes ao gênero *Allium* são encontradas em uma ampla gama de altitudes e latitudes que incluem desde o círculo polar Ártico até o continente europeu, Ásia, América do Norte e África. No entanto, em contraste com a maioria das plantas cultivadas, o centro exato de origem da cebola ainda permanece obscuro (EMBRAPA, 2004).

A maioria dos botânicos, todavia, aponta a Ásia Central, o Afeganistão, as ex-Repúblicas Soviéticas de Tadjiquistão e de Uzbequistão, e a parte ocidental de Tianchan, como o seu provável centro de origem ou primário. Por outro lado, são considerados prováveis centros de domesticação ou centros secundários de origem o Oriente Próximo, que abrange o interior da Ásia Menor, toda a Transcaucásia, o Irã, as terras altas do Turcomenistão e as regiões do Mediterrâneo, que compreendem os países em torno do mar Mediterrâneo (EMBRAPA, 2007).

##### 3.1.2 Histórico

O registro mais antigo sobre o cultivo da cebola (*Allium Cepa L*) data de cerca de 3.200 anos a.C., sendo a região da antiga Pérsia um dos primeiros centros de domesticação. Devido as suas características de boa conservação pós-colheita, a cebola foi historicamente uma das hortaliças com maior trânsito global, estando envolvida em transações comerciais entre países de todos os continentes (EMBRAPA, 2004).

No Brasil, a cebola é plantada desde a região Sul até a região Nordeste. Os Estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná, Bahia, Pernambuco e Minas Gerais são responsáveis pela quase totalidade da produção nacional (MOREIRA *et al.*, 2002; REGHIN *et al.*, 2006).

Nas décadas de 60 e 70 o mercado atacadista brasileiro era abastecido basicamente pela oferta do estado do Rio Grande do Sul (RS) e secundariamente por Santa Catarina (SC). Na década de 80 o país tornou-se auto suficiente em cebola a partir do desenvolvimento de novas técnicas de cultivo. Em 1985, SC expandiu sua área de produção, apresentando cebola de baixo custo e qualidade superior a do RS, tornando-se o principal ofertante da região Sul. Na década de 90 o mercado interno foi abastecido pela produção nacional (OSAKI, 2003).

A globalização da economia mundial e a formação do Mercosul interferiram significativamente no mercado de hortaliças no Brasil, sobretudo o da cebola. As tendências das produções na Argentina e no Brasil evidenciam um mercado competitivo do qual continuarão participando somente os países que tiverem vantagens comparativas e fizerem reconversão nos setores produtivos (EMBRAPA, 2007).

### 3.1.3 Produção e Importância Sócio-econômica

A cebola é a espécie do gênero *Allium* mais cultivada e mais importante sob o ponto de vista de consumo e valor econômico. No Brasil, ocupa a terceira posição em importância econômica, ficando atrás apenas da batata e do tomate (FILHO *et al.*, 2007; ROLDÁN *et al.*, 2008).

O desempenho da cultura é condicionado, em parte, pela adaptação da cultivar às condições agroecológicas, sendo o clima quente e seco favorável à cultura, bem como os solos de textura média ou arenosos leves (FILGUEIRA, 2003).

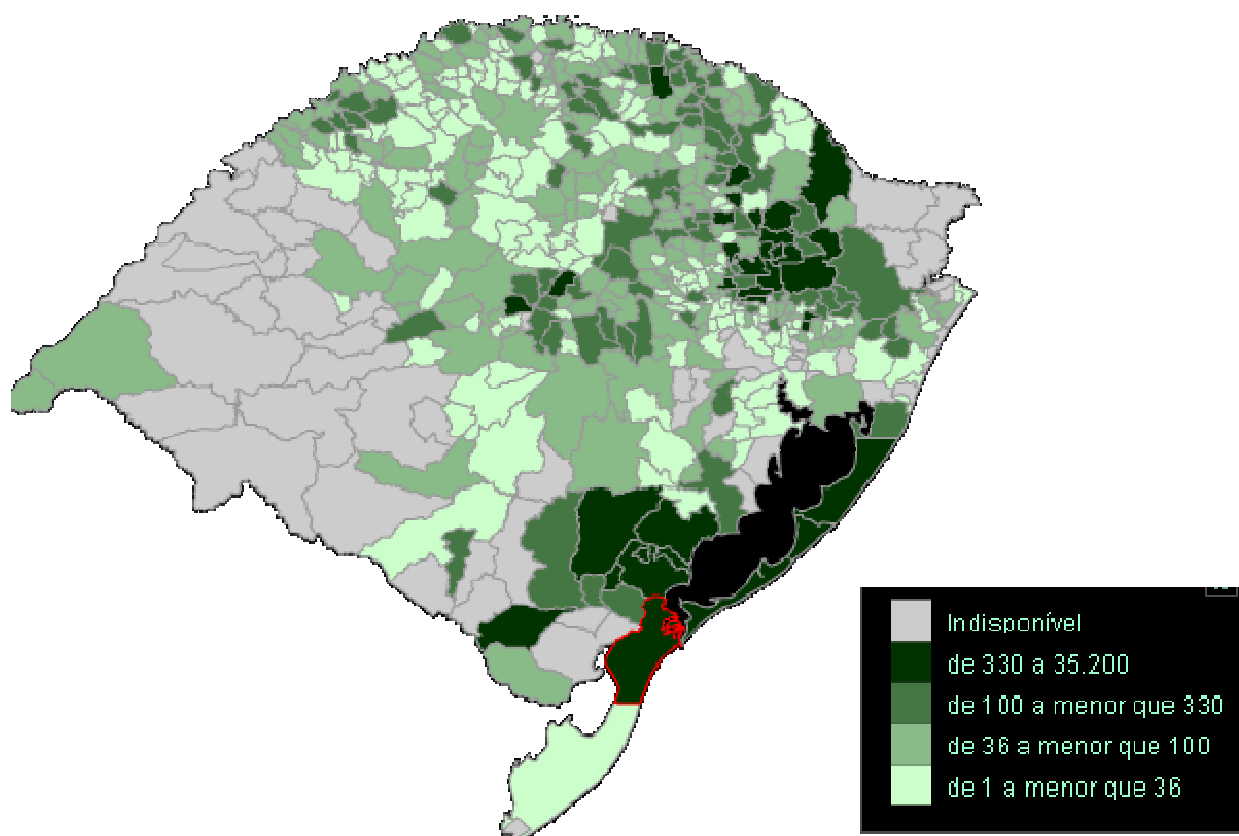
O maior produtor mundial de cebola é a China, que no ano de 2004 foi responsável por cerca de 32,7% da produção mundial sendo, também, o país que apresenta a maior superfície cultivada. Outros países, como a Índia, Rússia e Paquistão se destacam entre os maiores produtores mundiais, com áreas acima de 100 mil hectares. O Brasil situa-se como o nono maior produtor mundial, com uma área de 57,03 mil ha. Na América do Sul, o Brasil é o maior produtor, seguido pela Argentina, Colômbia e Peru (EMBRAPA, 2007).

A cebolicultura no Brasil é uma atividade praticada principalmente por pequenos produtores e a sua importância sócio-econômica se fundamenta não

apenas na rentabilidade, mas, na grande demanda de mão-de-obra, contribuindo para a viabilização de pequenas propriedades e a fixação dos produtores na zona rural, reduzindo a migração para as grandes cidades.

Estima-se que a cadeia produtiva gera mais de 250 mil empregos diretos só no setor da produção. São mais de 102 mil produtores envolvidos na exploração econômica da cebola. A cultura de caráter tipicamente familiar (88%) é responsável pela sobrevivência no campo de um grande número de pequenos produtores que têm a cebola como única fonte de renda (EMBRAPA, 2004).

Segundo a FAO, em 2004 a produção mundial foi cerca de 55 milhões de toneladas (DINI *et al.*, 2008). A produção nacional em 2007 foi 1360,301 toneladas, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2007). No RS o município de Rio Grande destaca na produção de cebola, como pode ser observado na Figura 1.



**Figura 1 - Produção de cebola, em toneladas, no Estado do Rio Grande do Sul (Fonte: IBGE, lavoura temporária 2007)**

### 3.1.4 Importância Terapêutica e Composição

O papel da cebola na dieta alimentar está além de apenas nutrir o organismo do indivíduo que dela se alimenta. O consumo de cebola auxilia na prevenção de certas doenças, o que a caracteriza como um alimento funcional. Este fato tem sido atribuído aos compostos orgânicos sulfurados, abundantes nos tecidos da planta. Entre as principais ações terapêuticas está a ação inibidora sobre alguns microorganismos, devido à presença de substâncias com atividade antibiótica (EMBRAPA, 2007). A Tabela 1 apresenta alguns efeitos cientificamente comprovados da cebola.

**Tabela 1 - Efeitos cientificamente comprovados da cebola**

<b>EFEITO</b>	<b>AÇÃO</b>
Antibacteriano	Inibe bactérias causadoras de cáries e distúrbios gástricos
Antifúngico	Inibe a ação de fungos causadores de micose
Cardiovascular	Reduz o risco de trombose e aterosclerose; estimula o coração
Antiasmática	Ameniza sintomas da asma
Hipoglicêmico	Auxilia no controle da diabetes
Anticancerígeno	Reduz risco de câncer de esôfago, estômago e mama
Antiinflamatório	Auxilia no combate de inflamações
Outros	Antioxidante, desintoxicante de metais pesados

Fonte: CARVALHO e MACHADO, 2004.

A cebola é particularmente rica em dois grupos de compostos com comprovado benefício à saúde humana: flavonóides e sulfóxidos de cisteína (compostos organosulfurados). Dois sub-grupos de compostos do tipo flavonóide predominam em cebolas: as antocianinas (que conferem a coloração avermelhada ou roxa aos bulbos) ou as quercetinas e seus derivados (que conferem coloração amarelada ou cor de pinhão aos bulbos). As antocianinas, quercetinas e seus derivados são de grande interesse pelas suas propriedades anticarcinogênicas (PRAKASH *et al.*, 2007; ROLDÁN *et al.*, 2008; DINI *et al.*, 2008);

A composição de cebola é influenciada pelas condições de cultivo (sistema de produção, tipo de solo, clima) e por fatores genéticos. Bulbos de cebola para

consumo fresco são pouco calóricos e contém de 89 a 95% de água, além de mono e dissacarídeos (açúcares totais em torno de 6%), proteínas (1,6%), gordura (0,3%) e sais minerais (0,65%). Os compostos orgânicos sulfurados conjuntamente com os carboidratos, conferem o gosto acre açucarado da cebola (RANDLE, 1997; HAMILTON, 1998).

## 3.2 Agrotóxicos

### 3.2.1 Conceitos

Termos freqüentes como pesticida, agrotóxico, praguicida, defensivo agrícola, biocida, entre outros, são utilizados para denominar um grande grupo de substâncias naturais ou sintéticas que são empregadas com o objetivo de controlar ou combater vários tipos de pragas, plantas daninhas ou doenças. O termo agroquímico, aplicado em sentido mais amplo, refere-se a substâncias que são empregadas para aumentar a produção agrícola. Neste último, estão incluídos os hormônios ou reguladores de crescimento de plantas e os fertilizantes (BARBOSA, 2004).

No Brasil (2002), de acordo com o decreto nº 4.074, que regulamenta a lei 7802/1989, defensivos agrícolas, ou agrotóxicos, são *“produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias de produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”*.

De acordo com o Codex Alimentarius pesticida é definido como sendo *“toda e qualquer substância utilizada com o propósito de prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar qualquer peste, incluindo espécies indesejáveis de plantas, insetos ou animais, durante as etapas de produção, armazenamento, transporte, distribuição /e processamento do alimento ou ração animal”* (FAO, 2005).

Para BAIRD (2002), pesticidas são substâncias que podem matar diretamente um organismo indesejável ou controlá-lo de alguma maneira (por exemplo, interferindo em seu processo reprodutivo). Ainda, ROCHA (2009), denomina pesticidas todas as substâncias de origem natural ou sintética utilizada no controle e/ou eliminação/diminuição de pragas (insetos, ervas daninhas, etc.), as quais causam prejuízos na produção de alimentos ou transferem enfermidades aos seres humanos e a outros organismos.

Neste estudo, agrotóxico foi o termo adotado de acordo com o observado em publicações e reuniões nacionais sobre o tema. O termo agrotóxico é usado em seu mais amplo sentido, e qualquer composto que seja manufaturado para ser utilizado na agricultura, visando prevenir ou reduzir efeitos adversos de pragas, está incluso dentro desta definição (SILVA eFAY, 2004).

### 3.2.2 Classificação

Os agrotóxicos abrangem um grande número de moléculas químicas, com diferentes modos de ação e toxicidade, sendo divididos em classes como apresentado na Tabela 2. Além disso, podem ser divididos em dois grupos principais, agrotóxicos de contato ou não sistêmicos e agrotóxicos sistêmicos.

Os agrotóxicos de contato ou não sistêmicos não penetram no tecido vegetal e, conseqüentemente, não são translocados ou transportados dentro do sistema vascular das plantas. Os primeiros inseticidas, herbicidas e fungicidas pertenciam a esse grupo, e tiveram como desvantagem o fato de serem susceptíveis aos efeitos do clima (vento, chuva, sol), deixando a planta desprotegida contra o ataque de pragas. O caráter sistêmico foi introduzido nos agrotóxicos que vieram após 1940. Estes penetram na cutícula da planta sendo transportados pelo seu sistema vascular. São pouco afetados pelo clima e conferem imunidade em todo o crescimento da nova planta (SILVA e FAY, 2004).



**Tabela 2 - Agrotóxicos e organismos alvo**

<b>Agrotóxicos/Classe</b>	<b>Organismo-alvo</b>
acaricida	ácaros
algicida	algas
avicida	pássaros
bactericida	bactérias
desinfetante	microorganismos
fungicida	fungos
herbicida	plantas
inseticida	insetos
larvicida	larvas de insetos
moluscicida	caracóis, lesmas
nematicida	nematóide
piscicida	peixes
raticida	roedores

Fonte: BAIRD, 2002.

Também, os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com a persistência. Essa classificação se dá em função do tempo de meia vida dos compostos. O tempo de meia vida é o tempo necessário, após a aplicação, para que a sua eficácia seja reduzida à metade. Aqueles com tempos de meia vida de até 90 dias, são classificados como de persistência curta; de 91 a 180 dias, persistência média; tempos maiores que 180 dias, persistência longa (SANCHES, 2003; ANVISA, 2005; PRESTES, 2007).

### 3.2.3 Histórico e Consumo

Desde o início da civilização o homem tem buscado melhorar suas condições de vida, e a melhoria alcançada tem resultado em uma maior expectativa de vida, acarretando um crescente aumento da população. Nesse esforço, o homem deixou de retirar seu alimento diretamente da natureza através da caça, da pesca, da cata de frutos e outros vegetais e passou a criar várias espécies de animais e a cultivar inúmeras espécies de vegetais (BARBOSA, 2004).

Assim, há tempos têm sido necessária a utilização de agrotóxicos na agricultura para atender a demanda alimentar. Entre os compostos utilizados como agrotóxicos, destacam-se algumas moléculas, como o enxofre utilizado desde 1.000 a.C. para prevenir doenças e insetos, e o arsênico no século XVI, utilizado pelos chineses como inseticida. No século XVII surgiu o primeiro inseticida natural, a nicotina, retirada de folhas de tabaco. Nesse mesmo século foram introduzidas a retenona e o piretrum, que ainda hoje são utilizados como inseticidas, além do mercúrio e do sulfato de cobre que foram usados como fungicidas (SILVA e FAY, 2004).

Após a Segunda Guerra Mundial, os agrotóxicos começaram a ser empregados em escala mundial, sendo que vários deles já serviram de arma química nas guerras da Coréia e do Vietnã, como o Agente Laranja (mistura de 2,4-D e 2,4,5 T), desfolhante que ajudou a dizimar milhares de soldados e civis (BARBOSA, 2004).

No Brasil, a introdução de agrotóxicos organossintéticos teve início em 1943, quando chegaram às primeiras amostras do inseticida DDT (SPADOTTO *et al.*, 2004). Em 1998, o consumo no Brasil foi cerca de 307 mil toneladas de produtos comerciais, formulados com cerca de 250 ingredientes ativos. No período de 1964 a 1998, a área com culturas agrícolas aumentou 78% enquanto que o aumento no consumo de agrotóxicos foi de 700%, no mesmo período (SPADOTTO *et al.*, 2004).

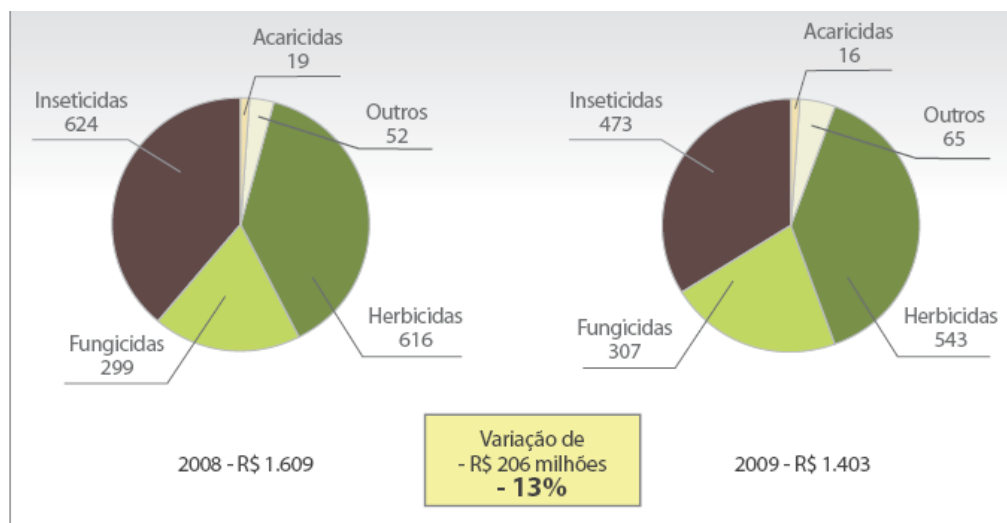
A comercialização de agrotóxicos no Brasil, por estado em 2006, teve como maiores consumidores os estados de São Paulo, Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul, como pode ser observado na Tabela 3.

**Tabela 3 - Comercialização de agrotóxicos por estado brasileiro em 2006**

<b>ESTADO</b>	<b>PERCENTUAL DE</b>	<b>VENDAS POR 1.000</b>
	<b>VENDAS</b>	<b>US\$</b>
Bahia	6,0%	236.358
Demais estados	7,1%	277.424
Goiás	8,8%	344.445
Mato Grosso	17,9%	702.198
Mato Grosso do Sul	4,7%	185.087
Minas Gerais	9,0%	351.104
Paraná	13,4%	526.463
Rio Grande do Sul	10,4%	405.840
Santa Catarina	2,1%	82.678
São Paulo	20,6%	808.244
Total	100,0%	3.919.841

Fonte: SINDAG, 2007

Em 2008 o Brasil assumiu a liderança mundial no consumo de agrotóxicos, posição antes ocupada pelos Estados Unidos. Só o mercado de agrotóxicos movimentou mais de US\$ 7 bilhões. As vendas de defensivos acumuladas até o mês de fevereiro de 2009 totalizaram R\$ 1,403 bilhão, com redução de 13% em comparação ao mesmo período de 2008 (SINDAG, 2009). O SINDAG atribui o resultado a diminuição nas vendas de herbicidas e inseticidas nas culturas de soja, milho safrá, feijão, algodão, batata e cana-de-açúcar. A Figura 2 compara as vendas de defensivos no ano (janeiro-fevereiro) – 2008 *versus* 2009 (milhões R\$).



**Figura 2 - Vendas de defensivos agrícolas no Brasil, janeiro - fevereiro, ano - 2008 versus 2009 (milhões R\$). Fonte: SINDAG, 2009**

#### 3.2.4 Toxicidade

Os agrotóxicos podem ter efeitos (toxicologia aguda ou crônica) sobre os organismos vivos, incluindo o homem. O efeito agudo se observa após o contato com uma única dose do agrotóxico, é dependente da toxicidade da substância, da dose, do tipo de contato e do organismo em particular.

O efeito crônico ocorre quando o organismo é exposto a pequenas doses de uma substância potencialmente perigosa por um longo período de tempo. A ingestão de alimentos contaminados com resíduos de agrotóxicos é um exemplo de exposição que pode ocasionar efeitos crônicos sobre o sistema nervoso central ou, mesmo, câncer, dependendo do tipo de composto e da quantidade ingerida (BARBOSA, 2004).

Uma medida frequentemente empregada para avaliar a toxicidade aguda dos agrotóxicos e outras substâncias químicas é a Dose Letal 50% (DL<sub>50</sub>). A DL<sub>50</sub> representa a quantidade (dose única) da substância necessária para matar 50% dos animais testados nas condições experimentais utilizadas (BARBOSA, 2004).

A legislação brasileira obriga às formulações de agrotóxicos a apresentarem no rótulo, a cor correspondente à classe de sua toxicidade, para alertar sobre o perigo desta formulação (BRASIL, 2002). De acordo com a Tabela 4, a identificação dos rótulos desses produtos é feita por meio de faixas coloridas.

**Tabela 4 - Classificação dos agrotóxicos em relação a sua toxicidade**

<b>Classe</b>	<b>DL<sub>50</sub></b>	<b>Classificação</b>	<b>Cor da faixa no rótulo da embalagem</b>
I	0-50	Extremamente tóxico	Vermelho vivo
II	50-500	Altamente tóxico	Amarelo intenso
III	500-5000	Mediamente tóxico	Azul intenso
IV	>5000	Pouco tóxico	Verde intenso

Fonte: ANVISA, 2005.

No meio ambiente, o uso de agrotóxicos destinados ao controle de pragas na agricultura deve ser moderado e aplicado com alguns cuidados, caso contrário, pode causar a contaminação e até a desertificação do solo. O uso intenso de agrotóxicos pode causar a degradação dos recursos naturais, em alguns casos de forma irreversível, levando à desequilíbrios biológicos e ecológicos, entre eles a contaminação de lençóis freáticos e aquíferos (JARDIM *et al.*, 2009).

De acordo com a legislação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Lei 9.974 de 06/06/2000 e Decreto 4.074, de 04/01/2001, é obrigatória a devolução das embalagens vazias (após a lavagem), no prazo máximo de um ano a contar da compra do produto, ao posto de recebimento indicado na nota fiscal de compra.

Em 2009, segundo dados do Instituto Nacional de Processamento de Embalagens Vazias (INPEV), nos primeiros sete meses de 2009 foram recolhidos do meio ambiente 17.191,5 toneladas de embalagens vazias de agrotóxicos. Esse volume representa um crescimento de 18,1% em relação ao mesmo período do ano anterior, quando as unidades de recebimento de todo o país destinaram 14.554,8 toneladas (INPEV, 2009).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável pelo processo de registro de aditivos, pesticidas e drogas veterinárias e pela condução de avaliação do risco da exposição humana a estas substâncias e a contaminantes em alimentos. Internacionalmente, procedimentos de avaliação do risco são conduzidos pelos comitês científicos da Organização Mundial de Saúde (OMS) e FAO para subsidiar o estabelecimento de padrões alimentares pelo *Codex Alimentarius* (JARDIM e CALDAS, 2009).

Para cada produto registrado existe um limite máximo de resíduo (LMR) permitido por lei. Esses LMR são obtidos com base em estudos realizados seguindo-se as boas práticas agrícolas. A legislação brasileira sobre resíduos de agrotóxicos tem sido aperfeiçoada nos últimos anos com base em informações fornecidas pela FAO/OMS e pelo *Codex Alimentarius* (BARBOSA, 2004).

O *Codex Alimentarius* define LMR como sendo a concentração máxima do resíduo de um pesticida (expresso em  $\text{mg kg}^{-1}$ ), recomendado pelo comitê do *Codex Alimentarius* sobre resíduos de pesticidas (CCPR, do inglês *Codex Alimentarius Committee on Pesticide Residues*) como sendo legalmente permitido dentro do alimento ou da ração animal (PRESTES *et al.*, 2009).

### 3.2.5 Uso de agrotóxicos em cebola

A cultura de cebola está sujeita à ação de grande número de pragas e patógenos, necessitando de freqüentes e diversificadas aplicações de agrotóxicos. HEEMST (1985) verificou os efeitos da competição das plantas daninhas em 26 culturas agrícolas e listou-as na ordem decrescente de capacidade competitiva. O trigo foi considerado de maior capacidade e a cebola foi classificada em último lugar. Como consequência final da interferência das plantas daninhas, a produtividade da cebola decresce drasticamente, podendo atingir até 100% de perdas na produção de bulbos comercializáveis (SOARES, 2003).

O míldio, causado por *Peronospora destructor*, é uma doença fúngica muito importante devido à velocidade com que se propaga na cultura. Os sintomas iniciais de folhas infectadas são manchas grandes, de tonalidade verde-clara e esporulação acinzentada. As folhas infectadas tornam-se amareladas, podendo dobrar-se e morrer. A podridão causada por *B. cepacia*, conhecida como podridão de escamas, também é de ocorrência comum. Ocorre em bulbos já maduros e/ou armazenados podendo causar até 50% de descarte na comercialização dos bulbos. Essa bactéria causa podridão dos catafilos (escamas) mais externos dos bulbos, deixando-os com aparência úmida e amarelada, e provoca geralmente o seu desprendimento (FILHO, 2007).

Dentre as pragas que atacam a cultura da cebola, podem ser citadas as de maior expressão econômica, como: tripes, mosca minadora, lagarta rosca, larva

arame e a lagarta das folhas. A tripses ou piolho - *Thrips tabaci* é considerada a praga mais importantes. Trata-se de um inseto, que além da cebola, ataca um grande número de culturas. Os sintomas do ataque caracterizam-se pelo prateamento, enrolamento e necrose de folhas (Figura 3), entre outros. Essa praga compromete a qualidade do material produzido e o seu armazenamento (EMBRAPA, 2007).



