



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS
EM SUCO DE LARANJA INTEGRAL EMPREGANDO
MÉTODO QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Tiele Medianeira Rizzetti

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS
EM SUCO DE LARANJA INTEGRAL EMPREGANDO
MÉTODO QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

Tiele Medianeira Rizzetti

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química.**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Martha Bohrer Adaime

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Rizzetti, Tiele Medianeira
Determinação de resíduos de agrotóxicos em suco de
laranja integral empregando método QuEChERS e UHPLC-
MS/MS / Tiele Medianeira Rizzetti.-2013.
124 p.; 30cm

Orientadora: Martha Bohrer Adaime
Coorientadores: Renato Zanella, Manoel Leonardo
Martins
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2013

1. Método QuEChERS 2. Agrotóxicos 3. Suco de laranja
integral 4. UHPLC-MS/MS I. Adaime, Martha Bohrer II.
Zanella, Renato III. Martins, Manoel Leonardo IV. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

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

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS
EM SUCO DE LARANJA INTEGRAL EMPREGANDO
MÉTODO QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

elaborada por

Tiele Medianeira Rizzetti

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

Comissão Examinadora

**Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime – UFSM
(Presidente/Orientador)**

Prof^a. Dr^a. Neila Richards – UFSM

Prof^a. Dr^a. Claudia A. Zini – UFRGS

Santa Maria, 05 de Março de 2013.

*Dedico este trabalho à minha **família**,
em especial aos meus pais **Vani** e **Antônio**,
pelo incentivo, apoio e palavras de ânimo,
carinho e confiança.*

*Ao meu amigo e namorado, **Kelvis**, por todo amor,
compreensão, incentivo e carinho.*

*A Vitória desta conquista é
dedicada a vocês.*

*À Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime,
que além da orientação neste trabalho,
transmitiu através de sua simplicidade e sabedoria
ensinamentos e valores, enriquecendo
minha formação profissional.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime pela orientação neste trabalho, pelos ensinamentos e paciência. Obrigada por ter me proporcionado fazer parte da família do LARP.

Ao Prof. Dr. Renato Zanella pela co-orientação, pelos ensinamentos e pela participação e sugestões no exame de qualificação.

Ao Dr. Manoel Leonardo Martins pela co-orientação, pela paciência e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Osmar Damian Prestes pela participação, contribuições e sugestões no exame de qualificação proporcionando a