**Figura 3 - Sintomas do ataque da tripses em cebola. Fonte: EMBRAPA, 2007**

No Brasil ocorrem situações em que a cebola, como única fonte de renda dos produtores, precisa ser comercializada imediatamente após a colheita, até mesmo sem cura, para recuperar o escasso capital de giro e sustentar a sobrevivência da família. Sem cura, a cebola, além da aparência não-atrativa, fica mais exposta às deteriorações. Além dos bulbos mal curados, verifica-se ainda o apodrecimento por falta de adequado armazenamento, bulbos atacados por pragas e doenças, manuseio e transporte feito sem cuidados, má aparência visual dos bulbos (VILELA *et al.*, 2005).

O controle de plantas oportunistas em cebola é muito importante, principalmente, durante o primeiro mês após o transplante, pois as plantas têm baixo porte, crescimento lento e requerem boa luminosidade para o seu perfeito desenvolvimento. Das práticas disponíveis para o controle, o químico é o mais eficiente (MOREIRA *et al.*, 2002).

Embora o uso de agrotóxicos seja necessário para garantir bons resultados de produtividade, o uso destes compostos está se expandindo cada vez mais. Um exemplo do aumento da aplicação de agrotóxicos na cultura de cebola é o Estado de Santa Catarina, onde o controle que antigamente era feito com duas ou três

aplicações de fungicidas passou a receber nos últimos 10 anos, mais de 15 intervenções no mesmo ciclo de cultivo (BOFF *et al.*, 2005).

Este fato em combinação com o desrespeito as Boas Práticas Agrícolas gera preocupação com relação à exposição humana a estes produtos. No Brasil, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), iniciado em 2001 pela ANVISA, avalia continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos in natura que chegam à mesa do consumidor. A cebola foi incluída no Programa em 2008. De 103 amostras analisadas, 2,91% (3 amostras) foram consideradas insatisfatórias, em decorrência, exclusivamente, do uso de acefato, agrotóxico não autorizado para esta cultura (ANVISA, 2008).

### 3.2.6 Agrotóxicos selecionados para o estudo

Os agrotóxicos foram selecionados a partir de entrevistas com produtores de cebola dos municípios de São José do Norte-RS e Rio Grande-RS. Em Rio Grande as entrevistas foram realizadas nos distritos de Povo Novo e da Quitéria. Questionamentos a respeito dos agrotóxicos mais empregados na cultura de cebola, da época de aplicação dos produtos e sobre a existência de orientação para aplicação dos mesmos foram realizados.

A partir dos dados obtidos nas entrevistas foi realizada uma pesquisa nas páginas eletrônicas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para identificar quais dos compostos mais empregados (Tabela 5) são permitidos para a cultura de cebola e quais destes poderiam ser determinados no laboratório LACOM da FURG. Foram consideradas para seleção dos compostos as características químicas, as propriedades físico-químicas (Tabela 6), a classificação toxicológica e a disponibilidade de padrões dos agrotóxicos no laboratório.

Os agrotóxicos selecionados para o trabalho foram dimetoato, metalaxil-M, tebuconazol, azoxistrobina e difenoconazol. O composto dimetoato, apesar de não ter LMR estabelecido para a cultura de cebola pela ANVISA, foi escolhido por ter o uso constantemente relatado nas entrevistas com os agricultores e pela elevada toxicidade.



**Tabela 5 - Classe, grupo químico, LMR e intervalo de segurança para agrotóxicos aplicados em cebola na região de Rio Grande**

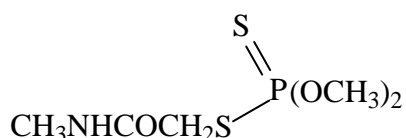
<b>Agrotóxico</b>	<b>Classe</b>	<b>Grupo químico</b>	<b>LMR (mg kg<sup>-1</sup>) CODEX</b>	<b>LMR (mg kg<sup>-1</sup>) ANVISA</b>	<b>Intervalo de segurança (dias)</b>
Azoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	-	0,05	2
Bentazona	Herbicida	Benzotiadiazinona	-	-	-
Captana	Fungicida	Diocarboximida	-	10	7
Deltametrina	Inseticida/ Formicida	Piretróide	-	0,03	2
Dimetoato	Inseticida	Organofosforado	-	-	-
Difenoconazol	Fungicida	Triazol	-	0,1	7
Glifosato	Herbicida	Glicina substituída	-	-	-
Iprodiona	Fungicida	Dicarboximida	0,2	1	14
Linurom	Herbicida	Uréia	-	0,2	60
Mancozebe	Fungicida/ Acaricida	Ditiocarbamato	-	0,2	7
Metalaxil-M	Fungicida	Fenilamida	-	0,5	7
Pendimetalina	Herbicida	Dinitroanilina	-	0,1	1
Propinebe	Fungicida	Ditiocarbamato	0,5	1	7
Tebuconazol	Fungicida	Triazol	-	0,1	14
Trifluralina	Herbicida	Dinitroanilina	-	0,05	1
2,4-D	Herbicida	Ácido fenoxiacético	-	-	-

**Tabela 6 - Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos selecionados para estudo**

Agrotóxico	pK <sub>a</sub>	log K <sub>ow</sub>	Solubilidade em água (g L <sup>-1</sup> )	Pressão de vapor (mPa)
Dimetoato	2,0	0,7	23,3	0,25 (25 °C)
Metalaxil-M	1,4*	1,7	26,0	3,3 (25 °C)
Tebuconazol	-	3,7	0,036	1,7 × 10 <sup>-3</sup> (20 °C)
Azoxistrobina	-0,67*	2,5	0,06	1,1 × 10 <sup>-7</sup> (20 °C)
Difenoconazol	3,0*	1,1	0,015	3,3 × 10 <sup>-5</sup> (25 °C)

Fonte: TOMLIN, 2003; exceto: \*MONTES *et al.*, 2009

#### 3.2.6.1. Dimetoato



Grupo químico: organofosforado

Nome químico (IUPAC): O,O-dimetil S-metilcarbamoilmetil fosforoditioato

Classe: inseticida, acaricida

Fórmula molecular: C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>3</sub>PS<sub>2</sub>

Número no *Chemical Abstracts Service* (CAS): 60-51-5

Massa molar: 229,3 g mol<sup>-1</sup>

Nomes comerciais: Agritoato<sup>®</sup>, Dimetoato CE<sup>®</sup>, Dimexion<sup>®</sup>

O composto dimetoato é um inseticida organofosforado amplamente utilizado contra uma grande variedade de insetos e ácaros. O composto é do tipo sistêmico e altamente tóxico (classe toxicológica II). A modalidade de emprego é aplicação foliar e no solo para as culturas de algodão, citros, maçã, rosa, tomate e trigo (MAPA). Indicado para tratamento contra pragas, vulgarmente conhecidas, como: pulgão do algodoeiro, mosca-das-frutas, ácaro-vermelho, etc.

Os inseticidas organofosforados surgiram em 1945 para substituir os organoclorados. Os organofosforados são compostos químicos instáveis derivados

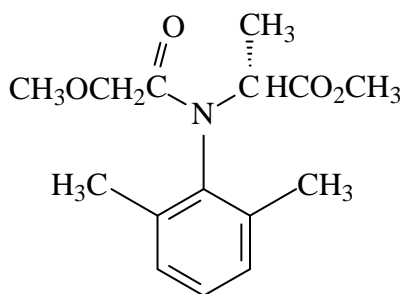
do ácido fosfórico, sendo primeiramente desenvolvidos como armas químicas durante a Segunda Guerra Mundial. Estes agrotóxicos apesar de menos persistentes que os organoclorados, tem alta toxicidade aos mamíferos e são potencialmente tóxicos para pássaros e outros animais (SILVA e FAY, 2004). Atuam sobre o sistema nervoso dos insetos através da inibição da enzima acetilcolinesterase por meio de uma reação denominada fosforilação. Eles podem ser absorvidos pela pele e pelos aparelhos respiratório e gastrointestinal, sendo que a exposição de um indivíduo a compostos dessa classe pode acarretar sintomas como diminuição da visão, dor de cabeça, broncoconstrição, náuseas, fraqueza, convulsões e até mesmo a morte (BARBOSA, 2004).

O agrotóxico dimetoato, assim como outros compostos organofosforados, é um problema particular em países em desenvolvimento devido à toxicidade aguda para seres humanos e animais. Fato decorrente da falta de conhecimento sobre os riscos relacionados à aplicação do produto, sem a proteção adequada com roupas especiais e outros equipamentos de segurança, tem resultado em muitas mortes entre os trabalhadores agrícolas (BAIRD, 2002).

Resíduos de dimetoato têm sido investigados em matrizes como mel, na Bélgica (PIRARD *et al.*, 2007); vegetais, na China (PAN *et al.*, 2008); polpa de coco, no Brasil (SILVA *et al.*, 2008) e goiaba, no Paquistão (KHAN *et al.*, 2009). Nestes estudos resíduos de dimetoato não foram encontrados.

Na Itália, 29 amostras de azeite de oliva em concentrações variando de 0,03-0,12 mg kg<sup>-1</sup> apresentaram contaminação pelo composto. O estudo foi realizado no período de 1999-2000 e, dimetoato e os outros agrotóxicos foram selecionados por serem amplamente empregados para controlar a mosca da oliveira na região. Das amostras estudadas 44% apresentaram contaminação com resíduos de dimetoato, sendo que duas amostras apresentaram níveis superiores ao LMR indicado pelo *Codex Alimentarius* para azeite de oliva (RASTRELLI *et al.*, 2002).

## 3.2.6.2. Metalaxil-M



Grupo químico: acilalaninato

Nome químico (IUPAC): N-(metoxiacetil)-N-(2,6-xilil)-DL-alaninato) de metila

Classe: fungicida

Fórmula molecular:  $C_{15}H_{21}NO_4$

Número no CAS: 70630-17-0

Massa molar:  $279,3 \text{ g mol}^{-1}$

Nomes comerciais: Apron RFC<sup>®</sup>, Maxim XL<sup>®</sup>, Ridomil Gold MZ<sup>®</sup>

Antes do desenvolvimento de fungicidas orgânicos sintéticos, a proteção das plantas contra as doenças fúngicas dependia do uso de compostos de enxofre e cobre. Os fungicidas que contém enxofre orgânico como captam, tiram, manebe e zinebe ainda são utilizados como protetores (SILVA e FAY, 2004).

Atualmente, muitos tipos diferentes de fungicidas são utilizados, com estruturas químicas bastante diversas. A maioria tem baixa toxicidade aos mamíferos, sendo que seu impacto ambiental mais sério é em microorganismos do solo (SILVA e FAY, 2004).

Metalaxil-M é um fungicida sistêmico, de elevada toxicidade (classe toxicológica II) com propriedades protetoras e curativas (TOMLIN, 2003). É registrado para uso no controle de míldio e é absorvido pelas folhas, caules e raízes. O composto inibe a síntese do RNA ribossomal, interferindo na síntese de proteínas (SILVA *et al.*, 2005; ROSE *et al.*, 2009).

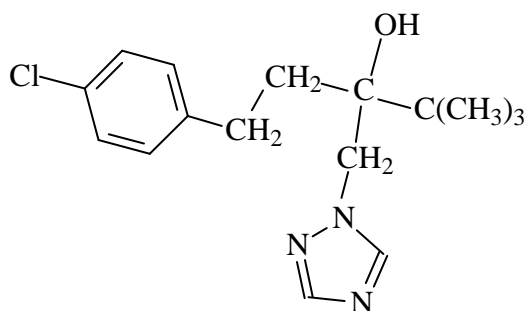
Estudos toxicológicos realizados em animais indicam que Metalaxil-M tem baixa toxicidade aguda, portanto, casos de intoxicação aguda em humanos somente seriam possíveis se fossem ingeridas grande quantidades do produto. O produto

apresenta alta persistência no ambiente e alto potencial de deslocamento no solo, podendo atingir principalmente águas subterrâneas (MAPA, 2009).

A modalidade de emprego é a aplicação foliar nas culturas da batata, cebola, fumo, melancia, melão, milho, pepino, rosa, tomate e uva. Também, é empregado para tratamento de sementes de milho e soja. O composto Metalaxil-M é reportado em diferentes produtos formulados, combinado com outros fungicidas. As principais indicações são para o controle de pragas como: podridão da semente e mancha-púrpura-da-semente (ANVISA, 2009).

Resíduos do composto foram encontrados em todas as amostras analisadas de diferentes qualidades de vinhos, no noroeste da Espanha, em concentrações na faixa de 0,8 a 32  $\mu\text{g L}^{-1}$  (MONTES *et al.*, 2009).

#### 3.2.6.3. Tebuconazol



Grupo químico: triazol

Nome químico (IUPAC): (RS)-1-p-clorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-3-pentanol

Classe: fungicida

Fórmula molecular:  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}$

Número no CAS: 107534-96-3

Massa molar: 307,8  $\text{g mol}^{-1}$

Nomes comerciais: Folicur PM<sup>®</sup>, Alterne<sup>®</sup>, Elite<sup>®</sup>

Os compostos do grupo azol, classificados em triazóis ou imidazóis, são vastamente utilizados na agricultura como fungicidas. A atividade antifúngica é baseada na inibição da biossíntese de esteróis. Os azóis, também são

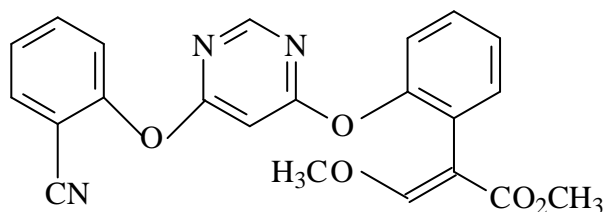
considerados como um novo grupo de agentes ativos endócrinos que perturbam a biossíntese de esteróides em humanos (TRÖSKEN *et al.*, 2005).

O composto tebuconazol, pertencente ao grupo dos triazóis, é um fungicida sistêmico, pouco tóxico (classe toxicológica IV), com ação protetora, curativa e erradicante. É rapidamente absorvido pela planta, sendo empregado principalmente para combater doenças como a ferrugem-do-álamo, a mancha-foliar e a antacnose (TOMLIN, 2003; TICHA *et al.*, 2008).

O fungicida é indicado para aplicação foliar nas culturas de abacaxi, abóbora, álamo, alho, amendoim, arroz, aveia, banana, batata, beterraba, cacau, café, cebola, cenoura, cevada, citros, cravo, crisântemo, feijão, figo, gladiolo, goiaba, maçã, mamão, manga, maracujá, melancia, melão, milho, morango, pepino, pêsego, rosa, soja, sorgo, tomate, trigo e uva (ANVISA, 2009; MAPA, 2009).

Resíduos de fungicidas pertencentes ao grupo azol têm sido encontrados em diversas matrizes, como frutas e vegetais, sendo que em muitos casos o nível de concentração excede os LMR (BLASCO *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2007). Resíduos de tebuconazol foram encontrados, em baixos níveis de concentração, em amostras de maçã colhidas após 114 dias da aplicação do produto (TICHA *et al.*, 2008). Também, resíduos do composto são observados em matrizes como pêra ( $12,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ ); cereais e alimentos secos para animais ( $0,01\text{-}0,143 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (GARCIA-REYES *et al.*, 2007; WALORCZYK, 2008).

#### 3.2.6.4. Azoxistrobina



Grupo químico: estrobilurina

Nome químico (IUPAC): (E)-2-{2[6-(cianofenoxi)pirimidina-4-iloxi]fenil}-3-metoxiacrilato de metilo

Classe: fungicida

Fórmula molecular:  $C_{22}H_{17}N_3O_5$

Número no *Chemical Abstracts Service* (CAS): 131860-33-8

Massa molar: 403,4 g mol<sup>-1</sup>

Nomes comerciais: Amistar WG<sup>®</sup>, Vantigo<sup>®</sup>

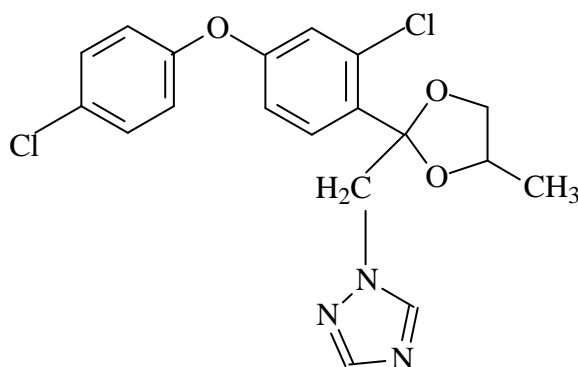
Os fungicidas pertencentes ao grupo químico estrobilurina são um exemplo bem sucedido do uso de produtos naturais como modelo para desenvolvimento de novos agrotóxicos. Em 1978 foi descoberta essa nova classe de compostos, que atuam inibindo a respiração mitocondrial dos fungos e apresentam baixa toxicidade aguda para mamíferos em geral (BARBOSA, 2004).

No início da década de 1980 estes compostos despertaram grande interesse por parte das indústrias produtoras de agrotóxicos, devido a um extenso número de relatos do desenvolvimento de resistência de fungos a fungicidas que haviam sido introduzidos recentemente no mercado, como carboxidiimidas e triazóis (BARBOSA, 2004). Entre os compostos pertencente à classe estrobilurinas está a azoxistrobina. Este fungicida é ativo contra um grande número de espécies de fungos fitopatogênicos de importância comercial. O fungicida é sistêmico, mediamente tóxico (classe toxicológica III) e possui ação protetora, curativa e erradicante (BOUDINA *et al.*, 2007).

É indicado para aplicação foliar nas culturas de alface, algodão, alho, amendoim, arroz, aveia, banana, batata, beterraba, café, cebola, cenoura, cevada, citros, couve-flor, crisântemo, feijão, figo, melancia, melão, milho, morango, pepino, pêssego, pimentão, soja, tomate, trigo e uva. Para tratamento de doenças como míldio e mancha-púrpura (MAPA, 2009).

Resíduos de azoxistrobina têm sido reportados como persistentes em amostras de vinho de diferentes qualidades, em concentrações na faixa de 0,8 a 32 µg L<sup>-1</sup> (MONTES *et al.*, 2009). Também, resíduos de azoxistrobina foram detectados em amostras de sedimento em concentrações na faixa de 1 a 62 µg kg<sup>-1</sup> (SMALLING e KUIVILA, 2008).

## 3.2.6.5. Difenoconazol



Grupo químico: triazol

Nome químico (IUPAC): Éter 3-cloro-4-[(2RS,4RS;2RS,4SR)-4-metil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-2-il]fenil-4-clorofenílico

Classe: fungicida

Fórmula molecular:  $C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$

Número no CAS: 131860-33-8

Massa molar:  $406,3 \text{ g mol}^{-1}$

Nomes comerciais: Score<sup>®</sup>, Flare<sup>®</sup>

O fungicida difenoconazol pertencente ao grupo químico triazol é altamente tóxico (classe toxicológica I). É um composto sistêmico com ação protetora e curativa (TOMLIN, 2003).

O composto é indicado para aplicação foliar nas culturas de abacate, abobrinha, álamo, alface, alho, amendoim, arroz, banana, batata, berinjela, beterraba, café, cebola, cenoura, citros, coco, couve-flor, ervilha, feijão, maçã, mamão, manga, maracujá, melancia, melão, morango, pepino, pimentão, rosa, soja, tomate, uva e café. Ainda, para aplicação em sementes de algodão, amendoim, cevada, feijão, soja e trigo. Para tratamento de doenças como o oídio, a pinta-preta e a ferrugem (ANVISA, 2009; MAPA, 2009). Resíduos de difenoconazol têm sido investigados em diferentes matrizes, principalmente frutas e vegetais, sendo detectados em concentrações na faixa de  $0,82\text{-}1,2 \text{ mg kg}^{-1}$  (FERRACINE *et al.*, 2001; WALORCZYK, 2008; SILVA *et al.*, 2008; TICHA *et al.*, 2008; MONTES *et al.*, 2009).



### 3.3 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC ou CLAE) é uma das principais técnicas utilizadas na análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis. Apesar de ser uma excelente técnica de separação, a HPLC necessita de uma técnica confirmatória quando a análise qualitativa (confirmação de identidade química) é também necessária (LANÇAS, 2009).

Dentre as várias opções existentes neste momento, a Espectrometria de Massas é a técnica que melhor fornece as informações necessárias. O acoplamento entre as duas técnicas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (CHIARADIA *et al.*, 2008).

A espectrometria de massas é uma técnica usada para o estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas. É uma ferramenta que tem sido utilizada há muito tempo para a medida de isótopos e para determinar estrutura de moléculas orgânicas. Atualmente, é a melhor técnica 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).

*“a Espectrometria de Massas é a arte de medir átomos e moléculas para determinar suas massas moleculares. Tal informação sobre a massa ou peso é muitas vezes suficiente, frequentemente necessária, e sempre útil na determinação da identidade de uma espécie...”*

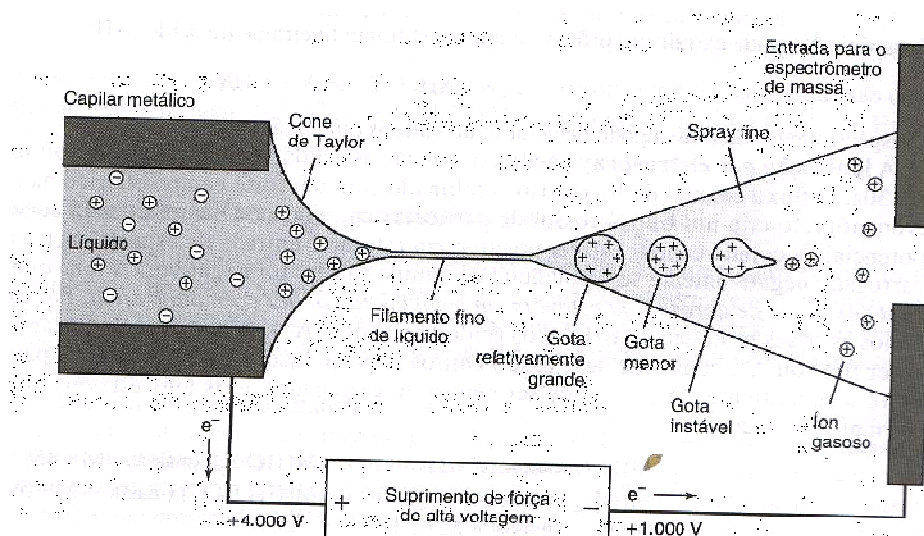
(J.B. FENN, ganhador do Prêmio Nobel de Química em 2002).

No entanto, o acoplamento entre as duas técnicas foi um processo demorado. O principal problema relacionado à dificuldade de acoplamento entre as técnicas foi à incompatibilidade entre as vazões relativamente grandes empregadas em HPLC que impossibilita a transferência direta do eluente da coluna cromatográfica para o interior da fonte do espectrômetro, que opera em condições de alto vácuo (HARRIS, 2003; FERNADEZ-ALBA, 2005).

Para resolver esta questão foram desenvolvidos dispositivos, fontes de ionização, de remoção de solvente e para interfaceamento entre a coluna cromatográfica e o espectrômetro de massas. As fontes de ionização facilitam a transferência da amostra que elui da coluna cromatográfica para a fase gasosa (interface coluna-MS) e a ionização da amostra (CHIARADIA *et al.*, 2008; LANÇAS, 2009).

Dentre as fontes de ionização desenvolvidas, as mais empregadas são as que produzem ionização em pressão atmosférica (API, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*). Estas fontes são a Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e a Ionização por Electrospray (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*) (COLLINS *et al.*, 2006).

Na ESI, também conhecida como nebulização de íons (do inglês, *ion spray*) (Figura 4) a amostra em solução proveniente da coluna cromatográfica entra na fonte de íons através de um tubo capilar de metal envolvido por um fluxo de gás nebulizador (geralmente nitrogênio). É aplicada uma diferença de potencial de alguns milhares de Volts entre a ponta do tubo de metal e o cone de amostragem, criando um “spray” formado por gotículas do analito na fase móvel, e o gás nebulizador. O solvente é evaporado, fazendo com que a gotícula diminua sucessivamente de tamanho, até que os íons do analito evaporem e sejam direcionados para o cone de amostragem indo, então, para o analisador de íons (CHIARADIA *et al.*, 2008; HARRIS, 2008; LANÇAS, 2009).

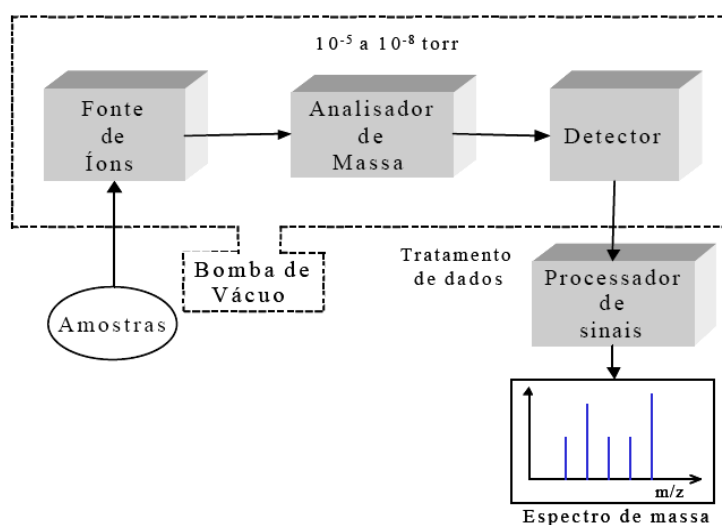


**Figura 4 - Diagrama da ESI, da formação dos íons na solução antes de serem introduzidos no MS. Fonte: HARRIS, 2001**

A ESI possibilita a ionização de compostos sensíveis à temperatura sem que estes sofram degradação, uma vez que, a ionização ocorre diretamente em solução (ARDREY, 2003; CHIARADIA *et al.*, 2008). O emprego de LC-MS utilizando ESI como fonte de ionização é ideal para análise de moléculas mais polares, de maior massa molecular. Ainda, LC-ESI-MS é muito aplicada para determinações de proteínas, aminoácidos, e várias substâncias de interesse na área da bioanalítica, alimentos e farmacêutica (LANÇAS, 2009)

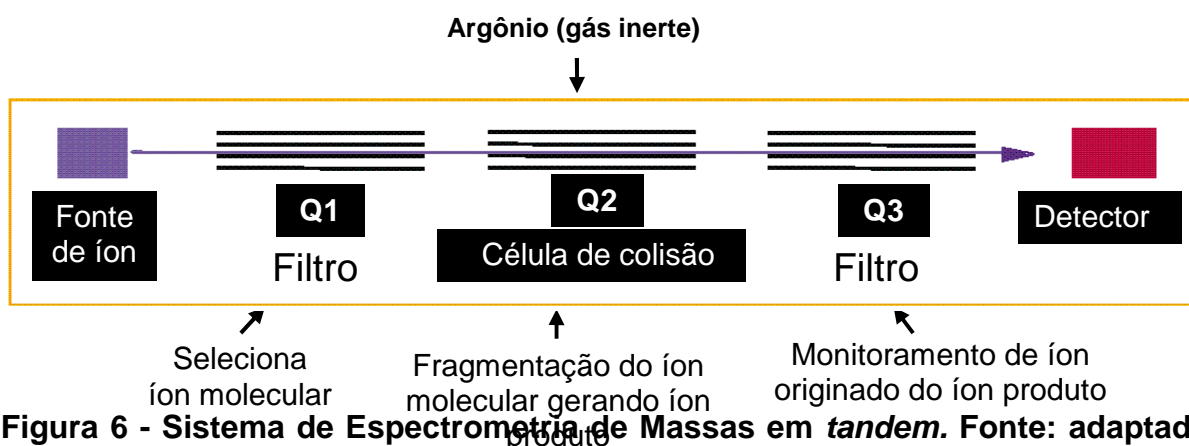
Na APCI, o eluente da coluna cromatográfica passa através de um nebulizador pneumático no qual gotas são geradas e dessolvatadas. O *spray* formado passa por uma região aquecida na qual o vapor é seco, formando espécies neutras que passam através de uma corona de descarga. Um campo suficiente para gerar ionização é aplicado na corona. Como o solvente (proveniente da FM) encontra-se em maior concentração no *spray* que o analito, este é ionizado preferencialmente e passam a ocorrer reações entre estes íons em fase gasosa e as moléculas neutras do analito, o que dá origem aos íons do analito (ARDREY, 2003; CHIARADIA *et al.*, 2008; HARRIS, 2008).

O diagrama de blocos de um sistema típico de LC-MS é apresentado na Figura 5. Esta combinação é altamente seletiva, uma vez que, picos mal resolvidos podem ser isolados monitorando-se somente um valor de massa selecionado. Algumas vantagens da técnica são o fornecimento da massa molar, informação estrutural e análise quantitativa exata do analito (SKOOG *et al.*, 2008).



**Figura 5 - Diagrama de blocos de um sistema LC-MS. Fonte: SKOOG, 2008**

Entretanto, para algumas misturas complexas é necessário o acoplamento de dois ou mais analisadores de massas em conjunto (*tandem*), como observado na Figura 6. Neste caso, o primeiro quadrupolo age como um filtro de massas selecionando o íon de interesse. Este íon é fragmentado por colisão com um gás inerte na célula de colisão e, o terceiro quadrupolo analisa os fragmentos produzidos (SKOOG *et al.*, 2008).



**Figura 6 - Sistema de Espectrometria de Massas em *tandem*. Fonte: adaptado de SKOOG, 2008**

### 3.3.1 Monitoramento de Reações Múltiplas

No modo de operação de monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reactions Monitoring*) o espectrômetro é programado de forma que dois ou mais íons são separados e fragmentados novamente (MS/MS). É extremamente útil quando a separação cromatográfica não é completa (VÉKEY, 2001). Através deste modo, é possível analisar multianalitos dentro de uma mesma análise, uma vez que, permite a identificação e separação de cada transição monitorada (DEMOLINER, 2008).

O MRM aumenta a seletividade da espectrometria de massas para determinados analitos e melhora a sensibilidade, diminuindo a resposta dos interferentes a tudo o que interfira na medida, reduzindo o ruído de fundo (HARRIS, 2003).

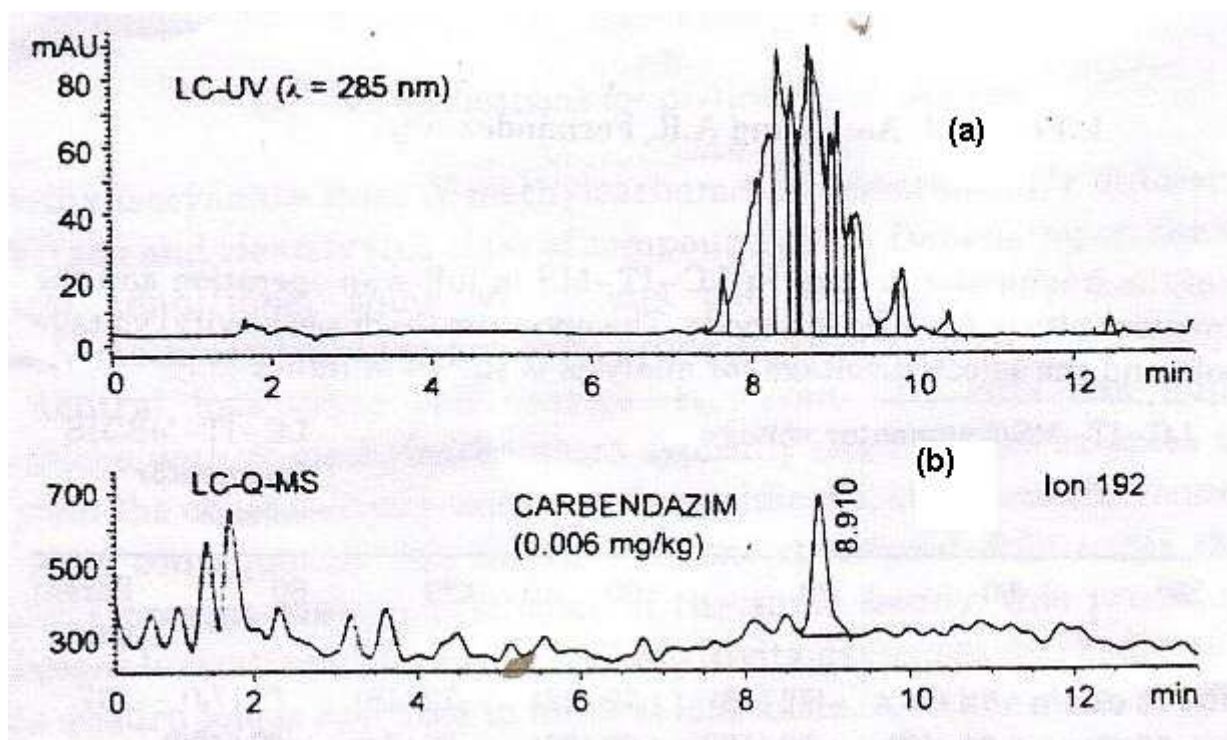
### 3.3.2 Detector

No caso de um equipamento que possa efetuar uma varredura de massas, o sinal produzido no detector durante uma varredura em função da razão  $m/z$  ou posição do íon na varredura, irá gerar um espectro de massas. Assim, o espectro de massas é um registro dos íons detectados em função da razão  $m/z$ .

## 3.4 Efeito Matriz em LC-ESI-MS/MS

LC-ESI-MS/MS é uma técnica poderosa de determinação, combina a separação dos analitos por LC e a alta seletividade e sensibilidade da detecção por MS, em *tandem*, empregando *electrospray* como fonte de ionização.

A seletividade da técnica é superior a outras técnicas cromatográficas como pode ser observado na Figura 7, que demonstra a diferença entre a interferência do sinal proveniente da matriz em LC-UV e LC-MS, para análise de amostras de morango contendo carbendazim (FERNANDEZ-ALBA, 2005).



**Figura 7 - Comparação entre os cromatogramas obtidos, (a) por LC-UV e (b) por LC-MS para análise de morangos contendo carbendazim. Fonte: FERNANDEZ-ALBA, 2005**

Através do modo de monitoramento de múltiplas reações (MRM) é possível obter o registro do sinal de interesse sem a observação do sinal de outros compostos. No entanto, isto não significa que a técnica não esteja sujeita as interferências provenientes da matriz.

Embora interferências não sejam visíveis nos cromatogramas gerados, a coeluição de componentes da matriz com o composto de interesse pode alterar a eficiência da ionização dos analitos, suprimindo ou enriquecendo o sinal dos mesmos. Esta alteração na eficiência da ionização é um fenômeno conhecido como EM (ZROSTLIKOVÁ *et al.*, 2003; SANNINO *et al.*, 2004) e foi descrito primeiramente por TANG e KEBARLE em 1993. Os autores observaram a diminuição da resposta de uma base orgânica em uma determinada matriz, empregando ESI como fonte de ionização, com o aumento da concentração de outras bases orgânicas.

O EM é dependente das propriedades do analito e da matriz, sendo expresso como uma razão entre a resposta do padrão do analito preparado no extrato branco da matriz em função da resposta do padrão do analito preparado em solvente puro (WANG *et al.*, 2007).

O exato mecanismo pelo qual ocorre o efeito matriz é desconhecido, mas, provavelmente, é originado da competição entre um analito e a coeluição de um componente da matriz não monitorado (CASSIANO *et al.*, 2009). Componentes da matriz podem interferir na ionização dos compostos quando presentes na amostra em concentração superior a  $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  (KEBARLE e TANG, 1993).

KING *et al.* (2000), têm mostrado através de diferentes estudos que os efeitos de matriz são resultados da competição entre componentes não voláteis da matriz e íons do analito para acessar a superfície da gota na transferência para a fase gasosa. Diversos experimentos para avaliar a importância relativa dos processos em fase gasosa e em solução na supressão da ionização empregando ESI e APCI foram realizados nesse estudo. Os analitos foram fármacos e a matriz plasma. Foram empregadas três técnicas de preparo de amostra: Extração Líquido-Líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*); precipitação de proteínas e Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*). A avaliação da supressão da ionização foi realizada com infusão pós-coluna.

KING *et al.* (2000) observaram que para o composto urapidil e amostra de plasma preparada por precipitação de proteínas com acetonitrila a supressão foi muito mais acentuada com ESI do que com APCI. Justificam que espécies em fase gasosa capazes de reagir com íons do analito em fase gasosa devem estar presentes em ESI e APCI em níveis semelhantes e, que assim, processos em fase gasosa não são dominantes para supressão da ionização por ESI para essas amostras.

Um teste realizado para verificar a influência de compostos que não são transferidos da solução para a fase gasosa foi realizado através da infusão do analito preparado no extrato do plasma e na fase móvel. Os resíduos foram coletados em papel alumínio anexado a placa da interface, redissolvidos na fase móvel e analisados em uma coluna analítica com um gradiente capaz de separar os compostos interferentes do extrato do analito. Os resultados mostraram que para a infusão do analito preparado no extrato do plasma a quantidade de substâncias restantes em solução foi maior do que para a infusão do analito preparado na fase móvel.

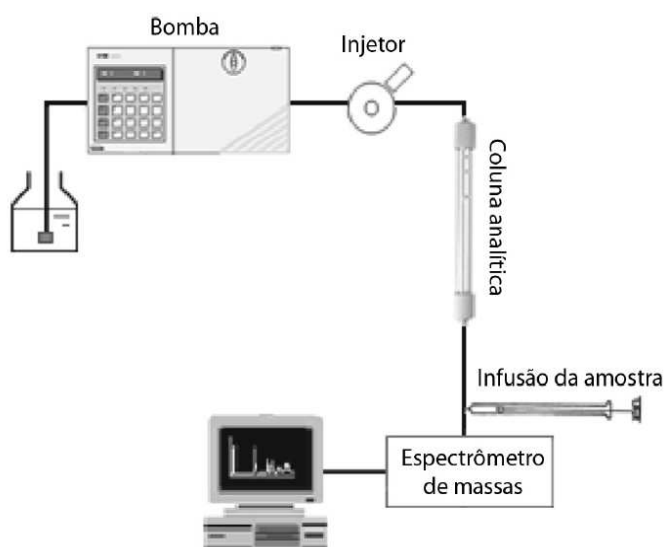
Ainda, realizaram um teste em que foram adicionados a fase móvel acetato de amônio e sulfato de amônio considerados como modelo de soluto volátil e modelo de soluto não volátil, respectivamente. Os resultados suportaram a hipótese de que

compostos não voláteis aumentam a supressão da ionização em ESI. Com relação às três técnicas de preparo de amostra empregadas os autores verificaram que a precipitação de proteínas apresentou maior quantidade de materiais não voláteis e maior supressão da ionização com relação à LLE e SPE.

É possível verificar o efeito matriz em LC-MS/MS empregando o método de fortificação pós-extração, proposto por MATUSZEWSKI *et al.* em 2003, e o método de infusão pós-coluna definido por BONFIGLIO *et al.* em 1999. O método de fortificação pós-extração avalia quantitativamente o EM, através da comparação da resposta do analito adicionado ao extrato branco da matriz e a resposta do padrão preparado em um determinado solvente ou na fase móvel. Esta forma de avaliar a intensidade do efeito matriz é amplamente empregada quando se trabalha com a determinação de compostos em baixas concentrações em matrizes complexas. Entretanto, é preciso reconhecer que a fortificação pós-extração fornece a informação do EM com relação à eluição dos analitos e sua influência na eficiência da ionização dos mesmos.

A infusão pós-coluna fornece uma análise qualitativa para avaliação dos efeitos de matriz, identificando as regiões cromatográficas mais susceptíveis de sofrer o EM (EECKHAUT *et al.*, 2009). Segundo CASSIANO *et al.* (2009), *neste modo, uma bomba de infusão é usada para produzir uma vazão constante do analito. A infusão é feita no eluente após a coluna cromatográfica e antes da fonte de ionização do espectrômetro de massas. A matriz extraída (sem adição do analito) é cromatografada, na condição cromatográfica desenvolvida, e a resposta do analito infuso é registrada.* A Figura 8 ilustra um sistema de infusão pós-coluna.





**Figura 8 - Sistema de infusão pós-coluna. Fonte CASSIANO *et al.*, 2009**

TAYLOR (2005) descreveu que a infusão pós-coluna permite avaliar: a influência de diferentes técnicas de preparo de amostras no EM; a adequação da coluna analítica, uma vez que, a avaliação do EM é realizada após passar por toda a coluna cromatográfica; os aspectos mecânicos dos efeitos de matriz e, a influência de aditivos móveis na resposta do analito. Entretanto, segundo EECKHAUT *et al.* (2009) as desvantagens deste método são a falta de um conhecimento quantitativo do efeito EM para um analito específico; a necessidade de infusão individual de cada composto quando muitos compostos são determinados e a dificuldade em investigar o EM em amostras pouco concentradas, uma vez que, a infusão ocorre em concentrações mais elevadas.

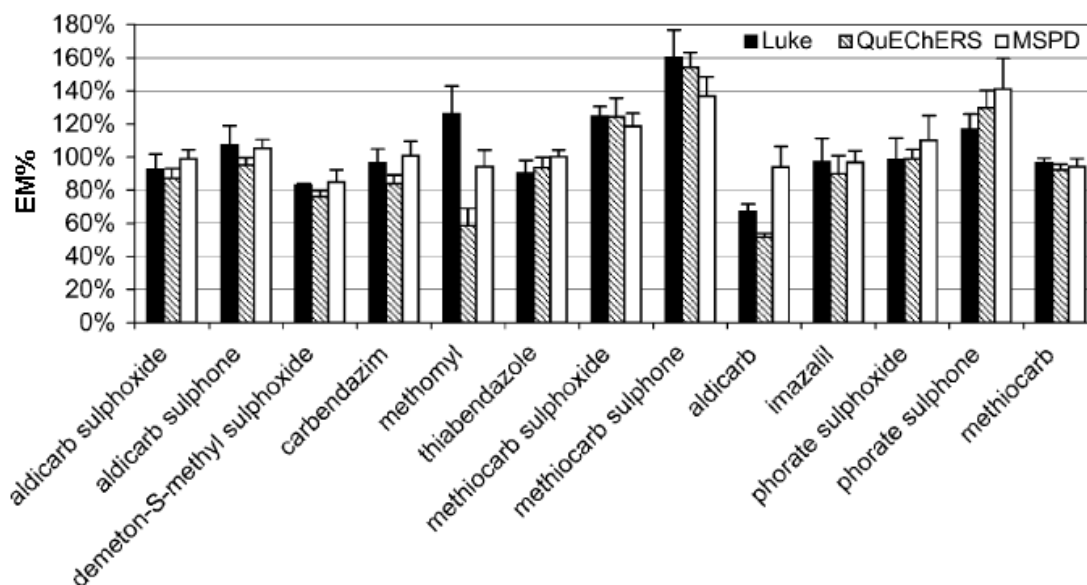
Na literatura são encontradas diferentes formas para quantificar o EM sobre um determinado composto e diversas abordagens foram desenvolvidas para eliminar ou reduzir os efeitos de matriz em LC-MS. Modificações na etapa de extração e emprego de uma separação cromatográfica adequada são alternativas para minimizar esse efeito (STÜBER e REEMTSMA, 2004; GÓMEZ *et al.*, 2006; KRUIVE *et al.*, 2008). Anteriormente, foi discutido que a precipitação de proteínas com solvente orgânico proporcionou maior EM quando comparada com extração líquido-líquido e a extração em fase-sólida, para a determinação de urapidil em plasma KING *et al.* (2000) .

ECONOMOU *et al.* (2009) avaliaram o EM em multi-classe de agrotóxicos empregando SPE e LC-MS/MS para extratos de vinho diluídos em diferentes

proporções. Os resultados demonstraram que o aumento da diluição do extrato de vinho diminui os efeitos de matriz. Outra possibilidade é a aplicação de padrão interno para compensar a alteração de sinal, mas a seleção de um padrão interno adequado nem sempre é uma tarefa fácil, uma vez que, pode ser necessário empregar mais de um padrão interno quando muitos compostos são determinados em um único método (GÓMEZ *et al.*, 2006).

Embora durante o desenvolvimento e validação de uma metodologia sejam considerados fatores como: empregar adequada etapa de preparo de amostra e adequadas condições cromatográficas, os EM ainda podem ser persistentes. Assim, superposição da matriz é uma forma de calibração externa e uma ótima alternativa para compensar o EM e fornecer resultados adequados de exatidão quando se trabalha com a determinação de compostos traços em matrizes complexas. No entanto, é necessário que a matriz empregada seja livre dos analitos estudados e deve ser considerado que a matriz seja similar a que está sendo analisada.

KRUVÉ *et al.*, 2008 investigaram o EM para multirresíduos de agrotóxicos determinados por LC-ESI-MS em frutas e vegetais. Os autores empregaram três procedimentos de extração: método de Luke, QuEChERS e MSPD e concluíram que a extração por MSPD proporcionou mínimo EM para a maioria dos compostos, embora as recuperações de alguns agrotóxicos tenham sido insatisfatórias. A Figura 9 compara a influência do EM quando empregados diferentes preparos de amostra para extração de agrotóxicos em maçã. Para avaliação do EM empregaram o método de adição pós-fortificação. A quantificação foi realizada pela comparação da área do padrão preparado no extrato branco da matriz e a área do padrão preparado em solvente puro, alcançando resultados percentuais que ao serem iguais a 100% não indicam alteração na eficiência da ionização; maiores que 100% indicam enriquecimento da ionização e menores que 100% supressão da ionização.



**Figura 9 - Comparação da resposta do EM empregando três diferentes preparos de amostra. Fonte KRUIVE *et al.*, 2008**

Com esta discussão é possível perceber que os efeitos provenientes da matriz podem comprometer a exatidão e a precisão dos resultados analíticos, devendo ser avaliados durante o desenvolvimento e validação do método. A Tabela 7 apresenta algumas publicações sobre EM. A revisão bibliográfica foi realizada em novembro de 2009, no *Science direct*, com as palavras chaves: *matrix Effect*, *pesticides and ESI*.

**Tabela 7 – Publicações sobre EM, empregando ESI como fonte de ionização**

<b>Autor / Ano</b>	<b>Analitos</b>	<b>Matriz</b>	<b>Fonte</b>
Kruve <i>et al.</i> , 2009	Pesticidas	Frutas e vegetais	Analytica Chimica Acta
Zrostlíková <i>et al.</i> , 2002	Pesticidas	Maçã	Journal of Chromatography A
Venkateswarlu <i>et al.</i> , 2007	Multi-classe de pesticidas	Uva	Food Chemistry
Hajslová <i>et al.</i> , 2003	Pesticidas	Alimentos e matrizes biológicas	Journal of Chromatography A
García-Valcárcel e Tadeo, 2009	Pesticidas organofosforados	Lama	Analytica Chimica Acta
Radisic <i>et al.</i> , 2009	Pesticidas	Sucos de fruta	Food Chemistry
Economou <i>et al.</i> , 2009	Multi-classe de pesticidas	Vinho	Journal of Chromatography A
Ortelli <i>et al.</i> , 2004	Pesticidas	Frutas e vegetais	Analytica Chimica Acta
Bogialli <i>et al.</i> , 2006	Herbicidas e fungicidas	Leite	Journal of Chromatography A
Kmellár <i>et al.</i> , 2009	Multi-classe de pesticidas	Vegetais	Journal of Chromatography A
Muccio <i>et al.</i> , 2006	Pesticidas nicotinóides	Frutas e vegetais	Journal of Chromatography A

### 3.5 Preparo de amostra para extração de agrotóxicos em alimentos

A determinação de contaminantes traços em matrizes complexas requer um preparo da amostra adequado antes da análise instrumental. A escolha do preparo de amostra mais adequado depende das propriedades da matriz e do analito. Os passos típicos na etapa de preparo de amostra incluem amostragem, homogeneização, extração, *clean-up* e concentração antes da determinação.

A etapa de amostragem deve ser representativa, ou seja, qualquer parcela ou alíquota colhida para determinação deve representar a maior parte da amostra original. Para determinação de compostos traços em matrizes complexas pouca quantidade de amostra pode ser empregada, mas isso influencia o alcance de

baixos níveis de detecção dos compostos e por isso este parâmetro deve ser bem avaliado. No entanto, utilizar pequena massa de amostra pode reduzir e até mesmo excluir a necessidade da etapa de *clean-up* (RIDGWAY *et al.*, 2007).

A otimização das etapas envolvidas no preparo da amostra é essencial para reduzir o tempo e as possíveis fontes de erro relacionadas com o procedimento. Os limites permitidos pelas legislações da área estão sob constante avaliação, exigindo o desenvolvimento e validação de métodos que atinjam as exigências dos órgãos competentes e que sejam cada vez mais sensíveis e confiáveis.

As técnicas tradicionais de preparo de amostras possuem etapas tediosas, que consomem tempo e um grande volume de solventes. Dentre as técnicas mais utilizadas para extração de agrotóxicos em alimentos, podem ser citadas a ASE (do inglês, *accelerated solvent extraction*) (CHUANG *et al.*, 2001), LLE (TAHBOUB *et al.*, 2006), USE (do inglês, *ultrasonic extraction*) (REZIC *et al.*, 2005) e SFE (do inglês, *supercritical fluid extraction*) (LEHOTAY, 1997; RISSATO *et al.*, 2004);

Entre os problemas que envolvem as análises de agrotóxicos em amostras como, por exemplo, frutas e vegetais citam-se a complexidade dos procedimentos necessários para extração e *clean-up* das amostras. A técnica de LLE é trabalhosa e muitas vezes emprega grande volume de solventes orgânicos tóxicos. Por outro lado, SPE apresenta uma redução no tempo de extração, quando comparada a LLE, porém requer etapas de condicionamento e eluição dos cartuchos, que requerem a utilização de solventes orgânicos (PRESTES, 2007).

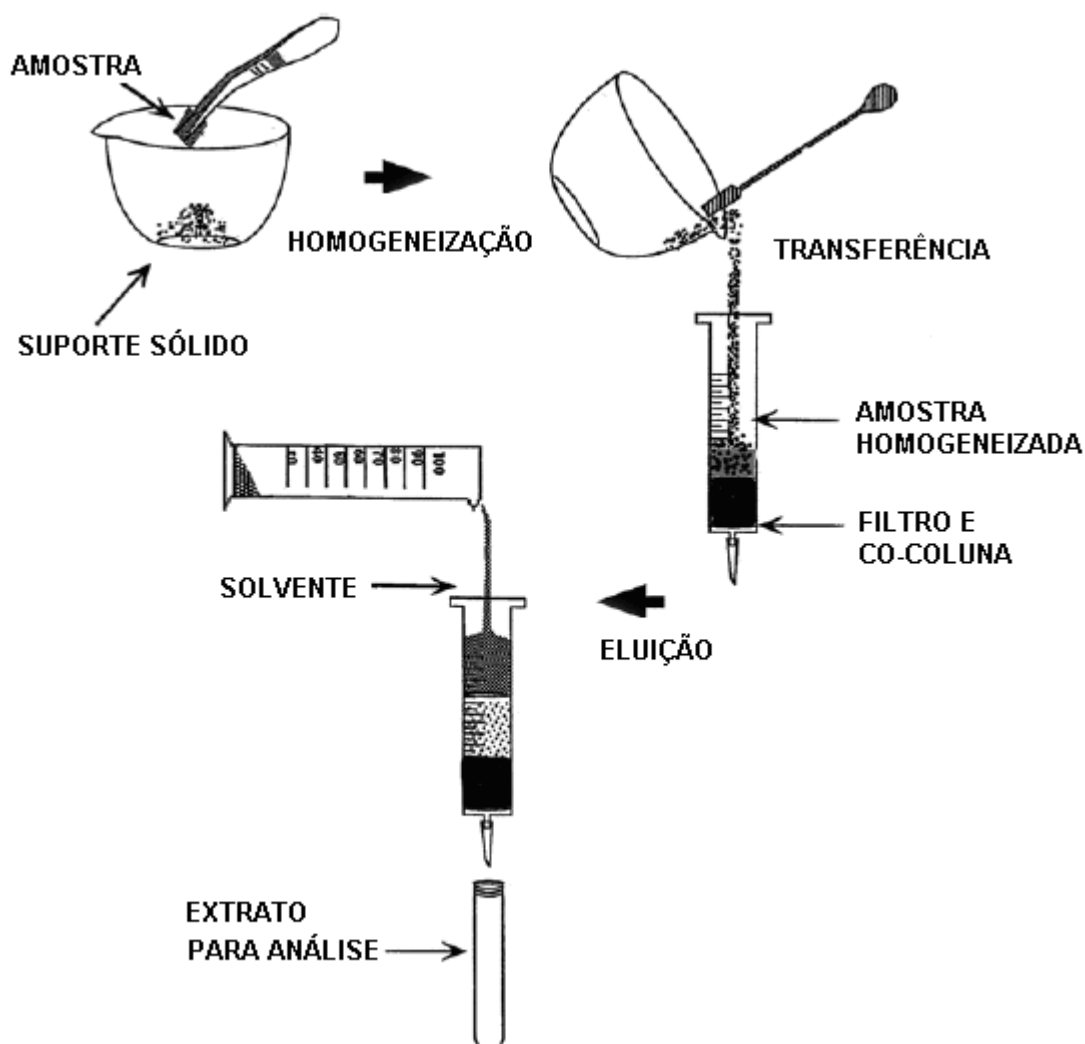
Assim, foram desenvolvidas nos últimos anos técnicas de preparo de amostra baseadas na minimização do uso de solventes orgânicos para a extração dos compostos. Entre os procedimentos mais recentemente apresentados para o preparo de amostra e que têm sido largamente empregados para determinação de agrotóxicos em matrizes complexas estão a MSPD e o método QuEChERS.

### 3.5.1 MSPD

A *matrix solid-phase dispersion* ou dispersão da matriz em fase sólida foi introduzida por BARKER em 1989. MSPD possui características únicas como técnica de preparo de amostra, aplica condições de extração (temperatura e pressão atmosférica ambiente) em combinação com adequado material dispersante e solvente de eluição. Estas características normalmente provêm recuperações aceitáveis para uma larga faixa de analitos, com vantagens de baixo custo por extração e moderado consumo de solventes orgânicos (GARCIA-LÓPEZ e RODRIGUÉZ, 2008).

A técnica foi desenvolvida como alternativa para a SPE, uma vez que, a aplicação desta para extração de agrotóxicos em matrizes sólidas e semi-sólidas requer o emprego de etapa preliminar de homogeneização da amostra para o estado líquido. MSPD envolve a mistura de uma amostra (viscosa, sólida ou semi-sólida) com um suporte sólido que pode ou não ter sua superfície modificada (BARKER, 2000; LANÇAS, 2004).

Na prática, esse processo consiste em: (1) macerar amostra e adsorvente até obter uma mistura homogênea, esse sistema conterá a amostra distribuída uniformemente sobre o adsorvente; (2) transferir a nova fase formada para um cartucho, que contém um filtro (“frita”), sobre a qual é colocado então outro filtro; (3) proceder a eluição com auxílio de uma pequena pressão; (4) coletar o extrato obtido e, (5) analisar diretamente ou aplicar etapa de *clean-up* (LANÇAS, 2004; KRISTENSO *et al*, 2006). Um esquema típico do procedimento para MSPD é apresentado na Figura 10.



**Figura 10 - Passos típicos da extração por MSPD. Adaptado de BARKER, 2007**

Materiais abrasivos como areia são utilizados em MSPD com o objetivo de quebrar a estrutura da amostra em pequenos pedaços com o auxílio da força aplicada durante o processo de homogeneização com o grau e pistilo. Entretanto, a presença de uma fase quimicamente ligada provém ao processo uma dimensão maior. Isto ocorre porque os componentes da amostra são dissolvidos e dispersos na fase orgânica ligada à superfície da partícula (BARKER, 2000).

Diversos parâmetros afetam a eficiência da extração por MSPD, entre eles podem ser citados a natureza do suporte sólido e do solvente de eluição; a natureza da amostra; a proporção amostra:adsorvente e a presença ou não de etapa de *clean-up* (BARKER, 2007; PENA *et al.*, 2008; PINHO *et al.*, 2009).

O suporte sólido ou dispersante pode atuar como abrasivo, promovendo o rompimento da estrutura física da amostra e como adsorvente de compostos da

matriz. A seleção do suporte sólido depende das características do analito e da matriz. Para aplicações que requerem uma fase lipofílica quimicamente ligada “bonded phase”, geralmente o suporte-adsorvente faz uso de materiais como C18 e C8. O isolamento de analitos mais polares é realizado com suportes sólidos polares e o de analitos menos polares com suportes menos polares (DÓREA e LÓPEZ, 2004).

O diâmetro da partícula do suporte sólido é um fator relevante na eficiência da extração por MSPD. Partículas muito pequenas entre 3 e 10 µm requer um maior volume de solvente e a necessidade de excessiva pressão para obter uma vazão adequada durante a eluição dos compostos. Assim, é recomendado empregar suportes sólidos com diâmetros de partícula entre 40 e 100 µm (BARKER, 2007).

A proporção mais adequada de amostra:suporte sólido é uma variável determinante na eficiência da extração por MSPD. Este parâmetro é dependente da aplicação para qual o método está sendo desenvolvido, sendo as proporções mais empregadas em diferentes aplicações da MSPD de 1:1 a 1:4 de amostra:suporte sólido (KRUIVE *et al.*, 2008; MENEZES *et al.*, 2006).

Para eluição da coluna de MSPD pode ser utilizado um único solvente ou solventes de diferentes polaridades. A finalidade da eluição em sequência com solventes de diferentes polaridades pode ser a retirada de interferentes da coluna e/ou o isolamento de analitos de polaridades e classes diferentes (SOLER, 2005; ABHILASH, 2009).

Dependendo da complexidade da matriz o eluente de MSPD após coletado não pode ser injetado diretamente no sistema cromatográfico. Assim, torna-se necessário aplicar uma etapa adicional para *clean-up* dos extratos. Nestes casos, geralmente é preparada um co-coluna com um segundo adsorvente e/ou outros componentes (por exemplo, sais). Resultados adequados de recuperação para uma grande variedade de compostos são observados em diferentes aplicações de MSPD com e sem etapa de *clean-up* (ABHILASH, 2007; BOGIALLI, 2007).

Desde a sua introdução, MSPD tem sido citada como método de extração em mais de 250 publicações. Os analitos normalmente determinados são drogas, agrotóxicos, constituintes de ocorrência natural entre outros compostos em uma ampla variedade de matrizes (BARKER, 2007).

FERNÁNDEZ *et al.* (2000) determinaram resíduos de carbamatos em frutas e vegetais utilizando MSPD e LC-MS empregando ESI e APCI como fonte de



ionização. A eficiência de diferentes adsorventes foram comparados e a média das recuperações utilizando C8 ficaram na faixa de 64-106% com RSD entre 5-15%. Constituintes da matriz não interferiram no processo de ionização dos carbamatos. Os limites de detecção foram na faixa de 0,001-0,01 mg kg<sup>-1</sup>. O método foi aplicado para determinação de resíduos de carbamatos em cebola, tomate, laranja e uva coletados no mercado de Valencia (Espanha) e resíduos foram encontrados em baixos níveis de concentração.

BLASCO *et al.* (2002) determinaram resíduos de fungicidas em frutas e vegetais utilizando MSPD e LC-APCI-MS. O adsorvente empregado foi C8 e os valores de LOQ foram de 0,01-0,1 mg kg<sup>-1</sup>. As recuperações para os fungicidas foram na faixa de 52,5-91,1% com RSD variando de 6,1-11,9%. O método foi aplicado para amostras coletadas em uma cooperativa de agricultores em Valencia (Espanha), sendo detectados resíduos de fungicidas como diclorana e procloraz.

DÓREA e LÓPEZ (2004) aplicaram MSPD para análise de agrotóxicos em quiabo por GC-MS. A sílica gel foi usada como dispersante e alumina neutra como co-coluna. Os compostos foram eluídos com 40 mL de acetato de etila. Valores de recuperação na faixa de 71,4-128,4%, RSD médio de 11,7% e LOD de 0,02 a 0,15 mg kg<sup>-1</sup> foram obtidos. O método foi aplicado e resíduos de agrotóxicos foram detectados em concentrações na faixa de 0,56-2,71 mg kg<sup>-1</sup>.

WANG *et al.* (2007) também determinaram resíduos de fungicidas em frutas e vegetais utilizando MSPD e LC-ESI-MS/MS. O adsorvente empregado foi C18 e o solvente de eluição acetato de etila. Valores de recuperação e RSD entre 71-102% e menor que 13%, respectivamente, foram obtidos, com valores de LOQ na faixa de 4-100 µg kg<sup>-1</sup>. O método foi aplicado e resíduos de agrotóxicos foram detectados, entretanto sempre abaixo dos valores de LMRs.

WU *et al.* (2008) aplicaram MSPD para determinação de resíduos de micotoxina em amostras de maçã e suco de maçã empregando LC-UV. O adsorvente empregado foi C18 e o solvente de eluição diclorometano. Os valores de recuperação variaram de 89,8-103,3% para suco de maçã e 85,3-97,9% para maçã, com RSD entre 2,9-5,4% e LOD de 6 µg kg<sup>-1</sup>.

YANG *et al.* (2008) analisaram resíduos de hormônios em ovos por MSPD e LC-ESI-MS/MS. O dispersante utilizado foi C18 e carbono grafitizado para *clean-up*. Valores médios de recuperação foram entre 83,8-111,2% e RSD entre 10,5-23,7%.

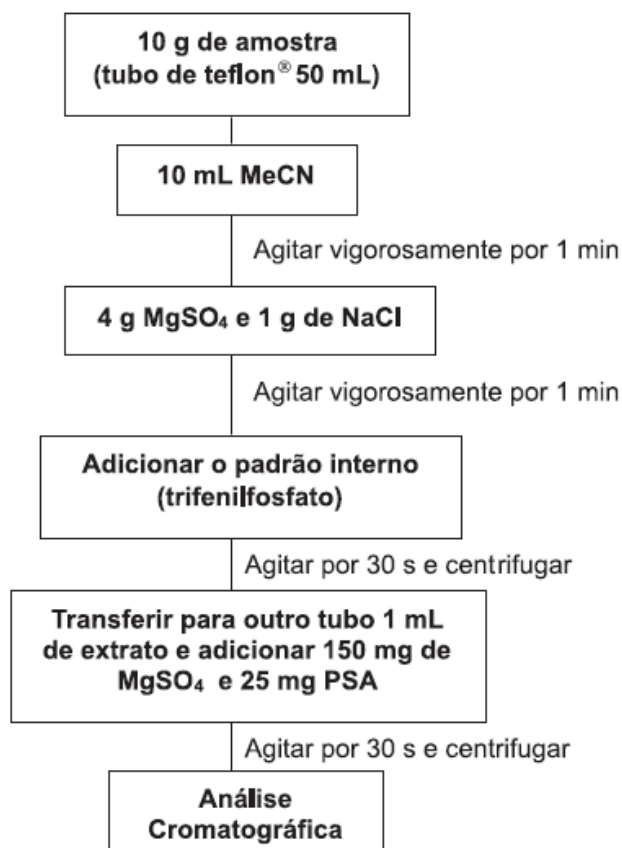
Os LOQ foram na faixa de 0,6-5,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . O método foi aplicado e resíduos de progesterona encontrados na faixa de 9,9 a 40,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

PINHO *et al.* (2009) analisaram resíduos de agrotóxicos em tomate empregando MSPD e GC-DCE. O adsorvente utilizado foi C18 na proporção 1:1 amostra:adsorvente. Neste estudo, os autores comparam a eficácia de diferentes adsorventes para *clean-up* das amostras sendo a sílica mais eficiente. Os valores de recuperação para os compostos variaram entre 64,7 e 99,2% com RSD menor que 5% para todos os compostos. Os valores de LOD foram inferiores a 6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e de LOQ menores que 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . O método foi aplicado e resíduos de agrotóxicos não foram encontrados.

### 3.5.2 QuEChERS

ANASTASSIADES *et al.* (2003) introduziram um novo procedimento de preparo de amostras para extração de resíduos de agrotóxicos buscando superar limitações práticas dos métodos multirresíduo de extração disponíveis na época (PRESTES *et al.*, 2009).

O método foi denominado QuEChERS por ter características de ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. O método é baseado em uma extração com acetonitrila, seguido de partição líquido-líquido (adição de  $\text{MgSO}_4$  e  $\text{NaCl}$ ) e posterior etapa de *clean-up* com SPE dispersiva (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; ROMERO-GONZÁLEZ *et al.*, 2008). Na Figura 11 um fluxograma representativo do método QuEChERS original é apresentado.



**Figura 11 - Fluxograma representativo do método QuEChERS original. Fonte: PRESTES *et al.*, 2009**

O emprego de acetonitrila como solvente de extração no método QuEChERS proporciona uma menor quantidade de coextrativos lipofílicos provenientes da amostra quando se trabalha, como por exemplo, com cereais, gorduras e pigmentos; também, a extração de uma ampla faixa de pesticidas com diferentes polaridades e, a compatibilidade do extrato final com a Cromatografia Líquida e com a Cromatografia Gasosa. Além disso, a acidificação da acetonitrila permite recuperações satisfatórias de pesticidas que geralmente apresentam problemas de estabilidade (PRESTES *et al.*, 2009).

A adição de sais na etapa de partição promove o efeito “*salting out*” propiciando melhores percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que, a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, assim como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa. O sal secante  $\text{MgSO}_4$  tem grande capacidade de remover água quando comparado a outros sais e por isso foi escolhido durante o desenvolvimento do método QuEChERS. Além disso, 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 (PRESTES *et al.*, 2009).

Entre as principais vantagens do método com relação aos métodos tradicionais de preparo de amostra estão: os altos valores de recuperações para uma ampla faixa de agrotóxicos; elevado grau de exatidão e precisão dos resultados, emprego de padrão interno; preparo de um grande número de amostra em um tempo reduzido, cerca de 8 amostras em aproximadamente 30 min; redução no volume de solventes orgânicos; simplicidade de execução (LEHOTAY *et al.*, 2005).

Ensaio de proficiência empregando o método QuEChERS mostram que este método é robusto, sendo o método transferido com sucesso entre os laboratórios participantes (LEHOTAY, 2007). Nos Estados Unidos, este método foi adotado em 2007, como método oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para a determinação de resíduos de pesticidas em alimentos (AOAC International, 2007).

O método QuEChERS também é considerado método oficial pelo *European Committee for Standardization* (*Codex Alimentarius*, 2007). Além disso, durante a 39ª Sessão do Comitê de Resíduos de Pesticidas do *Codex Alimentarius* realizada em 2007, os Estados Unidos apresentaram a proposta de oficialização deste, como método padrão do *Codex Alimentarius* (*European Union*, 2008; PRESTES *et al.*, 2009).

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 na área.

LEHOTAY *et al.* (2005) desenvolveram um método envolvendo QuEChERS para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos gordurosos (leite, ovos e abacate). Foram utilizados 15,0 g de amostra e 15,0 mL de acetonitrila (acidificada com 1% (v/v) de ácido acético (HAc)); 6,0 g de MgSO<sub>4</sub> e 1,5 g de acetato de sódio (NaAc); realizada agitação manual por 1 min; centrifugação e, etapa de *clean-up* do extrato com emprego de diferentes dispersantes antes da análise final. A técnica

empregada para determinação dos compostos foi GC-MS. Os valores de LOQ foram menores que  $10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$  e os valores de recuperação variaram entre 70 e 110% com RSD inferior a 15%.

LESUEUR *et al.* (2008) analisaram 140 agrotóxicos em matrizes como limão, uva, cebola e tomate empregando método QuEChERS modificado. Foram empregados 10,0 g de amostra e 10,0 mL de acetonitrila; agitação com vortex por 1 min; 4,0 g de  $\text{MgSO}_4$ , 1,0 g de cloreto de sódio (NaCl), 1,0 g de citrato de sódio dihidratado e 0,5 g de hidrogenocitrato dissódico sesquihidratado; agitação manual por 1 min; centrifugação; etapa de *clean-up*; centrifugação; filtração e análise. As determinações foram feitas com GC-MS e LC-MS. Para o método empregando GC-MS os valores de LOQ, recuperação e RSD foram de 1,2-161,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , de 70-110% e menor que 20%, respectivamente. Para o método por LC-MS valores de LOQ foram de 3,3-382,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , recuperações de 70-110% e RSD menor que 20%.

WANG *et al.* (2007) determinaram resíduos de fungicidas em frutas e vegetais utilizando QuEChERS e LC-ESI-MS/MS. Foram empregados 15,0 g de amostra e 15,0 mL de acetonitrila; agitação por 45 s; adição de 6,0 g de  $\text{MgSO}_4$  e 1,5 g de NaCl; agitação por 45 s; centrifugação; etapa de *clean-up*; agitação por 20 s; centrifugação e determinação. Os valores de recuperação e RSD entre 72-107% e menor que 15%, respectivamente. Valores de LOQ na faixa de 4-100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

MEZCUA *et al.* (2009) descreveram dois métodos baseados em GC-MS/MS para determinação de inseticidas em pimentão. O procedimento para QuEChERS envolve o uso de 15,0 g de amostra, 15,0 mL de acetonitrila (acidificada com 1% (v/v) de Ácido acético), 6,0 g de  $\text{MgSO}_4$ , 1,5 g de Acetato de Sódio; agitação por 5 min; centrifugação; etapa de *clean-up*; agitação em vortex por 30 s; centrifugação; evaporação e reconstituição do extrato em hexano/acetona (9:1, v/v); adição de padrão interno; etapa de *clean-up*; agitação em vortex por 20 s; centrifugação e injeção no cromatógrafo. Os valores de LOD foram na faixa de 0,1–0,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Os valores de recuperação ficaram entre 85-98% com RSD menor que 8%.

### 3.6 Validação de métodos cromatográficos

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada

validação. Vários autores definem validação de métodos e pode-se dizer que os conceitos continuam evoluindo e estão constantemente sob consideração pelas agências reguladoras (RIBANI *et al.*, 2004).

Segundo a ANVISA (2003), a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Ainda, segundo RIBANI (2004), validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência, sendo que um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado.

A validação de métodos cromatográficos para a quantificação de compostos endógenos ou exógenos em matrizes biológicas tem sido tema de discussão em conferências e artigos científicos. Representantes da comunidade científica, das indústrias e agências reguladoras do Brasil (ANVISA), EUA (US-FDA) e Europa (EU) definiram os parâmetros de validação, que posteriormente foram uniformizados pela ICH (*International Conference on Harmonization*) (CASSIANO *et al.*, 2009).

Vários trabalhos na literatura descrevem os parâmetros que devem ser avaliados na validação de métodos e, geralmente há uma concordância que estes parâmetros analíticos devem incluir: curva analítica, linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e de quantificação.

### 3.6.1 Curva analítica e linearidade

A curva analítica corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental (área/altura da banda cromatográfica) e a concentração do analito. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004; CASSIANO *et al.*, 2009).

Assim, é necessário o uso de um número suficiente de soluções-padrão para definir adequadamente a relação entre a concentração e a resposta. As diretrizes da ICH e da ANVISA especificam um mínimo de cinco níveis de concentração, juntamente com certos mínimos de variação especificados. O Grupo de analistas de

Resíduos de Pesticidas (GARP) também sugere cinco concentrações que devem ser injetadas em ordem crescente de concentração, no mínimo três vezes cada, com estimativa do desvio padrão relativo (RSD) entre as injeções inferior a 5% (BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

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) (INMETRO, 2003).

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

Onde:

y = resposta medida (altura ou área do pico);

x = concentração;

a = inclinação da curva analítica = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y.

A linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados em função da concentração do analito ou então calculados a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação linear (r) é freqüentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (INMETRO, 2003; RIBANI, 2004).

A quantificação do composto de interesse em validação pode ser obtido por três diferentes formas de padronização, de acordo com o tipo de análise e do tratamento utilizado para a amostra: padronização externa, compara a área do pico do analito a ser quantificado com as áreas obtidas a partir dos padrões de calibração; 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); e padronização por adição de padrão, consiste na adição de diferentes concentrações do analito à matriz que já contém uma quantidade desconhecida do mesmo. O método de padronização escolhido

deve fornecer a melhor exatidão possível, além de um alto nível de precisão (CASSIANO *et al.*, 2009).

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. Sua principal vantagem sobre o método de padronização externa é que fornece uma melhor correspondência com a composição da amostra (RIBANI, 2004).

A interferência da matriz pode ser determinada sobrepondo-se as curvas obtidas pela padronização externa ou interna injetando-se os padrões em solvente e com a superposição da matriz. Também, pela razão entre a área do padrão preparado no extrato branco da matriz e a área do padrão preparado em solvente. No caso da sobreposição das retas, retas coincidentes indicam que não existe interferência da matriz nas determinações, assim como, valores iguais a 100% para a razão entre as áreas dos padrões (PRESTES, 2007; KRUIVE *et al.*, 2008).

### 3.6.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os termos limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ) são utilizados para demonstrar a habilidade do método em detectar e quantificar baixas concentrações de um analito. O LOD é definido como a menor concentração de um analito que o método é capaz de diferenciar confiavelmente do ruído. O LOQ refere-se a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão (INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; CASSIANO *et al.*, 2009).

Ambos, LOD e O LOQ, podem ser estimados através do método visual, do método relação sinal/ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica. O método relação sinal/ruído é o mais utilizado para técnicas analíticas em geral,



sendo que pode ser aplicado apenas para procedimentos analíticos que apresentam o sinal do ruído da linha de base (BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

A determinação da razão sinal/ruído é realizada 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 e 10 é geralmente considerada aceitável para estimar o limite de detecção e quantificação, respectivamente (RIBANI *et al.*, 2004; CASSIANO *et al.*, 2009).

### 3.6.3 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003; BRITO *et al.*, 2003). É sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (RIBANI *et al.*, 2004).

A exatidão é normalmente expressa em termos de percentagem e, os processos geralmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2003).

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos e, avalia a eficiência do método de tratamento das amostras. Este parâmetro é calculado comparando-se a resposta obtida para o analito adicionado na matriz biológica e extraído com a resposta obtida para o analito em amostras preparadas em solvente (BRITO *et al.*, 2003; CASSIANO *et al.*, 2009).

Para a avaliação da recuperação, devem-se utilizar concentrações em três níveis: baixo, médio e alto, de acordo com a curva de calibração. Embora altos valores de recuperação sejam desejáveis para maximizar a sensibilidade do método, não é necessário que este valor seja de 100% e, sim, que a recuperação seja consistente, precisa e reprodutiva (CASSIANO *et al.*, 2009).

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$ . Porém, dependendo da

complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até  $\pm 15\%$ . 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).

#### 3.6.4 Precisão

A precisão de um método analítico é a medida de erros aleatórios e, representa a proximidade dos resultados obtidos através de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003). É normalmente expressa como desvio padrão relativo, sendo aceitáveis valores de até 20% para análise de resíduos de agrotóxicos. A precisão é considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (BRITO *et al.*, 2003).

A repetibilidade define a precisão do método em repetir, em um curto intervalo de tempo, os resultados obtidos nas mesmas condições de análise, ou seja, com o mesmo analista, com o mesmo equipamento, no mesmo laboratório e fazendo uso dos mesmos reagentes. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia, sendo utilizado pelo INMETRO e, é sinônimo para repetibilidade utilizado pela ANVISA (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; CASSIANO *et al.*, 2009).

A precisão intermediária define a habilidade do método em fornecer os mesmos resultados quando as análises são conduzidas no mesmo laboratório, mas em diferentes dias, por diferentes analistas e/ou diferentes equipamentos (CASSIANO *et al.*, 2009). É reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. A determinação da precisão intermediária segue a mesma recomendação da ANVISA para avaliação da repetibilidade descrita anteriormente (RIBANI *et al.*, 2004).

### 3.6.5 Robustez

A robustez de um método analítico mede sua suscetibilidade frente a pequenas variações que podem ocorrer durante as análises de rotina. Para examinar as causas de variabilidade dos resultados, vários fatores devem ser avaliados, tais como: pH, força iônica e quantidade do modificador orgânico da fase móvel, temperatura da coluna, vazão da fase móvel, diferentes colunas (diferentes lotes e/ou fabricantes), procedimentos envolvidos no preparo das amostras, etc. Se as alterações das condições de 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).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu na validação de métodos para determinar resíduos de agrotóxicos em amostras de cebola. As amostras foram preparadas pelos métodos MSPD e QuEChERS modificado, os quais foram otimizados para alcançar maior eficiência no processo de extração. Também, foram otimizados os parâmetros de fragmentação dos analitos para determinação por LC-ESI-MS/MS. O estudo foi desenvolvido 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 Instrumentação

- Balança Analítica de precisão modelo FA 2104N, Bioprecisa;
- Bomba à vácuo Tecnal TE-058 (Piracicaba, SP, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (100 – 1000 µL) (Labmate, Polônia; Digipet);
- Sistema de filtração em membrana Phenomenex;

- Sistema de Purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3<sup>®</sup> Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA);
- Sistema *manifold* para SPE Phenomenex (Torrance, CA, USA) para a pré-concentração simultânea de até 12 amostras;
- Ultra-som Quimis<sup>®</sup> modelo Q335D (Diadema, SP, Brasil);
- Processador de alimentos, modelo Mega Master Plus RI 3170;
- Vórtex modelo Certomat<sup>®</sup> MV-B. Braun. (Bioteck Internacional, Alemmar - Comercial e Industrial S.A.);
- Centrífuga de tubos microprocessada modelo Quimis<sup>®</sup> Q222T (QUIMIS aparelhos científicos);
- Cromatógrafo a líquido Alliance Separations modelo 2695 Waters (Milford, MA, USA) equipado com amostrador automático, bomba quaternária, sistema de degaseificação, Detector MS, Micromass<sup>®</sup> Quatro Micro™ API Waters, com fonte API, utilizando o modo de ionização por Electrospray, sistema de aquisição de dados através do software Masslynx 4.0 Waters e coluna analítica XTerra<sup>®</sup> MS C18 3,5 µm 144 Å (50 × 3 mm d.i.) (Waters, Milford, MA, USA);
- Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics (Instruments, Escócia).

#### 4.2 Reagentes, solventes, adsorventes e materiais

- Ácido fórmico p.a. 98% (Merck, RJ, Brasil);
- Água destilada;
- Água Ultrapura, purificada em sistema Direct-Q UV3<sup>®</sup> Millipore (resistividade 18,2 MΩ cm);
- Metanol, acetato de etila e acetonitrila, grau HPLC (J.T Baker, Mallinckrodt, NJ, USA);
- Sulfato de magnésio anidro (J.T. Baker);
- Padrões analíticos: dimetoato 99,4%, metalaxil-M 99,0%, tebuconazol 99,6%, azoxistrobina 97%, difenoconazol 99% (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Gás argônio analítico 5.0 usado como gás de colisão no sistema LC-ESI-MS/MS (White Martins, Brasil);
- Gás Nitrogênio 99,99% de pureza (White Martins, Brasil);
- Cartuchos para SPE Chromabond C18ec (45 µm, 60 Å) (Dürr, Germany);

- Cartuchos para SPE Strata<sup>®</sup> X (33  $\mu\text{m}$ , 85 Å) (Phenomenex, EUA);
- Terra diatomácea (Laboratório de Operações Unitárias da Escola da Química e Alimentos – FURG);
- Detergente Extran<sup>®</sup> neutro (Merck, Brasil);
- Membrana filtrante de nylon 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro (Millipore, SP, Brasil);
- Almofariz e pistilo;
- Tubos de extração (15 mL de capacidade);
- Frascos de vidro âmbar, capacidade de 10 e 50 mL;
- Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 mL;
- Tubos de polipropileno (50 e 15 mL de capacidade) – Sarstedt (Alemanha);
- Dispenser Boeco 10 - 50 mL;
- Vidraria comum de rotina (balões volumétricos, pipetas volumétricas, béquer, etc...).

#### **4.3 Preparo das soluções analíticas**

As soluções analíticas estoque, contendo 1000 mg L<sup>-1</sup> de cada agrotóxico (dimetoato, metalaxil-M, tebuconazol, azoxistrobina e difenoconazol) foram preparadas pela dissolução do padrão sólido em metanol, considerando o grau de pureza. As soluções foram armazenadas em frasco âmbar e estocadas a -18 °C.

A partir das soluções estoques de 1000 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas soluções estoque de concentrações de 100 mg L<sup>-1</sup> de cada composto em metanol. A solução trabalho contendo a mistura dos 5 compostos foi preparada na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>, diluições foram realizadas para a otimização dos parâmetros de fragmentação, preparo das curvas analíticas e fortificação das amostras. A solução trabalho foi preparada mensalmente e as diluições utilizadas foram preparadas diariamente.

#### **4.4 Otimização do sistema cromatográfico LC-ESI-MS/MS para determinação dos compostos**

#### 4.4.1 Seleção da fase móvel e da vazão

A fase móvel empregada, água ultrapura e acetonitrila, acidificados com 0,1% de ácido fórmico (52:48, v/v), já estava otimizada no LACOM para determinação de agrotóxicos com características semelhantes aos deste estudo e por isto não foi alterada. O mesmo ocorreu com o volume de injeção das amostras estabelecido como 10  $\mu\text{L}$ . A vazão da fase móvel foi selecionada de acordo com a separação e sensibilidade dos compostos, sendo testadas vazões de 0,2; 0,3 e 0,4  $\text{mL min}^{-1}$ .

#### 4.4.2 Preparo da fase móvel

Os solventes empregados na fase móvel (água ultrapura e acetonitrila, acidificados com 0,1% (v/v) de ácido fórmico) foram filtrados à vácuo através de membranas de nylon (0,45  $\mu\text{m}$ ) e desgaseificados em banho de ultra-som durante 30 min, à temperatura ambiente.

A acidificação da fase móvel com ácido fórmico, que é um aditivo orgânico mais volátil, é indicada para evitar que ocorra cristalização na interface do sistema LC-ESI-MS/MS. Também, a fase móvel acidificada influencia na fragmentação dos compostos a serem determinados melhorando a eficiência da ionização (KUSTER *et al.*, 2006).

#### 4.4.3 Otimização dos parâmetros para fragmentação dos compostos no MS

A otimização dos parâmetros de fragmentação foi realizada para selecionar as melhores condições de fragmentação dos íons na análise por MS. Para isto, foram realizadas infusões diretas no espectrômetro de massas com solução analítica na concentração de 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de cada agrotóxico estudado. Os parâmetros variados foram: voltagem do cone, para selecionar o íon precursor; energia de colisão, para fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos; temperatura da fonte, temperatura e vazão do gás de dessolvatação, para secagem do solvente; voltagem do capilar e do cone extrator. A etapa de otimização das condições de fragmentação foi

determinante para selecionar os íons a serem monitorados para qualificação e quantificação dos compostos estudados.

#### **4.5 Otimização do procedimento para MSPD**

Muitos parâmetros afetam a eficiência da extração por MSPD e por isso devem ser avaliados. De acordo com BARKER (2007), o tipo e a quantidade de suporte sólido empregado e o solvente de eluição utilizado são fatores que afetam diretamente o sucesso da técnica. Além disso, o tempo de interação da amostra após a fortificação com os agrotóxicos, e o tempo de dispersão da amostra pelo suporte sólido dependem das características da matriz, dos analitos e do tipo de suporte sólido. Assim, o tipo e a quantidade de suporte sólido, o tempo de interação e dispersão e o tipo de solvente de eluição foram os parâmetros avaliados neste trabalho buscando obter recuperações percentuais (R%) entre 70 e 120%, e desvio padrão relativo (RSD) menor que 20% para determinação dos agrotóxicos dimetoato, metalaxil-M, tebuconazol, azoxistrobina e difenoconazol em cebola.

A matriz, branco, escolhida para a otimização dos métodos foi adquirida de um produtor local que não emprega agrotóxicos em seus cultivos. Todos os parâmetros foram otimizados no nível de  $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$  que corresponde a uma concentração intermediária na faixa linear do método e favorece o desenvolvimento inicial do processo de otimização da técnica. O volume de solução padrão adicionada para fortificação das amostras em todos os testes de otimização da MSPD foi  $100 \text{ }\mu\text{L}$ , suficiente para umedecer toda amostra e facilitar a evaporação do solvente.

##### **4.5.1 Quantidade de amostra e adsorvente**

O adsorvente tem papel fundamental em MSPD. Entre muitas funções, promove o rompimento da estrutura física da amostra e adsorve os compostos da matriz gerando um material cromatográfico adequado para posterior eluição dos analitos. Neste trabalho, o adsorvente testado foi C18, o qual é amplamente utilizado em MSPD para extração de agrotóxicos mediantemente polares em frutas e vegetais

(TORRES *et al.*, 1997; DÓREA *et al.*, 2004; SOLER *et al.*, 2005). O adsorvente C18 é disponível em grande quantidade em muitos laboratórios como resíduo gerado a partir da técnica de preparo de amostra SPE. Este fato possibilita a reutilização deste material para MSPD, proporcionando a redução de custos na etapa de extração dos compostos e a minimização de resíduos gerados pela SPE.

Para reutilização, o material sólido adsorvente foi retirado dos cartuchos de SPE com auxílio de uma pinça. Uma porção significativa do material foi macerada com 10,0 mL de acetonitrila por 5 min; logo, foi realizada centrifugação para sedimentação da fase sólida e uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante foi retirada para injeção no sistema cromatográfico para verificar a possível contaminação pelos compostos de interesse neste estudo e por outros compostos estudados no laboratório.

Para escolher a massa mais adequada de C18 para 0,5 g de amostra, foram testadas as quantidades de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g; 3 h de interação após a fortificação, 5 min de dispersão e 10,0 mL de acetonitrila como solvente de eluição. A quantidade de amostra não variou, mas, foi empregada de acordo com dados da literatura assim como o restante do processo (WANG *et al.*, 2007). Já, as quantidades de adsorvente testadas foram de acordo com o indicado por BARKER (2007) de 1:1 até 1:4 proporção de amostra para adsorvente.

#### 4.5.2 Tempo de interação após a fortificação

O tempo de interação após a fortificação é o tempo em que a amostra fica em contato com a solução padrão dos agrotóxicos, e varia de acordo com a matriz a qual se está trabalhando. Por exemplo, para amostras líquidas a interação entre amostra e analito acontece praticamente instantaneamente após a etapa de fortificação, uma vez que, as amostras são homogêneas. No caso de matrizes como a cebola é necessário certo tempo de contato entre a amostra e os analitos para que ocorra a evaporação do solvente e a maior interação entre os compostos e a matriz (PINHO *et al.*, 2009).

Como essa etapa é a mais demorada durante a otimização do método, já que, as condições iniciais de trabalho empregam 3 h como tempo de interação, foi realizado um teste com a intenção de tornar mais rápido esse processo sem que o



desempenho do mesmo fosse prejudicado. Assim, buscando a maior rapidez do processo foi testado 1 h como tempo de interação.

A amostra (0,5 g) foi fortificada com a solução padrão com a mistura dos agrotóxicos na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  e após os tempos de interação (1 e 3 h) foi dispersa por 5 min com 1,0 g de C18, transferida para coluna de MSPD e eluída com 10,0 mL de acetonitrila.

#### 4.5.3 Tempo de dispersão da amostra com o adsorvente

Em MSPD a amostra precisa ser completamente dispersa no suporte sólido para garantir que a nova fase formada seja a mais homogênea possível, promovendo um bom empacotamento da coluna de MSPD e boas condições para eluição dos analitos. No entanto, o processo de homogeneização da amostra com o suporte sólido é um pouco demorado e trabalhoso. Dessa forma, foi verificada a possibilidade de reduzir o tempo normalmente empregado para dispersar a amostra (5 min) comparando com tempos menores de dispersão (1 e 3 min).

A amostra (0,5 g) fortificada + adsorvente (1,0 g de C18) foi transferida para um almofariz de porcelana e homogeneizada com pistilo em movimentos circulares e uniformes. A seguir, a coluna de MSPD foi preparada e realizada a eluição com 10,0 mL de acetonitrila. Tempos maiores não foram testados por tornar o processo mais trabalhoso e demorado.

#### 4.5.4 Seleção do solvente de eluição

Esse parâmetro é tão crítico como a escolha do suporte sólido e da fase quimicamente ligada e afeta diretamente a eficiência da extração em MSPD. Todos os componentes do sistema interagem simultaneamente com o solvente de eluição. Essas interações envolvem o analito com o suporte sólido, com a fase quimicamente ligada (C18) e com a matriz dispersa; a matriz com o suporte sólido e com a fase quimicamente ligada (DÓREA *et al.*, 2004).

Bons resultados para MSPD são alcançados combinando C18 e os solventes: acetato de etila, acetonitrila e metanol para extração de agrotóxicos mediantemente

polares em frutas e vegetais (KRISTENSO *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007). Dessa forma, metanol, acetonitrila, acetato de etila e uma mistura de metanol: acetato de etila (1:4, v/v) foram testados para escolher o solvente que tem maior poder de desorção dos compostos de interesse. Para isto, 0,5 g de amostra foi fortificada, dispersa por 5 min com 1,0 g de C18, transferida para a coluna de MSPD (tubo vazio de SPE) e eluída com 10,0 mL de cada um dos solventes testados.

#### 4.5.5 C18 versus outros adsorventes

Para avaliar a performance da MSPD com C18 reutilizada foram testados outros adsorventes indicados na literatura para extração de agrotóxicos em frutas e vegetais. Terra diatomácea, adsorvente polimérico e C18 foram testados para avaliar as recuperações e, a possibilidade de empregar outros adsorventes na técnica de extração.

#### 4.5.6 Efeito Matriz empregando MSPD

Para avaliar o efeito matriz sobre os compostos estudados foi injetado no sistema cromatográfico a solução padrão com a mistura dos agrotóxicos, na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup>, preparado no extrato da matriz (extraído por MSPD) e em metanol. O cálculo do efeito matriz (%EM) foi realizado segundo KRUIVE *et al.*, (2008) e é apresentado na Equação 2.

$$\%EM = \frac{\text{área padrão matriz}}{\text{área padrão metanol}} \times 100 \quad (2)$$

## 4.6 Otimização do procedimento QuEChERS modificado

LESUEUR *et al.* (2008) desenvolveram um método para determinação de agrotóxicos em frutas e vegetais empregando QuEChERS modificado. As modificações foram realizadas no método QuEChERS original (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Neste trabalho foram realizadas modificações no método proposto por LESUEUR e colaboradores. Para isto, foram realizados testes para avaliar a influência da etapa de *clean-up* e da adição de cloreto de sódio na exatidão do método.

### 4.6.1 Avaliação da influência da etapa de *clean-up* na exatidão do método

O método proposto por LESUEUR emprega a etapa de *clean-up*, pois o método foi empregado para determinação de 140 agrotóxicos em diversas matrizes como uva, limão e tomate, além da cebola. Neste trabalho foi realizado um teste para estimar o efeito da etapa de *clean-up* na exatidão do método para cebola.

O procedimento foi realizado com a pesagem de 10,0 g de amostra em um tubo de polipropileno (capacidade 50 mL), seguida pela etapa de fortificação no nível de 1,0 mg kg<sup>-1</sup>. Para fortificação foi adicionado na amostra um volume conhecido de solução padrão de trabalho com a mistura dos agrotóxicos. Logo, foi adicionado 10,0 mL de acetonitrila e realizada agitação manual por 15 s e agitação mecânica com auxílio de um vórtex por 1 min. Após, foram adicionados 4,0 g de sulfato de magnésio anidro e repetida a etapa de agitação. Por último, o tubo foi centrifugado a 5000 rpm por 3 min.

Para o procedimento sem etapa de *clean-up* uma alíquota do extrato foi retirada e injetada no sistema cromatográfico. Para o procedimento com etapa de *clean-up* 6,0 mL do extrato foi transferido para um tubo de polipropileno (capacidade 25,0 mL) contendo 150,0 mg de PSA (do inglês, *Primary Secondary Amine*) e 950,0 mg MgSO<sub>4</sub> seguido pela etapa de agitação e centrifugação. Uma alíquota do extrato final foi retirada para injeção no sistema cromatográfico.

#### 4.6.2 Influência do NaCl na recuperação dos compostos

Os métodos empregados por ANASTASSIADES *et al.* (2003) e, por LEUSUEUR *et al.* (2008) utilizam sais como sulfato de magnésio e cloreto de sódio. Assim, foram realizados testes comparando os resultados de recuperação ao empregar os dois sais ou apenas empregando  $\text{MgSO}_4$ . A adição de sais promove o efeito “*salting out*” em vários métodos multirresíduos, incrementando o nível de recuperação para analitos mais polares. A adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (PRESTES *et al.*, 2009).

Para realização dos testes foram pesados 10,0 g de amostra em 6 tubos de polipropileno (capacidade 50 mL); as amostras foram fortificadas no nível de 1,0 mg  $\text{kg}^{-1}$  e foi adicionado 10 mL de acetonitrila em cada tubo; em três amostras foi adicionado 4,0 g de  $\text{MgSO}_4$  e 1,0 g de NaCl e, nas três amostras restantes foi adicionado apenas 4,0 g  $\text{MgSO}_4$ . O restante do procedimento foi realizado de acordo com o item 4.6.1, sem emprego de etapa de *clean-up*.

#### 4.6.3 Efeito Matriz empregando QuEChERS modificado

Para avaliar o efeito matriz sobre os compostos estudados foi injetado no sistema cromatográfico a solução padrão com a mistura dos agrotóxicos, na concentração de 1,0 mg  $\text{L}^{-1}$ , diluído com o extrato branco da matriz extraído por QuEChERS e a solução padrão com a mistura dos agrotóxicos diluída com metanol. O cálculo do efeito matriz (%EM) foi realizado segundo KRUIVE *et al.* (2008) aplicando a Equação 1.

### 4.7 Validação dos métodos

A metodologia foi validada empregando figuras analíticas de mérito como: curva analítica, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão (recuperação) e precisão (repetitibilidade e precisão intermediária). Parâmetros sugeridos para validação de métodos analíticos pelo Instituto Nacional de

Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e pela ANVISA (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003).

#### 4.7.1 Curva analítica e linearidade

A linearidade do instrumento e do método foram avaliadas pela construção de curvas analíticas através de padronização externa no solvente e por superposição da matriz com soluções analíticas nas concentrações de 0,0005; 0,005; 0,05; 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>.

Para padronização externa por superposição da matriz foram preparadas as soluções analíticas através de diluições da solução padrão trabalho com o extrato da matriz, extraído por MSPD e QuEChERS modificado. Os procedimentos foram realizados com a matriz isenta de agrotóxicos, branco do procedimento, cuja procedência já foi mencionada no item 4.5. A padronização externa no solvente foi realizada por diluições da solução padrão trabalho com metanol.

Cada solução foi injetada três vezes e os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do *software* (Masslynx 4.0 Waters) do equipamento. A partir destes dados foi avaliado o coeficiente de correlação linear ( $r$ ), obtendo assim a linearidade do instrumento e do método.

#### 4.7.2 Limites de detecção e quantificação

O LOD do instrumento (LOD<sub>i</sub>) e o LOQ do instrumento (LOQ<sub>i</sub>) para cada composto foi estimado a partir da relação sinal/ruído calculada pelo *software* do equipamento, considerando no mínimo 3 e 10 vezes a razão do sinal pela linha de base (ruído), respectivamente. Os limites instrumentais foram obtidos através de padronização externa no solvente, pelo preparo de soluções analíticas de diferentes concentrações em metanol.

Os limites de detecção (LOD<sub>m</sub>) e quantificação (LOQ<sub>m</sub>) do método empregando MSPD e QuEChERS modificado foram obtidos pela injeção de soluções analíticas de diferentes concentrações preparadas através de diluições da

solução padrão trabalho com o extrato da matriz, branco, extraído por MSPD e por QuEChERS modificado.

Em MSPD o  $LOD_m$  e o  $LOQ_m$ , em  $mg\ kg^{-1}$ , é obtido multiplicando o valor estimado de  $LOD_m$  e  $LOQ_m$ , em  $mg\ L^{-1}$ , pelo fator de conversão obtido (fator = 20). O fator foi calculado pela razão entre o nível de fortificação da amostra e a concentração esperada para os compostos após a extração por MSPD. Para o método empregando QuEChERS modificado o  $LOD_m$  e o  $LOQ_m$  foram obtidos sem utilizar fator de conversão, uma vez que, para o método QuEChERS, a proporção é 1,0 g de amostra para 1,0 mL de extrato.

#### 4.7.3 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em função dos ensaios de recuperação, de acordo com as determinações da ANVISA e do ICH (do inglês, *International Conference Harmonisation*) (RIBANI *et al.*, 2004). Para o método empregando MSPD, amostras de cebola (isentas de agrotóxicos) foram fortificadas nos níveis 0,01; 0,1 e 1,0  $mg\ kg^{-1}$ , a partir da adição de um volume conhecido de solução padrão trabalho com a mistura dos agrotóxicos a 0,5 g de amostra. Após 1 h de interação foi realizada dispersão por 5 min, transferência da amostra para coluna de MSPD que foi eluída com 10 mL de acetonitrila. A extração em cada nível de fortificação foi realizada em triplicata.

No método QuEChERS modificado, amostras de cebola (isentas de agrotóxicos) foram fortificadas nos níveis de 0,0005; 0,005; 0,05 e 1,0  $mg\ kg^{-1}$ , a partir da adição de um volume conhecido de solução padrão trabalho com a mistura dos agrotóxicos a 10,0 g de amostra. Após foi adicionado 10,0 mL de acetonitrila, 4,0 g de  $MgSO_4$ , realizada etapa de agitação, centrifugação e 1,0 mL do extrato final foi retirado para injeção no LC-ESI-MS/MS. Cada nível de fortificação foi extraído em triplicata.

Para a quantificação dos compostos foi utilizada a concentração do padrão diluído com o extrato branco da matriz. Os cálculos foram feitos de acordo com a equação 3, onde é expressa em porcentagem de recuperação.

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

$C_1$  = concentração determinada após a fortificação

$C_2$  = concentração determinada na amostra não fortificada (branco)

$C_3$  = concentração esperada para o nível de fortificação

#### 4.7.4 Precisão

A precisão instrumental foi avaliada a partir de injeções sucessivas de solução analítica padrão com a mistura dos agrotóxicos (n=7) e estimada através do desvio padrão relativo percentual (RSD%) com relação a média das áreas de todas as injeções.

A precisão dos métodos foi avaliada em função da repetibilidade e da precisão intermediária. Para o estudo da repetibilidade foi realizada a extração por MSPD e por QuEChERS em diferentes níveis de fortificação, em triplicata, e cada nível foi injetado três vezes. A partir das nove determinações foi calculado o RSD%. A precisão intermediária foi avaliada com nove determinações, assim como a repetibilidade, mas, em diferentes dias e com diferentes analistas. O valor numérico para avaliar a precisão, RSD%, foi calculado através da equação 4.

$$RSD(\%) = \frac{s}{X_m} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

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

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Otimização do sistema cromatográfico LC-ESI-MS/MS para determinação dos compostos

A Tabela 8 apresenta as condições empregadas no sistema cromatográfico para determinação dos compostos dimetoato, metalaxil-M, tebuconazol, azoxistrobina e difenoconazol. O volume de injeção não foi otimizado por já estar estabelecido no laboratório, assim como a composição da fase móvel. A coluna analítica composta por C18 como fase estacionária e a fase móvel constituída por solventes mais polares demonstram a aplicação de um método cromatográfico em fase reversa, na qual analitos de polaridade intermediária são analisados (COLLINS *et al.*, 2006; CALDAS, 2009).

**Tabela 8 - Condições empregadas no sistema cromatográfico**

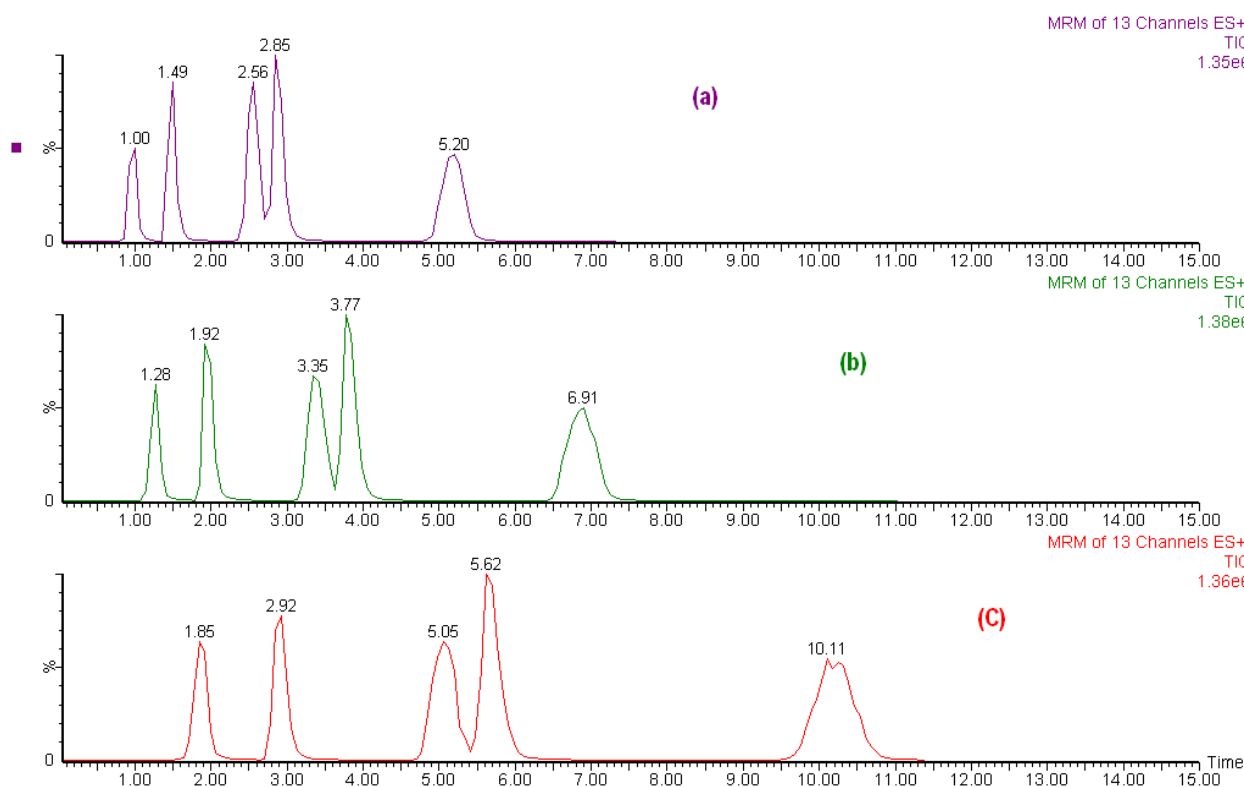
Parâmetros	LC-ESI-MS/MS
Coluna analítica	XTerra® MS C18 (50 x 3 mm, 3,5 µm)
Fase móvel	Acetonitrila 0,1% ácido fórmico:Água 0,1% ácido fórmico (52:48, v/v)
Vazão	0,4 mL min <sup>-1</sup>
Detector	MS/MS
Volume de injeção	10 µL

A acidificação da fase móvel é necessária para compostos como dimetoato e metalaxil-M que possuem baixos valores de log de  $K_{ow}$  e alta solubilidade em água. O pH menor proporciona maior interação entre esses compostos e a fase estacionária que é mais apolar, aumentando a retenção do composto. Além disso, a acidificação da fase móvel também influencia na eficiência da ionização dos analitos (KUSTER *et al.*, 2006; CALDAS, 2009).

Entre as vazões de fase móvel testadas (Figura 12), a vazão de 0,4 mL min<sup>-1</sup> foi selecionada para o trabalho. Esta condição proporcionou a separação dos compostos em um tempo menor de análise, com melhor simetria para o sinal cromatográfico do composto difenoconazol.



Ao empregar MS/MS é possível detectar individualmente os compostos, que não foram separados pela técnica cromatográfica utilizada, através do modo de aquisição MRM, se possuírem diferentes massas molares e gerarem diferentes espectros de massas. Assim, LC-MS/MS possibilita a obtenção de uma grande quantidade de informação estrutural acerca do analito, o que assegura sua identificação com maior exatidão do que quando ela é feita apenas com base nas características de retenção dos compostos analisados, como ocorre nas outras técnicas de detecção cromatográficas (CHIARADIA *et al.*, 2008). Entretanto, a separação cromatográfica é importante para assegurar a eficiência da ionização dos compostos, aumentando a sensibilidade dos fragmentos selecionados, além das condições otimizadas para a fragmentação dos compostos que devem se apresentar adequadas a vazão de fase móvel empregada.



**Figura 12 - Cromatogramas dos compostos em diferentes vazões de fase móvel, (a) 0,4 mL min<sup>-1</sup>; (b) 0,3 mL min<sup>-1</sup>; (c) 0,2 mL min<sup>-1</sup>. Ordem de eluição: dimetoato, metalaxil-M, azoxistrobina, tebuconazol e difenoconazol; padrão de 1 mg L<sup>-1</sup>**

### 5.1.1 Otimização dos parâmetros para fragmentação dos compostos no MS

A fonte de ionização à pressão atmosférica (API) foi empregada com interface por *electrospray* (ESI), devido à moderada polaridade da maioria dos analitos. ESI é a interface mais indicada para compostos neutros ou polares, que podem ser protonados ou deprotonados em condições apropriadas de pH (ARDREY, 2003; CALDAS, 2009). Na ESI ocorre a produção de íons do analito na fase líquida, a transformação destes em íons gasosos, que em seguida são introduzidos no espectrômetro de massas (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

As melhores condições para a fragmentação dos íons monitorados obtidas com infusões diretas no Espectrômetro de Massas de solução analítica padrão de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de cada agrotóxico, em uma vazão de 10 µL min<sup>-1</sup>, foram: temperatura de 100 °C na fonte; temperatura do gás N<sub>2</sub> (gás de dessolvatação) de 350 °C, mantida a uma vazão para a dessolvatação da amostra de 350 L h<sup>-1</sup> e para o cone de seleção dos íons a 50 L h<sup>-1</sup>; a energia do capilar foi 4 kV e o segundo cone, o extrator foi 3 V.

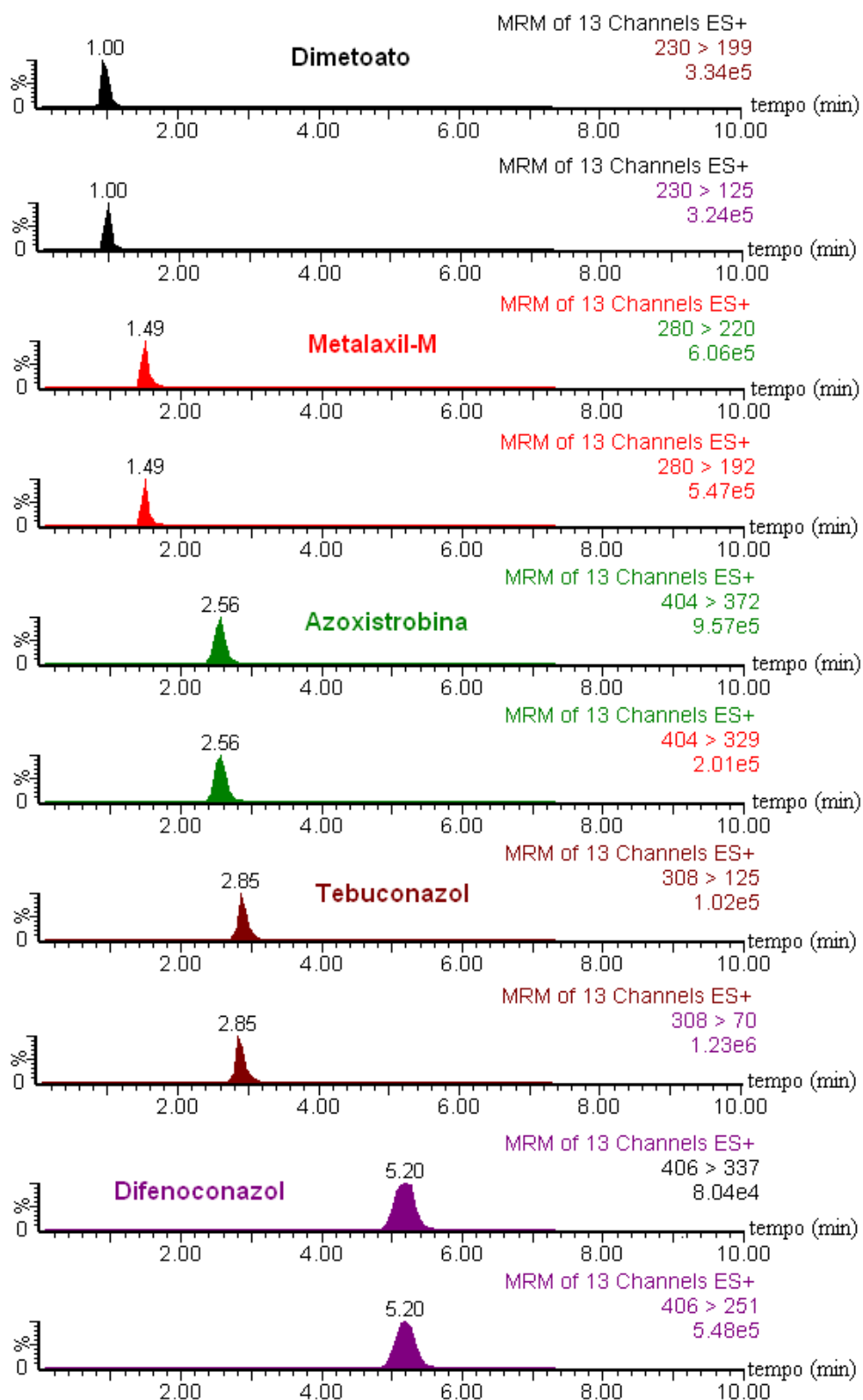
A Tabela 9 demonstra as transições monitoradas no modo ESI (+), modo de aquisição MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas), energia de colisão, voltagem do cone e tempo de retenção dos compostos estudados. Todos os compostos apresentaram sensibilidade para ionização e fragmentação pelo modo positivo, com a adição de 1 próton. A adição de 1 próton, normalmente se deve a adição de 1 próton de hidrogênio [M+H]<sup>+</sup>, o qual provém da fase móvel. Íons heterocíclicos (contendo, N e O), são comumente protonados (HARRIS, 2001; FERNÁNDEZ-ALBA, 2005; DEMOLINER, 2008).

**Tabela 9 - Resultado da otimização das condições de fragmentação para determinação dos agrotóxicos no espectrômetro de massas**

Agrotóxicos	MRM transição ( $m/z$ )		Energia de colisão (eV)	Voltagem do cone (V)	$t_R$ (min)
Dimetoato	230>125	Quantificação	20	16	1,00
	230>199	Qualificação	10	20	
Metalaxil-M	280>220	Quantificação	17	16	1,49
	280>192	Qualificação	17	16	
Tebuconazol	308>70	Quantificação	20	40	2,85
	308>125	Qualificação	22	28	
Azoxistrobina	404>372	Quantificação	20	20	2,56
	404>329	Qualificação	30	15	
Difenoconazol	406>251	Quantificação	31	31	5,20
	406>337	Qualificação	20	32	

Dwell Time: 0,3 s

Para cada composto foram selecionados dois fragmentos característicos, como apresentado na Tabela 9, vantagem fornecida por um analisador de massas em série, *tandem*, LC-ESI-MS/MS. O fragmento mais intenso (mais estável) foi escolhido para quantificação do composto e o segundo fragmento mais intenso para confirmação do mesmo. A Figura 13 ilustra os cromatogramas no modo MRM para as duas transições monitoradas de cada composto no sistema LC-ESI-MS/MS.



**Figura 13 - Cromatogramas no modo MRM contendo as duas fragmentações monitoradas para cada composto**

## 5.2 Otimização do procedimento para MSPD

Na sequência são apresentados os resultados dos testes realizados durante o processo de otimização da MSPD. Foi possível avaliar que além dos fatores estudados outras condições podem interferir no desempenho da técnica e necessitam ser considerados. O volume de solução padrão dos agrotóxicos para fortificação deve garantir que a amostra seja completamente fortificada, mas, não deve haver grande excesso de solvente para que a interação dos compostos com a matriz seja mais favorecida. O empacotamento da coluna de MSPD deve ser realizado de maneira uniforme para todas as amostras, para proporcionar boas condições de eluição dos analitos. A vazão adotada para eluição da coluna de MSPD deve ser constante entre todos os ensaios e suficiente para desorção dos analitos em um tempo viável para o processo. Neste trabalho foi empregada vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  para a eluição das amostras, que foi realizada com auxílio de um sistema de SPE.

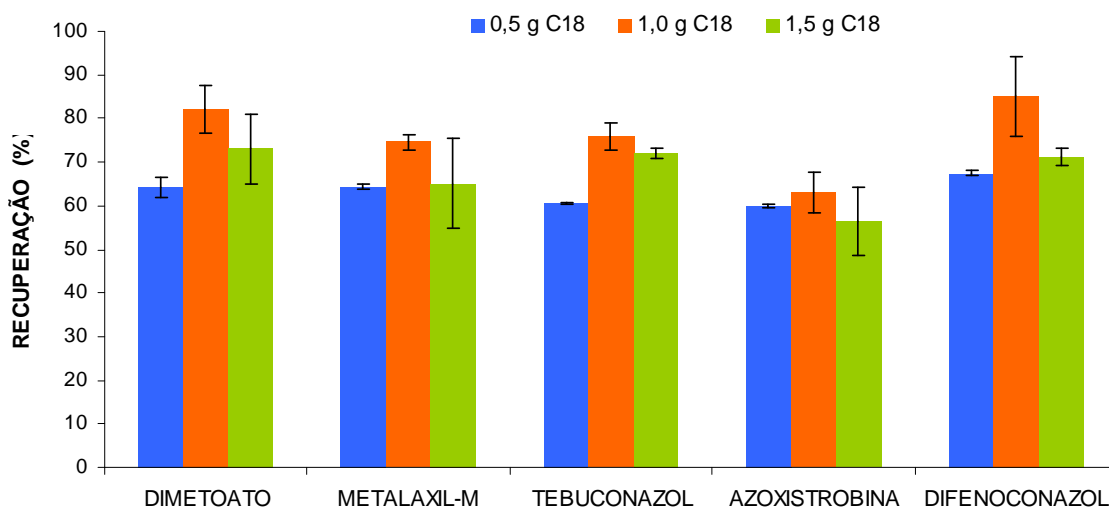
### 5.2.1 Razão amostra:C18

O teste para verificar a possibilidade de reutilizar resíduos de C18 foi satisfatório, uma vez que, o material não apresentou contaminação pelos compostos de interesse. Assim, C18 foi empregada para avaliar a proporção adequada entre a massa de amostra e de adsorvente para MSPD.

As quantidades de 1,0 e 1,5 g de C18 para 0,5 g de amostra apresentaram melhores resultados percentuais de recuperação (R%) com RSD menor que 20% para todos os compostos. Entretanto, para este trabalho foi escolhido 1,0 g de C18 por gerar menor gasto de material e maior facilidade de empacotamento da coluna de MSPD. Esta massa de adsorvente foi suficiente para promover a ruptura e a dispersão da amostra. Os valores de R% para diferentes massas de C18 testadas são apresentados na Figura 14, exceto para 2,0 g de C18 cujos resultados de R% e RSD foram insatisfatórios e logo desconsiderados no gráfico.

FERNANDEZ *et al.* (2000) encontraram bons resultados de recuperação para resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais, incluindo a cebola, empregando 0,5 g de C18 para 0,5 g de amostra em MSPD. Contudo, 1,0 g de C18 é viável sendo que

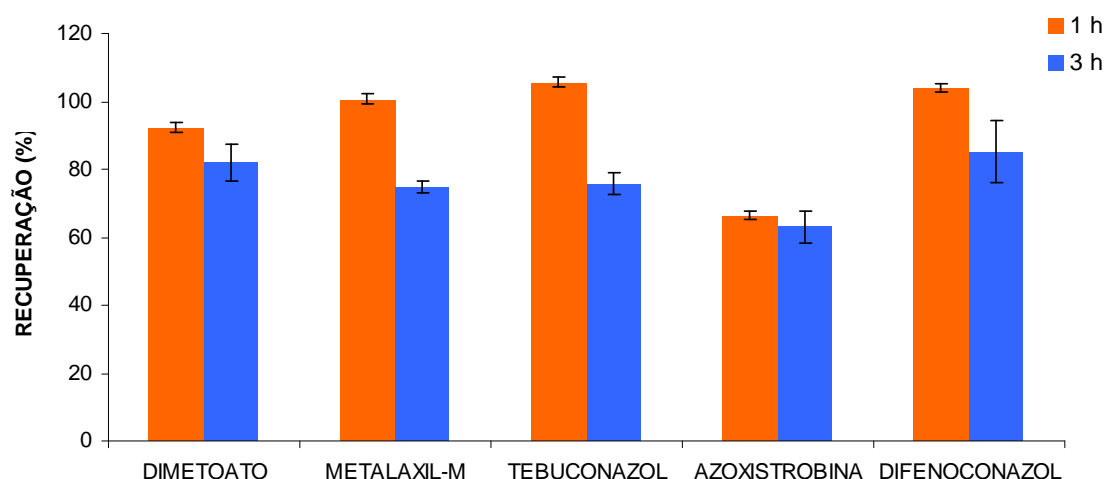
o método proposto neste trabalho emprega um material reutilizado e não necessita etapa de *clean-up* dos extratos de cebola.



**Figura 14 – Recuperações (%) dos agrotóxicos empregando diferentes massas de C18 para 0,5 g de amostra; 3 h de interação pós-fortificação (nível de 1,0 mg Kg<sup>-1</sup>); dispersão por 5 min e eluição com 10,0 mL de acetonitrila. As barras de erro indicam valores de RSD**

### 5.2.2 Tempo de interação após a etapa de fortificação

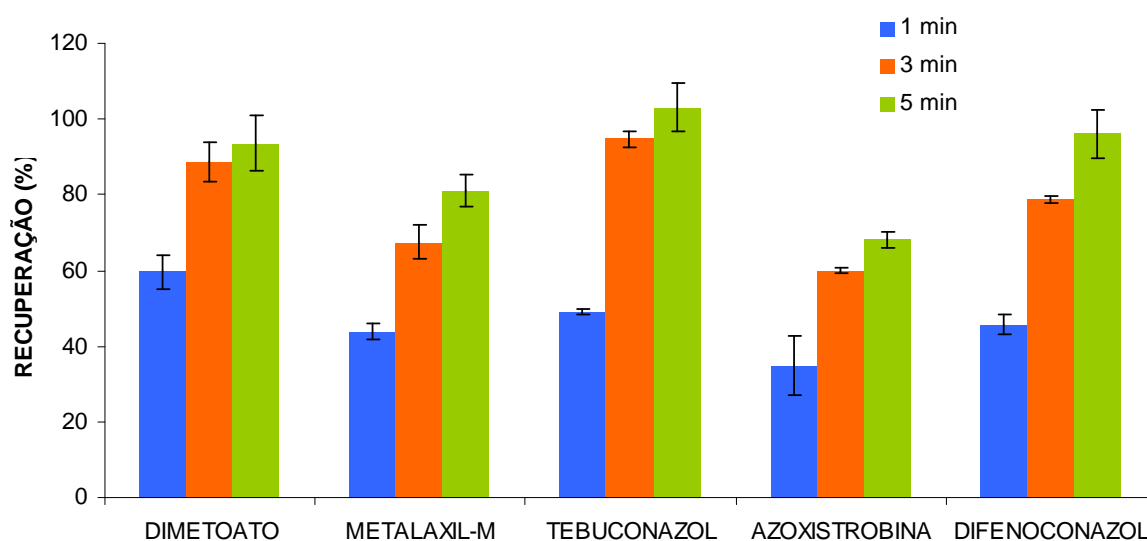
BLASCO *et al.* (2002) e PINHO *et al.* (2009) sugerem um tempo de interação após a etapa de fortificação de 3 h para extração de agrotóxicos em cebola e tomate por MSPD. Mas, como pode ser observado na Figura 15, 1 h de interação foi suficiente neste trabalho para gerar recuperações na faixa de 64,4% a 103,9% com RSD<20% para todos os compostos. BLASCO *et al.*, 2002 obteve recuperações de 42,0% a 73,0% para extração de fungicidas em amostras de cebola. Neste trabalho, o maior tempo de contato entre analitos e amostra resultou em recuperações mais baixas, porém aceitáveis para todos os analitos. Isto pode ser devido ao favorecimento de reações químicas de decomposição da matriz que podem interferir na recuperação dos agrotóxicos estudados. Dessa forma, foi escolhido 1 h como tempo de interação após a fortificação das amostras de cebola com a solução padrão dos agrotóxicos. Este tempo menor, além de gerar resultados mais elevados de recuperação tornou o processo de otimização da técnica de extração mais rápido.



**Figura 15 – Recuperações (%) dos agrotóxicos em diferentes tempos de interação após a etapa de fortificação (nível  $1,0 \text{ mg Kg}^{-1}$ ). As barras de erro indicam valores de RSD**

### 5.2.3 Tempo de dispersão da amostra com o adsorvente

Na otimização para verificar a possibilidade de reduzir o tempo de dispersão da amostra com o adsorvente, foi possível verificar que 5 min é o tempo necessário para que a nova fase formada após a etapa de dispersão seja completamente homogênea e a extração dos compostos seja eficiente. KRUIVE *et al.* (2008); FERNANDEZ-ALVAREZ *et al.* (2009) e ABHILASH *et al.* (2009) empregam 5 min como tempo de dispersão para extração de agrotóxicos de diferentes matrizes por MSPD. Os resultados de R% e RSD para os compostos em diferentes tempos de dispersão são apresentados na Figura 16. TORRES *et al.* (1996) e NAVARRO *et al.* (2002) obtiveram, utilizando 1 min para dispersão, recuperações de 42 a 101% e de 62 a 102% para extração de multirresíduos de agrotóxicos e fungicidas em frutas e vegetais por MSPD. Mas, neste trabalho a dispersão por 1 min gerou baixos valores de recuperação para todos os compostos. Com o tempo de 3 min as recuperações são melhores que com 1 min de dispersão, entretanto, a dispersão da amostra por 5 min gerou recuperações adequadas e mais elevadas (entre 68,2 e 126,2%) com  $\text{RSD} \leq 20\%$  para todos os compostos e por isso 5 min foi escolhido para dispersão da amostra. Tempos maiores que 5 min não foram testados, pois tornam o processo mais trabalhoso e demorado.



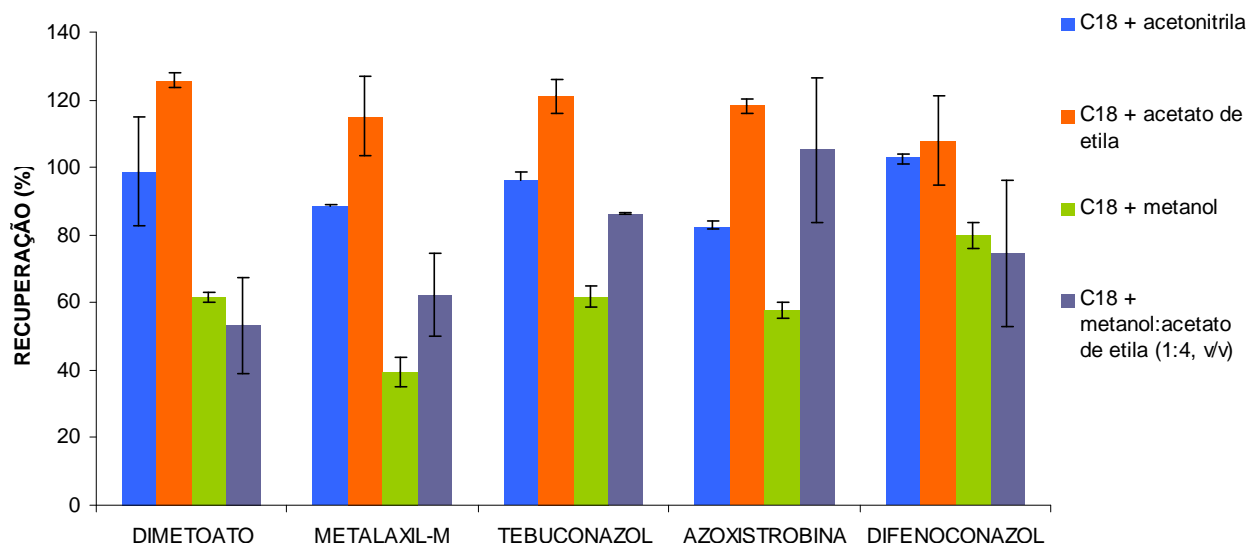
**Figura 16 - R% e RSD dos agrotóxicos em diferentes tempos de dispersão; 0,5 g de amostra; 1,0 g de C18; 1 h após a fortificação (nível de  $1,0 \text{ mg Kg}^{-1}$ ); eluição da coluna de MSPD com 10,0 mL de acetonitrila. As barras de erro indicam valores de RSD**

#### 5.2.4 Seleção do solvente de eluição

A Figura 17 apresenta os resultados de R% para os compostos com diferentes solventes de eluição. Foram testados solventes de diferentes polaridades para eluição dos agrotóxicos da coluna de MSPD, de acordo com as características dos analitos e da C18. Além disso, os solventes acetato de etila, acetonitrila e metanol são empregados em muitas aplicações de MSPD para extração de agrotóxicos em frutas e vegetais. Foi observado, de acordo com os valores de recuperação, que os solventes acetato de etila e acetonitrila apresentaram maior poder de eluição dos agrotóxicos. WANG *et al.* (2007) obtiveram bons resultados de recuperação para a extração de resíduos de fungicidas de frutas e vegetais utilizando os solventes acetato de etila e acetonitrila. A mistura metanol: acetato de etila na proporção (1:4, v/v) gerou resultado insatisfatório de recuperação para o composto dimetoato e quando empregado metanol puro, recuperação baixa foi observada para o composto metalaxil-M. Apesar dos resultados de R% para acetato de etila, entre 105,3 a 122,0%, terem sido maiores que com a acetonitrila, recuperações entre 84,2 e 108,1%, este último foi escolhido para o método por apresentar R% e RSD adequados para determinação de agrotóxicos em matrizes



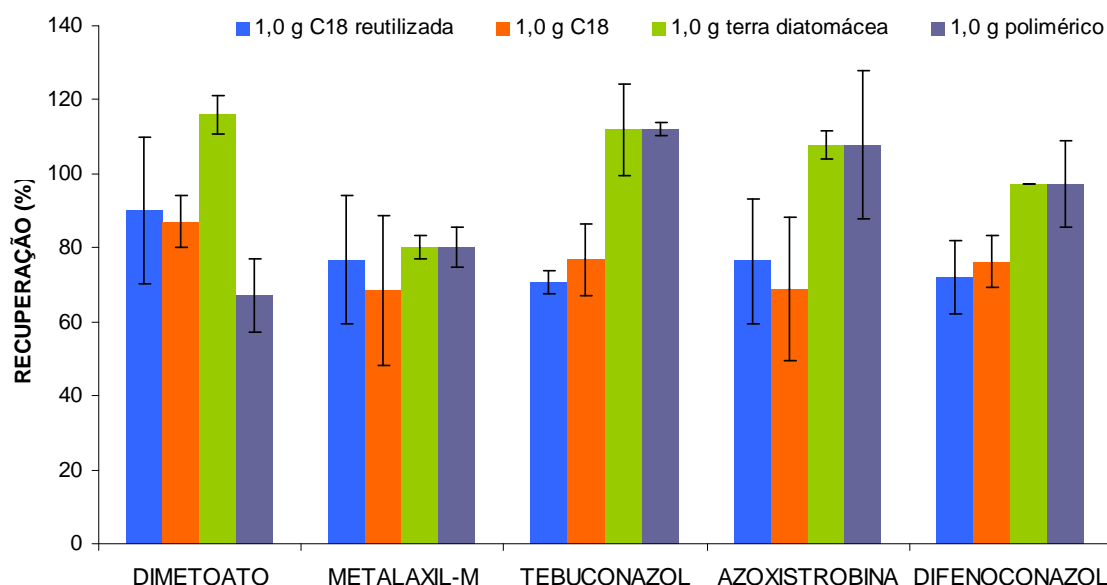
complexas e, ainda, devido à resolução cromatográfica ter sido melhor com acetonitrila do que com acetato de etila.



**Figura 17 - R% dos agrotóxicos empregando diferentes solventes de eluição; 0,5 g de amostra; 1,0 g de C18 reutilizada; 1 h após a fortificação (nível de 1,0 mg Kg<sup>-1</sup>); 5 min dispersão e 10,0 mL de solvente. As barras de erro indicam valores de RSD**

#### 5.2.5 C18 *versus* outros suportes sólidos

Os testes (Figura 18) mostraram que C18 apresenta resultados de recuperação tão bons quanto à C18 nova para todos os compostos e que a terra diatomácea apresentou melhores recuperações para todos os compostos em relação aos outros suportes sólidos. Contudo, C18 reutilizada foi escolhida para este método por ser um material reutilizado, não necessitando de nenhum tratamento antes da utilização. No entanto, os testes com terra diatomácea, C18 e material polimérico indicam que o método é robusto, pois possibilita empregar diferentes suportes sólidos, gerando R% aceitáveis para determinação de agrotóxicos em cebola. Isto torna o método facilmente aplicável em qualquer laboratório que disponha desses materiais e pretenda determinar agrotóxicos em amostras de cebola, como neste estudo.



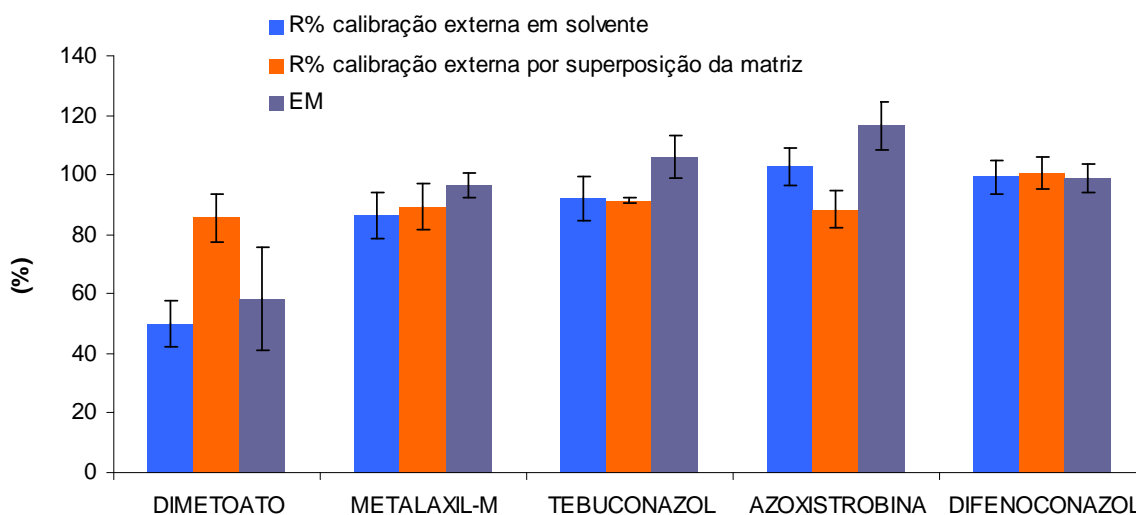
**Figura 18 - R% dos agrotóxicos por MSPD; 0,5 g de amostra + 1,0 g de suporte sólido, 1 h pós-fortificação (nível de  $1,0 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), 5 min de dispersão, eluição com 10,0 mL de acetonitrila. As barras de erro indicam valores de RSD**

#### 5.2.6 Efeito matriz empregando MSPD

A área do sinal gerado, pela injeção da solução padrão diluída com o extrato branco da matriz, foi comparada com a área do sinal gerado, pela injeção da solução padrão diluída com solvente. Os resultados de EM% iguais a 100% não indicam alteração na eficiência da ionização, enquanto que valores menores ou maiores que 100% indicam supressão ou enriquecimento da ionização pelos componentes da matriz. Na Figura 19 é possível observar os valores de EM% e R% (para diferentes formas de quantificação) para todos os compostos. O composto dimetoato apresentou EM% igual a 58,3% indicando que o composto sofre supressão da ionização, provavelmente pela presença de compostos de enxofre proveniente da amostra que eluem no mesmo tempo de retenção do analito e competem com o composto durante o processo de ionização. Para o agrotóxico azoxistrobina ocorreu enriquecimento da ionização sendo que o EM% foi 116,5%. Para os outros analitos não foi observado efeito matriz significativo.

Devido ao EM% acentuado para dimetoato e azoxistrobina a quantificação dos agrotóxicos para fins de recuperação foi realizada com superposição da matriz. É importante ressaltar que o efeito de matriz quando se trabalha com matrizes complexas já é esperado e por isso muitos métodos empregam a etapa de *clean-up*

em MSPD. Neste trabalho foi preferido não usar etapa de *clean-up*, uma vez que, o EM% é compensado quando a quantificação é realizada por superposição da matriz. Além disso, uma etapa a mais no processo só aumentaria o gasto com materiais, com solventes e o tempo de preparo da amostra.



**Figura 19 – Recuperações (%) para diferentes formas de quantificação e valores de EM% para todos os compostos empregando MSPD. As barras de erro indicam valores de RSD. As barras de erro indicam valores de RSD**

#### 5.2.7 Procedimento para MSPD otimizado

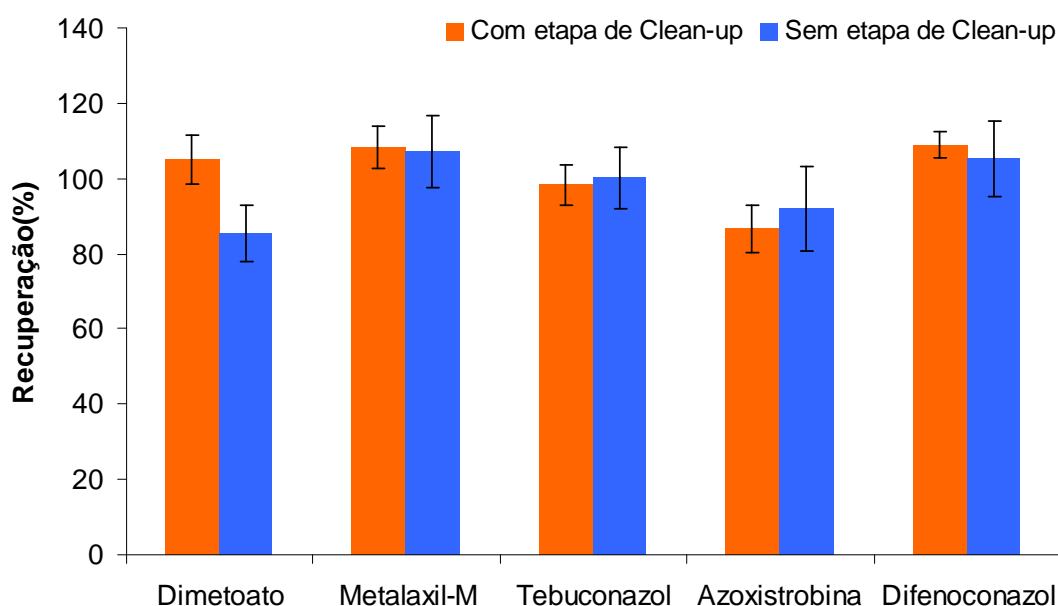
No procedimento para MSPD otimizado (Figura 20) 0,5 g de amostra, previamente homogeneizada em um processador de alimentos, foi fortificada com um volume conhecido de solução padrão trabalho com a mistura dos cinco agrotóxicos. A amostra fortificada ficou à temperatura ambiente por 1 h para proporcionar interação dos analitos com a matriz e a evaporação do solvente. Logo, foi adicionado 1,0 g de C18 à amostra fortificada e realizada a etapa de dispersão por 5 min. A nova fase formada foi transferida para a coluna de MSPD (tubo vazio de SPE) e eluída com 10,0 mL de acetonitrila. Uma alíquota do extrato final foi retirada para injeção no sistema cromatográfico.



### 5.3 Otimização do procedimento QuEChERS modificado

#### 5.3.1 Avaliação da influência da etapa de *clean-up* na exatidão do método

De acordo com os resultados percentuais de recuperação (R%) apresentados na Figura 21 é possível verificar que os valores de recuperação foram similares para a maioria dos compostos estudados empregando ou não a etapa de *clean-up*. Para o método com etapa de *clean-up* recuperações na faixa de 86,7 e 108,9% foram apresentadas e quando etapa de *clean-up* não foi empregada recuperações na faixa de 85,4 e 107,1% foram alcançadas. Considerando que as possíveis interferências da matriz são compensadas pelo emprego de calibração externa por superposição da matriz, neste trabalho foi estabelecido o desenvolvimento do processo sem etapa de *clean-up* para tornar o procedimento de preparo da amostra ainda mais rápido e diminuir o consumo de reagentes.

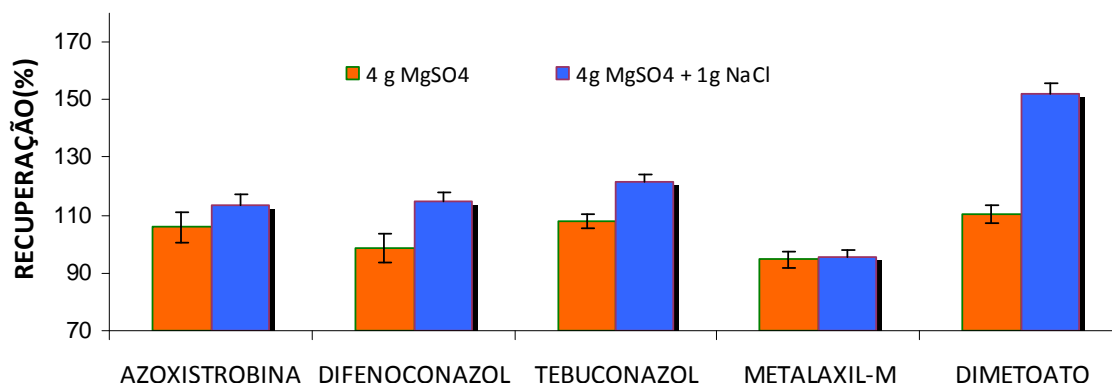


**Figura 21 - Comparação entre o método QuEChERS modificado, no nível de  $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ , com e sem emprego da etapa de *clean-up*. As barras de erro indicam valores de RSD**

### 5.3.2 Influência da adição NaCl na recuperação dos compostos

Na Figura 22 os resultados percentuais de recuperação indicam que a adição de cloreto de sódio em combinação ao sulfato de magnésio, como empregado por ANASTASSIADES *et al.* (2003) e LEUSUEUR *et al.* (2008), gera maiores recuperações para a maioria dos compostos em relação a adição de apenas  $\text{MgSO}_4$ . Entretanto, para o composto dimetoato o valor de recuperação não é aceitável para determinação de compostos traços em matrizes complexas e, além disso,  $\text{MgSO}_4$  quando empregado sozinho é suficiente para gerar resultados de recuperação adequados para todos os compostos. O valor elevado de recuperação do composto dimetoato pode ser explicado pelo fato de que o sal além de favorecer a recuperação dos analitos, também aumenta a co-extração de componentes da matriz (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

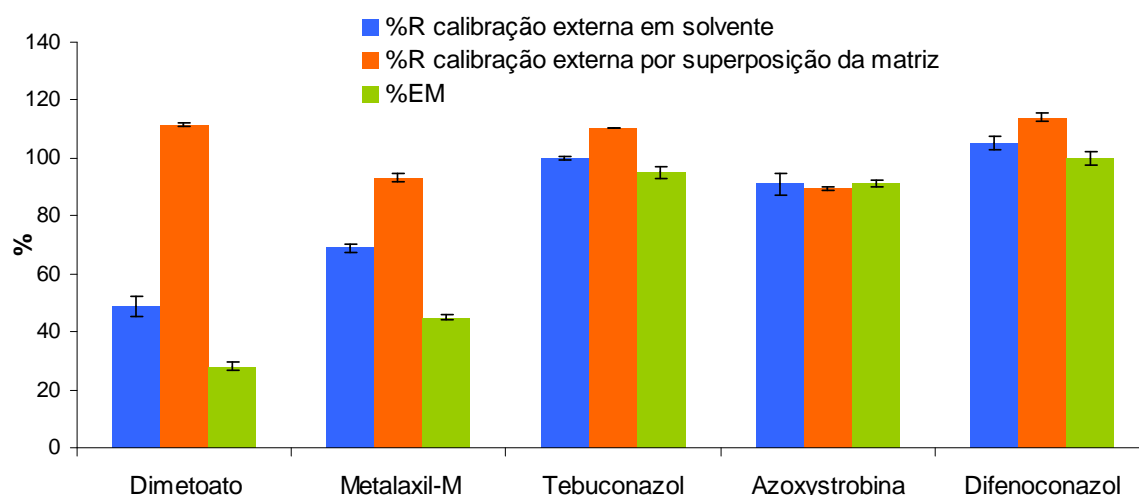
Assim, somente a adição de sulfato de magnésio foi utilizada para o método aplicado neste trabalho. O  $\text{MgSO}_4$  possui alta capacidade de remover água quando comparado a outros sais, ideal para amostras como a cebola que possui aproximadamente 90% de água em sua composição (EMBRAPA - Sistema de produção de cebola, 2004).



**Figura 22 - Valores de Recuperação (%) e RSD para os compostos em relação aos reagentes adicionados no processo de extração. As barras de erro indicam valores de RSD**

### 5.3.3 Efeito Matriz empregando QuEChERS modificado

Assim, como para o método empregando MSPD, no método QuEChERS modificado foi verificada influência significativa da matriz para o composto dimetoato. Essa influência foi mais pronunciada empregando este método, sendo, provavelmente resultado da maior massa de amostra utilizada para extração. A maior massa de amostra promove maior extração de componentes com características semelhantes ao analito, havendo eluição no mesmo tempo de retenção e interferência na ionização do composto. Devido a interferência dos componentes da matriz na ionização dos compostos (Figura 23) a quantificação dos agrotóxicos foi realizada através de superposição da matriz. A Figura 23 além do EM% apresenta a comparação das recuperações dos agrotóxicos em diferentes formas de quantificação.



**Figura 23 - Comparação entre as recuperações dos compostos por QuEChERS, nível de fortificação 1,0 mg kg<sup>-1</sup>, empregando diferentes formas de quantificação e EM% para todos os compostos**

#### 5.3.4 Procedimento QuEChERS otimizado

Na Tabela 10 são apresentadas as condições otimizadas para o método QuEChERS modificado neste trabalho. Na Tabela 10 também é possível observar as diferenças entre as metodologias empregadas por ANASTASSIADES *et al.* (2003); LEUSUEUR *et al.* (2008) e neste trabalho. De acordo com estes dados é possível afirmar que o método empregado neste trabalho utiliza menor quantidade de reagentes e apresenta maior rapidez no procedimento de extração, com relação ao método de LESUEUR *et al.* no qual o procedimento empregado neste trabalho foi baseado. A Figura 24 apresenta as etapas envolvidas no procedimento para o método QuEChERS modificado utilizado neste trabalho.

**Tabela 10 - Metodologias empregadas no método QuEChERS original, no método de Lesueur e colaboradores e no método utilizado neste trabalho**

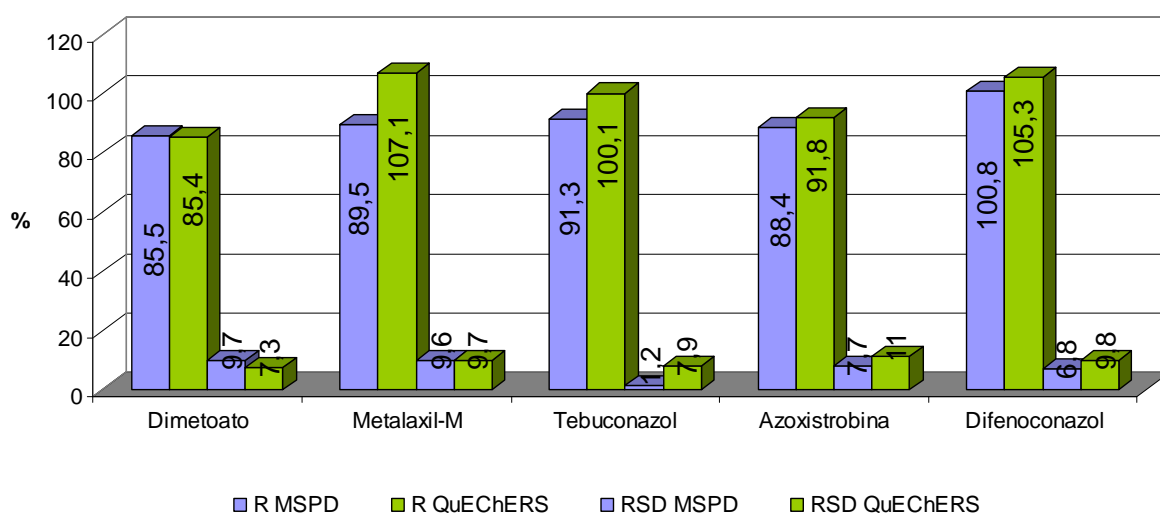
QuEChERS	Anastassiades et al., 2003	Lesueur <i>et al.</i> , 2008	Este trabalho
Amostra	10,0 g	10,0 g	10,0 g
Acetonitrila	10,0 mL	10,0 mL	10,0 mL
Agitação	60 s	60 s	60 s
MgSO <sub>4</sub>	4,0 g	4,0 g	4,0 g
NaCl	1,0 g	1,0 g	—
Citrato de sódio	—	1,0 g	—
Hcitrato de sódio	—	0,5 g	—
Agitação	60 s	60 s	60 s
Padrão interno	Trifenilfosfato	Trifenilfosfato	—
Agitação	30 s	—	—
Centrifugação	5 min 5000 rpm	3 min 5000 rpm	3 min 5000 rpm
Alíquota do extrato	1,0 mL	6,0 mL	—
PSA	25,0 mg	150,0 mg	—
MgSO <sub>4</sub>	150,0 mg	950,0 mg	—
Centrifugação	1 min 6000 rpm	3 min 5000 rpm	—
Análise	GC/MS	HPLC/MS GC/MS	LC-MS/MS





#### 5.4 MSPD versus QuEChERS modificado

A Figura 25 compara os resultados de recuperação e desvio padrão relativo para os compostos estudados em relação aos métodos empregando MSPD e QuEChERS modificado, no nível de fortificação de  $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ . A quantificação dos agrotóxicos foi realizada com superposição na matriz para ambos os métodos. Boas R% e RSD < 20% foram alcançados para todos os compostos empregando os dois métodos. O método QuEChERS apresentou recuperações superiores para a maioria dos analitos.



**Figura 25 - Recuperações (R%) e RSD (RSD%), nível de fortificação 1,0 mg kg<sup>-1</sup>, para os métodos empregando MSPD e QuEChERS modificado.**

A Tabela 11 relaciona as principais diferenças entre os procedimentos de extração empregados. O método QuEChERS utiliza maior quantidade de amostra, 20 vezes mais que MSPD. Mas, o processo de extração é aproximadamente 3 vezes mais rápido. Os valores médios de R% e RSD% para os métodos são adequados para determinação de elementos traços em amostras de cebola.

A técnica de MSPD apresentou alta robustez durante o processo de otimização, uma vez que, pequenas variações nos resultados de R% foram observadas para a maioria dos compostos ao empregar alterações significativas no procedimento de extração como a quantidade de C18, diferentes tempos de interação após a fortificação, diferentes solventes de eluição e diferentes suportes sólidos.

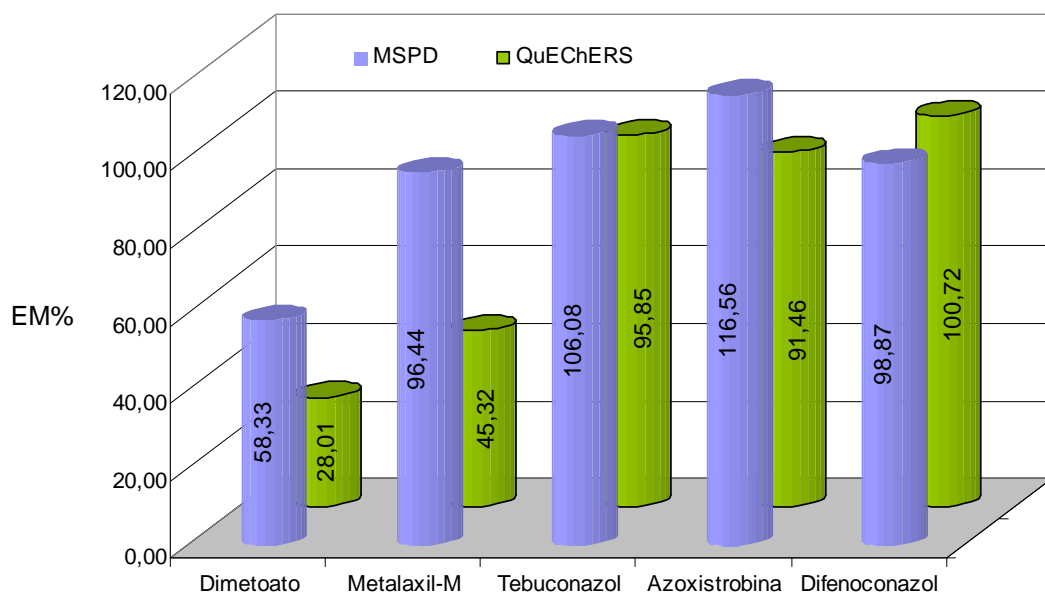
O método QuEChERS modificado foi robusto, apresentou pequena variação nos valores de exatidão quando empregada ou não a etapa de *clean-up* e, com e sem a adição de NaCl. Além disso, foi reprodutível pois resultados adequados foram alcançados empregando o procedimento similar ao descrito por LEUSUEUR e colaboradores em 2008 no LACOM (INMETRO, 2003; HEYDEN *et al.*, 2006).

**Tabela 11 - Principais diferenças dos métodos empregando MSPD e QuEChERS**

<b>Parâmetros</b>	<b>QuEChERS</b>	<b>MSPD</b>
Massa de amostra (g)	10,0	0,5
Volume de solvente (mL)	10,0	10,0
Tempo de extração (min)	10	30
Recuperação (%)	61,8 – 120,6	78,3 – 120,3
RSD (%)	2,0 – 20,3	1,0 – 20,7
LOQm (mg kg <sup>-1</sup> )	0,0005 – 0,05	0,01 – 0,1
LODm (mg kg <sup>-1</sup> )	0,00015 – 0,015	0,003 – 0,03

Com relação ao efeito matriz, de acordo com a Figura 26, é possível avaliar que o método utilizando QuEChERS apresenta maior efeito matriz que o método empregando MSPD. Esse fato se deve a maior quantidade de amostra necessária para extração com 10,0 mL de solvente, sendo uma relação de 1,0 g de amostra para 1,0 mL de solvente ao contrário de MSPD onde 0,5 g de amostra é extraída com 10,0 mL de solvente. Assim, maior influência dos componentes da matriz é observada.

Os dois métodos apresentam forte supressão da ionização para o composto dimetoato, porém ao empregar QuEChERS modificado a supressão é aproximadamente duas vezes maior. Para o composto metalaxil-M praticamente não se observa efeito matriz por MSPD, em contrapartida, com QuEChERS modificado o efeito matriz é acentuado (aproximadamente 50%). O agrotóxico azoxistrobina quando empregando MSPD apresenta enriquecimento da ionização, influência menos acentuada que no caso dos compostos dimetoato e metalaxil-M. Para os outros compostos o efeito de matriz não é observado, uma vez que, uma variação de 10% não remete a uma afirmação segura sobre a influência do efeito matriz.



**Figura 26 - Avaliação do efeito matriz para o método empregando MSPD e para o método empregando QuEChERS modificado**

## 5.5 Validação dos métodos

### 5.5.1 Curva analítica e linearidade

Os parâmetros de linearidade obtidos através de calibração externa e superposição da matriz para os métodos empregando MSPD e QuEChERS estão apresentados nas Tabelas 12 e 13.

**Tabela 12 - Resultados obtidos para calibração dos agrotóxicos, empregando MSPD, no sistema LC-ESI-MS/MS**

Agrotóxicos	Curva analítica no solvente	$r$	Curva analítica na matriz	$r$
Dimetoato	$y = 10214 x + 23,0954$	0,998	$y = 7951,9 x - 3,59037$	0,997
Metalaxil-M	$y = 65600,4 x + 68,2511$	0,996	$y = 67411,2 x + 88,9374$	0,994
Tebuconazol	$y = 76510,6 x + 33,9778$	0,999	$y = 83143 x + 43,0249$	0,999
Azoxistrobina	$y = 193675 x + 26,4087$	0,998	$y = 194101 x + 84,8929$	0,997
Difenoconazol	$y = 60559,6 x + 106,035$	0,998	$y = 62332,2 x + 48,9934$	0,998

**Tabela 13 - Resultados obtidos para calibração dos agrotóxicos, empregando QuEChERS, no sistema LC-ESI-MS/MS**

Agrotóxicos	Curva analítica no solvente	$r$	Curva analítica na matriz	$r$
Dimetoato	$y = 29306,7 x + 12,247$	0,998	$y = 7951,9 x + 3,59037$	0,997
Metalaxil-M	$y = 106839 x + 49,0445$	0,993	$y = 43794,5 x - 9,50831$	0,998
Tebuconazol	$y = 174947 x + 68,5335$	0,999	$y = 159082 x + 409,68$	0,996
Azoxistrobina	$y = 218045 x + 223,502$	0,991	$y = 124042 x + 19,2466$	0,999
Difenoconazol	$y = 130623 x + 17,9105$	0,999	$y = 124487 x + 183,681$	0,997

Através dos dados obtidos para a construção das curvas analíticas, e análise das equações das retas no LC-ESI-MS/MS é possível concluir que o modelo de regressão linear é adequado para as determinações analíticas em estudo. Os coeficientes de correlação ( $r$ ) foram maiores que 0,99, estando de acordo com as orientações da ANVISA e do INMETRO que recomendam  $r$  igual a 0,99 e acima de 0,90, respectivamente.

#### 5.5.2 Limites de detecção e limites de quantificação

Na Tabela 14 são apresentados os limites de detecção ( $LOD_i$ ) e quantificação ( $LOQ_i$ ) do instrumento, apresentados em  $mg L^{-1}$ , e os limites de detecção ( $LOD_m$ ) e

quantificação ( $LOQ_m$ ) dos métodos, apresentados em  $mg\ kg^{-1}$ , para os agrotóxicos estudados.

**Tabela 14 - Limites de detecção e quantificação instrumental ( $mg\ L^{-1}$ ) e dos métodos ( $mg\ Kg^{-1}$ )**

Agrotóxico	$LOD_i$	$LOQ_i$	$LOD_m$	$LOQ_m$	$LOD_m$	$LOQ_m$
			MSPD		QuEChERS	
Dimetoato	0,0016	0,005	0,033	0,1	0,016	0,05
Metalaxil-M	0,0016	0,005	0,033	0,1	0,0016	0,005
Tebuconazol	0,00016	0,0005	0,0033	0,01	0,00016	0,0005
Azoxistrobina	0,00016	0,0005	0,0033	0,01	0,00016	0,0005
Difenoconazol	0,00016	0,0005	0,0033	0,01	0,00016	0,0005

Os limites de quantificação dos métodos empregando MSPD e QuEChERS modificado alcançam valores menores que os limites máximos de resíduos estabelecidos pela legislação brasileira (ANVISA) para os compostos metalaxil-M, tebuconazol, azoxistrobina e difenoconazol, Tabela 5. Para o agrotóxico dimetoato não há LMR estabelecido para cultura de cebola. O *CODEX ALIMENTARIUS* e a UNIÃO EUROPÉIA não indicam limites máximos de resíduos para estes compostos em cebola.

No método empregando QuEChERS os limites de quantificação foram menores que no método empregando MSPD. Esse fato é devido a maior massa de amostra empregada para o procedimento QuEChERS com relação à MSPD. Onde, no primeiro, a razão de amostra: acetonitrila é 1:1 (m,v) e no segundo a razão é 1:20 (m,v).

### 5.5.3 Exatidão

De acordo com RIBANI e colaboradores, 2004, os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método analítico são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão. Neste trabalho a exatidão foi avaliada em função dos ensaios de recuperação.

Para os ensaios de recuperação diferentes níveis de concentração do analito foram empregados, já que a eficiência do método pode variar em função da quantidade da substância adicionada. O processo de extração dos analitos foi realizado por dispersão da matriz em fase sólida e pelo método QuEChERS modificado.

A literatura para a validação de métodos cromatográficos, indica que os intervalos de recuperação aceitáveis para determinação de resíduos devem estar entre 70 e 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$  (BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004, CALDAS, 2009). A recuperação é dependente da matriz, do procedimento de extração e da concentração do analito (GONÇALVES, 2007; KURZ, 2007).

Os ensaios de recuperação foram realizados de acordo com o item 4.7.4 e os valores de recuperação e de RSD para as determinações por MSPD e QuEChERS são apresentados nas Tabelas 15 e 16, respectivamente. Os valores de recuperação e RSD para ambos os métodos foram adequados para determinação dos agrotóxicos em cebola.

#### 5.5.4 Precisão

Foi determinada a precisão instrumental e do método. A primeira foi avaliada a partir de injeções sucessivas de solução analítica padrão na concentração de  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  ( $n=7$ ). Os valores de RSD% das áreas de todas as injeções foram: 10,5% para dimetoato, 6,7% para matalaxil-M; 7,8% para tebuconazol; 6,4% para azoxistrobina e 5,3% para difenoconazol.

A precisão dos métodos empregando MSPD e QuEChERS modificado foi avaliada em função da repetibilidade e da precisão intermediária, estimadas de acordo com as recomendações da ANVISA. Os valores de RSD% para os estudos de repetibilidade ( $RSD_r$ ) e precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ) ficaram na faixa de 1,2 - 17,1% e 1,0 - 20,0% para o método empregando MSPD e, na faixa de 3,3 - 20,0% e 2,0 - 20,0% para o método empregando QuEChERS. Os valores mais detalhados de  $RSD_r$  e  $RSD_{pi}$  são apresentados juntamente aos resultados de recuperação, nas Tabelas 15 e 16.

Para o composto dimetoato os valores de  $RSD_r$  e  $RSD_{pi}$  foram estimados a partir de dois níveis de concentração para ambos os métodos. Isto porque este

agrotóxico apresentou menor sensibilidade no sistema LC-ESI-MS/MS com relação aos outros compostos, apresentando limite de quantificação mais elevado que os outros analitos. Para metalaxil-M os valores são resultados de dois níveis de fortificação para MSPD e três níveis de fortificação para QuEChERS. Os demais compostos tiveram a precisão do método avaliada em três níveis de fortificação para o método empregando MSPD e quatro níveis para o método empregando QuEChERS modificado.

A precisão instrumental e a precisão dos métodos foram adequadas para métodos que quantificam elementos traços em matrizes complexas, uma vez que, apresentaram valores de  $RSD < 20\%$  (RIBANI *et.al.*, 2004).

**Tabela 15 - Recuperação,  $RSD_r$  e  $RSD_{pi}$  do método empregando MSPD e LC-ESI-MS/MS para os agrotóxicos em amostras de cebola fortificadas em diferentes níveis**

AGROTÓXICO	Nível de fortificação (mg kg <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	$RSD_r$ (%)	Recuperação (%)	$RSD_{pi}$ (%)
Dimetoato	0,01	-	-	-	-
	0,10	120,4	8,3	88,5	9,8
	1,00	85,5	9,6	93,8	10,1
Metalaxil-M	0,01	-	-	-	-
	0,10	106,4	3,8	78,7	3,8
	1,00	89,4	9,5	86,9	3,9
Tebuconazol	0,01	78,3	17,1	115,5	20,0
	0,10	118,4	12,6	88,2	6,7
	1,00	91,3	1,2	97,2	6,2
Azoxistrobina	0,01	83,3	5,3	98,4	20,0
	0,10	97,1	5,6	82,7	1,0
	1,00	88,4	4,3	88,3	3,2
Difenoconazol	0,01	90,2	7,3	120,2	13,5
	0,10	120,3	5,3	80,1	5,0
	1,00	100,8	6,7	93,6	12,5



**Tabela 16 - Recuperação, RSD<sub>r</sub> e RSD<sub>pi</sub> do método empregando QuEChERS e LC-ESI-MS/MS para os agrotóxicos em amostras de cebola fortificadas em diferentes níveis**

<b>AGROTÓXICO</b>	<b>Nível de fortificação (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>RSD<sub>pi</sub> (%)</b>
Dimetoato	0,0005	-	-	-	-
	0,005	-	-	-	-
	0,05	92,3	6,9	116,7	7,7
	1,0	85,3	7,3	111,3	4,2
Metalaxil-M	0,0005	-	-	-	-
	0,005	97,6	19,4	93,8	16,4
	0,05	81,4	6,4	96,3	7,3
	1,0	107,1	9,7	93,0	4,0
Tebuconazol	0,0005	107,0	7,2	96,8	8,5
	0,005	86,1	9,0	61,8	14,3
	0,05	98,7	3,6	103,8	2,7
	1,0	100,1	7,9	110,3	2,0
Azoxistrobina	0,0005	65,2	20,0	86,7	20,0
	0,005	109,8	10,4	83,3	6,3
	0,05	87,4	9,0	90,7	3,8
	1,0	91,8	11,0	89,6	3,7
Difenoconazol	0,0005	115,2	12,7	108,2	17,6
	0,005	120,6	11,1	75,4	11,4
	0,05	104,1	3,3	108,5	4,1
	1,0	105,3	9,8	114,1	3,7

## 5.6 Aplicabilidade

O método empregando MSPD e LC-ESI-MS/MS, após ser validado, foi aplicado para determinação de resíduos dos agrotóxicos dimetoato, metalaxil-M, tebuconazol, azoxistrobina e difenoconazol. As amostras de cebola foram coletadas de um supermercado e de uma propriedade rural na região, resíduos de agrotóxicos não foram encontrados.

## 6 Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que os métodos empregando MSPD, QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação dos agrotóxicos dimetoato, metalaxil-M, tebuconazol, azoxistrobina e difenoconazol em cebola são eficientes, rápidos, precisos e exatos.

A técnica de dispersão da matriz em fase sólida apresentou alta robustez, com pequenas variações nos resultados de recuperações e desvio padrão relativo, quando realizadas alterações nas condições de extração. Resultados adequados foram alcançados empregando diferentes quantidades de C18, diferentes tempos de interação após a etapa de fortificação, diferentes solventes de eluição e diferentes suportes sólidos.

A extração por MSPD foi eficiente para todos os agrotóxicos selecionados empregando pequena quantidade de amostra e pouco volume de solvente orgânico. O baixo custo da técnica de extração foi decorrente principalmente da reutilização de cartuchos de SPE utilizados para extração de agrotóxicos em água no LACOM. A reutilização de C18 como adsorvente em MSPD proporcionou recuperações entre 78,3 e 120,4% e RSD<20% para todos os compostos sem a necessidade de tratamento prévio do material.

O método QuEChERS modificado foi robusto e altamente reprodutível, uma vez que, elevadas recuperações foram alcançadas empregando o procedimento adotado por LESUEUR *et al.* (2008) neste estudo. Além disso, o procedimento de extração é extremamente rápido e o analista tem pouco contato com solvente de extração através da utilização do dispensador de solvente.

MSPD e QuEChERS modificado não necessitaram emprego da etapa de *clean-up* para purificação dos extratos de cebola e, este fato é devido principalmente às características da matriz, composta por aproximadamente 90% de água.

Entretanto, os componentes da matriz afetaram a eficiência da ionização de alguns analitos por LC-ESI-MS/MS, o que evidencia a importância de estudar o efeito matriz pelos diferentes procedimentos de extração empregados ao se trabalhar com determinação de agrotóxicos em amostras de alimentos. Neste estudo, a influência do efeito matriz para compostos como dimetoato, metalaxil-M e azoxistrobina definiu o modo de quantificação dos compostos por calibração externa através da superposição da matriz.

A determinação dos agrotóxicos por LC-ESI-MS/MS foi satisfatória, permitindo a realização de uma análise qualitativa, obtida a partir de fragmentos de massa característicos de cada analito, e quantitativa, através do modo de aquisição MRM. As condições cromatográficas otimizadas para determinação por LC-ESI-MS/MS permitiram a identificação e quantificação dos compostos em estudo, em um tempo de análise menor que 6 min.

Na validação dos métodos foram obtidos resultados adequados. As curvas analíticas apresentaram valores de  $r$  maiores que 0,99 para as faixas de concentração necessárias às aplicações. Os valores médios de recuperação obtidos em diferentes níveis de fortificação estiveram na faixa de 78,3 a 120,4% para MSPD e 61,8 a 120,6% para QuEChERS, os valores de RSD% foram menores que 20% em ambos os procedimentos. Os limites de quantificação dos métodos variaram na faixa de 0,01 a 0,1 mg kg<sup>-1</sup> e 0,0005 a 0,05 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

O limite de quantificação dos métodos para todos os compostos foi menor que os limites máximos de resíduos definidos pela legislação brasileira, ANVISA, para estes compostos em cebola. Este fato é de suma importância, uma vez que, o Brasil em 2008 assumiu a liderança mundial no consumo de agrotóxicos segundo dados do SINDAG e, o PARA (Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos) em 2008 incluiu a cebola em seu programa de monitoramento.

O método empregando MSPD e LC-ESI-MS/MS após validado foi aplicado em amostras de cebola coletadas em supermercados de Rio Grande e resíduos dos agrotóxicos estudados não foram encontrados.

## **7 Sugestões para trabalhos futuros**

- Aplicação dos métodos validados para monitoramento de identificação e quantificação de resíduos de agrotóxicos presentes na cebola produzida no município de Rio Grande e região;
- Otimização e validação de métodos para determinação de resíduos de agrotóxicos em diferentes qualidades de cebola;

## **8 Tratamento de resíduos gerados**

Os resíduos de MSPD, QuEChERS modificado e os solventes utilizados durante o estudo foram coletados, separados em frascos, rotulados e armazenados adequadamente aguardando procedimento a ser adotado pela instituição. Além disso, estão sendo desenvolvidos e otimizados em conjunto com outro laboratório processos oxidativos para a degradação dos resíduos de agrotóxicos gerados no laboratório.

## 9 Referências bibliográficas

- ABHILASH, C.P., *et al.* Matrix solid-phase dispersion extraction versus solid-phase extraction in the analysis of combined residues of hexachlorocyclohexane isomers in plant matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1176, p. 43-47, 2007.
- ABHILASH, C.P., *et al.* Simplified determination of combined residues of lindane and other HCH isomers in vegetables, fruits, wheat, pulses and medicinal plants by matrix solid-phase dispersion (MSPD) followed by GC–ECD. **Food Chemistry**, v. 113, p. 267–271, 2009.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". *Resolução RE nº 899*, de 29/05/2003  
ANVISA. **Monografias de Produtos Agrotóxicos**. Brasília. 2009. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)
- FERNANDEZ-ALVAREZ, M., *et al.* Development of a matrix solid-phase dispersion method for the simultaneous determination of pyrethroid and organochlorinated pesticides in cattle feed. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2832-2842, 2009.
- 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. 412-431, 2003.
- ARDREY, R.E. **Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction**. England: John Wiley & Sons Ltd, 2003. 276 p.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622 p.
- BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004. 215 p.
- BARKER, S.A. Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD). **Journal of Chromatography A**, v. 885, p.115–127, 2000.
- BARKER, S.A. Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD). **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p.151-162, 2007.
- BLASCO, C. *et al.* Determination of fungicide residues in fruits and vegetables by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization q mass spectrometry. **Journal Chromatography A**, v. 947, p. 227-235, 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.
- BOGIALLI, S., Corcia, A.D. Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting contaminants from foodstuffs . **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 163–179, 2007.

BOFF, P., *et al.* Qualidade e sanidade de mudas de cebola em função da adição de composto termófilo. **Horticultura Brasileira**, v. 23, p. 875-880, 2005.

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](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm). Acesso em 21 set 2007.

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.

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. 120 p. 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.

CODEX ALIMENTARIUS- **Codex Alimentarius Commission on Methods of Analysys and Sampling**. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net>. Acesso em 29 out. 2009.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 456 p.

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

CHUANG, J. C., *et al.* **Evaluation of analytical methods for determining pesticides in baby foods and adult duplicate-diet samples**. **Analytica Chimica Acta**, v. 444, p. 87–95, 2001.

DEMOLINER, A., **Otimização e Validação de Metodologia Analítica Empregando SPE e LC-ESI-MS/MS para Determinação de Multiclasses de Agrotóxicos e Metabólitos em Água de Superfície e Abastecimento**. 2008. 84 p. Dissertação (Mestrado em Química) - FURG, Rio Grande, RS.

DINI, I., *et al.* Chemical composition, nutritional value and antioxidant roperties of *Allium caepa* L. Var. *tropeana* (red onion) seeds . **Food Chemistry**, v. 107, p. 613–621, 2008.

DÓREA, H.S.; LOPES, G.W. Aplicação da Técnica de Dispersão da Matriz em Fase Sólida (DMFS) na Análise de Pesticidas em Quiabo por CG-EM. **Química Nova**, v.27, p. 892-896, 2004.

EECKHAUT, V.A., *et al.* Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2198–2207, 2009.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Sistema de Produção de Cebola**. Versão Eletrônica, DEZ./2004. Disponível em: [http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/cebola/caracteristicas\\_nutricionais.htm](http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/cebola/caracteristicas_nutricionais.htm). Acesso em 29 out. 2009.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Cultivo de cebola no Nordeste**. Versão Eletrônica, Nov./2007 Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cebola/CultivoCebolaNordeste/socioeconomia.htm>. Acesso em 29 out. 2009.

ECONOMOU, A., *et al.* Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5856-5867, 2009

EUROPA – **O portal da União Européia**. Disponível em: [http://europa.eu/index\\_pt.htm](http://europa.eu/index_pt.htm). Acesso em 29 out.2009.

FAO – **Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação**. Disponível em: <https://www.fao.org/b/>. Acesso em 04 nov.2009.

FAO – **Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação**. Summary of world food and agricultural statistics 2004. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/379/DesktopDefault.aspx?PageID=379>. Acesso em 10 dez.2009.

FERNANDÉZ, M., *et al.* Determination of carbamate residues in fruits and vegetables by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–mass Spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 871, p. 43-46, 2000.

FERNANDEZ-ALBA, A. **Chromatographic-mass spectrometric food analysis for the trace determination of pesticides residues**. In. Comprehensive analytical chemistry. The Netherlands: Elsevier. 2005, 287 p.

FIGUEIRA, F., *et al.* Novo manual de olericultura; Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. **Horticultura Brasileira**, 2 ed. Viçosa: UFV, 2003. p.412.

FILHO, A.M., *et al.* Development of MSPD Method for the Determination of Pesticide Residues in Tomato by GC-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Vol. 17, No. 5, 874-879, 2006.

FILHO, J.A.W., *et al.* Aplicação foliar de tratamentos para o controle do míldio e da podridãode-escamas de bulbos de cebola. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 544-549, 2007.

GARCIA-LOPEZ, M., *et al.* Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v, 391, p.963–974, 2008.



GARCÍA-VALCÁRCEL, A.I., TADEO, J.L. A combination of ultrasonic assisted extraction with LC–MS/MS for the determination of organophosphorus pesticides in sludge. **Analytica Chimica Acta**, v. 641, p. 117–123, 2009.

GOMEZ, M.J., *et al.* Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. **Journal of Chromatography A**, V. 1114, 224–233, 2006.

GONÇALVES, F. F, **Estudo de métodos empregando HPLC-DAD e LC-MS/MS para a determinação de resíduos de herbicidas em água e solo do cultivo do arroz irrigado**. 2007. 148 p. Tese (Doutorado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

HAJSLOVÁ, J., *et al.* Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 181–197, 2003.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 5.ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2001. p. 640-645.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2008. 855 p.

HAMILTON, B.K., *et al.* Changes in pungency of onions by soil type, Sulphur nutrition and bulb maturity. **Scientia Horticulturae**, v. 74, p. 249-256, 1998.

HEYDEN, V.Y., *et al.* **Guidance for Robustness/Ruggedness Tests in Method Validation**. Bélgica, 2006.

IBGE; Produção Agrícola Municipal 2007; **Malha municipal digital do Brasil: situação em 2007**. Rio de Janeiro: IBGE, 2008; [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br).

ICH; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, 2QB (CPMP/ICH/281/95), 1995

INPEV: Instituto Nacional de Processamento de Embalagens Vazias. **Destinação final de embalagens apresenta crescimento de 18% em julho**. Disponível em: <http://www.inpev.org.br/educacao/noticias/br/noticias.asp>. Acesso em 20 de dez. 2009.

JARDIM, I.C.S.F., *et al.* Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, No.4, p. 996-1012, 2009.

JARDIM, A.N.O.; CALDAS, E.D. EXPOSIÇÃO HUMANA A SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS POTENCIALMENTE TÓXICAS NA DIETA E OS RISCOS PARA SAÚDE. **Química Nova**, v. 32, No.7, p. 1898-1909, 2009.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL) DOQ-CGCRE-008: **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Brasília, 2003. 35p.

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

KRISTENSON M.E., *et al.* Recent advances in matrix solid-phase dispersion. **Trends in Analytical Chemistry**, V. 25, 2006.

KRUIVE, 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.

KRUIVE, A., *et al.* Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 651, p. 75-80, 2009.

KUSTER, M., *et al.* Analysis of in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques. **Mass Spectrometry Reviews**; v. 25, p. 900-916, 2006.

KURZ, M. H. S, **Estudo de métodos empregando extração em fase sólida e análise por HPLC-DAD e GC-ECD para determinação de resíduos de pesticidas em águas e degradação a campo**. 2007. 161 p. Tese (Doutorado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS.

KUSTER, M., *et al.* Analysis of in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques, **Mass Spectrometry Reviews**; v. 25, p. 900-916, 2006.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)** / Fernando M. Lanças – São Carlos: RiMa, 2004a, 96 p.

LANÇAS, M.F., *et al.* A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 35-61, 2009.

LEHOTAY, S.J., Supercritical fluid extraction of pesticides in foods. **Food Control**, v. 19, p. 906-914, 1997.

LEHOTAY, S.J., *et al.* Validation of a Fast and Easy Method for the determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. **Journal of AOAC International**, vol. 88, p. 412-431, 2005.

LEHOTAY, S.J., Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study., Vol. 90, No. 2, p. 485-520, 2007. **Journal of AOAC International**

LENTZA-RIOS, Ch., *et al.* Low-temperature clean-up method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil Supercritical fluid extraction of pesticides in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 912, p.135–142, 2001.

LESUEUR, C., *et al.* Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. **Food Control**, v. 785, p. 289-312, 2008.

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários.** Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em 3 de out. 2009.

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.

MOREIRA, N.A., *et al.* AVALIAÇÃO DE PRODUTOS NO CONTROLE DE TRIPES NA CULTURA DA CEBOLA. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 79-86, 2002.

NAVARRO, M., *et al.* Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of a new generation of fungicides in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 968, p. 201-209, 2002.

OSAKI, M. **Determinates da Oferta e da Demanda por Cebola Argentina no Brasil nos Anos 90.** 2003. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - USP, São Paulo, SP.

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

PARA: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. **Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2008.** Brasília, 15 de abril de 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/index.htm>. Acesso em 13 de ago. de 2009

PENA, M.T., *et al.* Development of a matrix solid-phase dispersion method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 626, p. 155–165, 2008.

PINHO, P.G. Análise de resíduos de agrotóxicos em tomates empregando dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, p. 92-98, 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.

PRAKSH, D., *et al.* Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*). **Food Chemistry**, v.102, p.1389–1393, 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.

RANDLE, W. M. Onion flavor chemistry and factors influencing flavor intensity. **ACS Symposium Series**, v. 660, p. 41 – 52, 1997.

RASTRELLI, L., *et al.* Determination of organophosphorus pesticide residues in Cilento (Campania, Italy) virgin olive oil by capillary gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 79, 303–305, 2002.

REZIC, I., *et al.* Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.12, p. 477-481, 2005.

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

RIDWAY, K., *et al.* Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v.1153, p. 36-53, 2007.

RISSATO, S.R., *et al.* Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1048, p. 153–159, 2004.

ROCHA, J.C., *et al.* **Introdução À Química Ambiental.** Porto Alegre: Editora Bookman, 2 ed., 2009, 256 p.

ROMERO-GONZALES, 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.

ROSE, C., *et al.*, 2009. The fate of fungicide and insecticide residues in Australian wine grape by-products following field application. **Food Chemistry**, v. 117, p. 634-640, 2009.

ROLDÁN, E., *et al.* Characterisation of onion (*Allium cepa* L.) by-products as food ingredients with antioxidant and antibrowning properties. **Food Chemistry**, v. 108, p. 907-916, 2008.

REGHIN, M., *et al.* Produção de cebola sobre palhada a partir de mudas obtidas em bandejas com diferentes números de células. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 414-420, 2006.

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

SANCO, COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (2003). **Document nº SANCO/2007/3131. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. 3ª ed., Bruxelas, Bélgica. 31/10/2007.

SCORZA JÚNIOR, R. P., SILVA, J. P. Potencial de contaminação da água subterrânea por pesticidas na Bacia do Rio Dourados. . **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 17, p. 87-106, 2007.

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

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.

SILVA, S.M.M.C., *et al.* Efeito dos Fungicidas Metalaxil e Fenarimol na Microbiota do Solo. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 1,5, p. 93-104, 2005.

SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola). **Brasil supera EUA no uso de agroquímicos**. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/noticia.php>. Acesso em 29 out.2009.

SINDAG – **Conexão SINDAG**. Disponível em: [http://www.sindag.com.br/conexao/anteriores/conexao\\_n15.pdf](http://www.sindag.com.br/conexao/anteriores/conexao_n15.pdf). Acesso em 15 dez.2009.

SKOOG, D.A. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008. 999 p.

SOARES, D.J., *et al.* Períodos de Interferência das plantas daninhas na cultura de Cebola (*Allium Cepa*) Transplantada. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.21, n.3, p.387-396, 2003.

SOLER, C., *et al.* Routine application using single quadrupole liquid chromatography–mass spectrometry to pesticides analysis in citrus fruits. **Journal of Chromatography A**, v. 1088, p. 224-233, 2005.

SPADOTTO, C.A. *et al.* Monitoramento do Risco Ambiental de Agrotóxicos: princípios e recomendações. (Documentos, 42) Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2004. 29 p.

STUBER, M., REEMTSMA, T. Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 910–916, 2004.

TABOUB, Y.R., *et al.* Simultaneous identification and quantitation of selected organochlorine pesticide residues in honey by full-scan gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 558, p.62-68, 2006

TAYLOR, P.J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v. 38, p. 328– 334, 2005.

TORRES, C.M., *et al.* Matrix solid-phase dispersion extraction procedure formultiresidue pesticide analysis in oranges. **Journal of Chromatography A**, v. 719, p.95-103, 1996.

TORRES, C.M., *et al.* Comparison of octadecylsilica and graphitized carbon black as materials for solid-phase extraction of fungicide and insecticide residues from fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 778, p. 127-137, 1997.

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.

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

VENKATESWARLU, P., *et al.* Monitoring of multi-class pesticide residues in fresh grape samples using liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.105, p.1760-1766, 2007.

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

WU, RI-NA., *et al.* Application of matrix solid-phase dispersion–HPLC method to determine patulin in apple and apple juice concentrate. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 582–586, 2008.

YANG, Y., *et al.* Analysis of eight free progestogens in eggs by matrix solid-phase dispersion extraction and very high pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 870, p. 241–246, 2008.

ZROSTÍKOVÁ, J., *et al.*, A lternative calibration approaches to compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography–electrospray ionisation tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in plant materials. **Journal of Chromatography A**, v. 973, p. 13–26, 2002.

## 10 Produção científica referente ao trabalho

Rodrigues, S. A. ; Caldas, S.S. ; Primel, E.G. **Influência do Efeito Matriz (EM) em LC-ESI-MS/MS na determinação de agrotóxicos em cebola.** In: 3 Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas-BrMASS, 2009, Campinas. Anais do 3 BrMASS, 2009.

Rodrigues, Sherol Acosta, Sampaio M.R.F., Tomasini D., Cardoso L.V., Caldas, S., Gonçalves, F., Primel E.G. **Comparação de MSPD e QuEChERS para extração de agrotóxicos em cebola empregando LC-ESI-MS/MS.** “Sessão coordenada 2 – Química Analítica Aplicada a Alimentos”, 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009. Salvador-BA.

Rodrigues, Sherol Acosta, Cabrera, L., Caldas, S., Gonçalves, F., Primel E.G. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica empregando MSPD e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola.** XVII Encontro de Química da Região Sul (SBQ-SUL), 2009. Rio Grande-RS.

Rodrigues, Sherol Acosta, Cabrera, L., Paiva, A.R.N, Caldas, S., Gonçalves, F., Primel E.G. **Optimization of matrix solid-phase dispersion (MSPD) for the determination of pesticide multi-residues in onion by LC-ESI-MS/MS.** 2<sup>nd</sup> Latin American Pesticide Residue Workshop (LAPRW2009) – Pesticides in Food and Environmental Samples. Santa Fé – Argentina.

Rodrigues, Sherol Acosta, Cabrera, L., Paiva, A.R.N, Demoliner, A., Caldas, S., Gonçalves, F., Primel E.G. **Otimização de metodologia analítica empregando MSPD e LC-ESI-MS/MS para análise de agrotóxicos em cebola.** XVI Encontro de Química da Região Sul, 2008. Blumenau – SC.

Rodrigues, Sherol Acosta, Cabrera, L., Paiva, A.R.N, Demoliner, A., Caldas, S., Gonçalves, F., Primel E.G. **Otimização de metodologia analítica empregando MSPD e LC-ESI-MS/MS para análise de agrotóxicos em cebola.** XII COLACRO, 2008. Florianópolis – SC.

Rodrigues, Sherol Acosta, Cabrera, L., Paiva, A.R.N, Demoliner, A., Caldas, S., Gonçalves, F., Primel E.G. **Otimização de metodologia analítica empregando MSPD e LC-ESI-MS/MS para análise de agrotóxicos em cebola.** X Encontro de Pós-Graduação, 2008. Rio Grande - RS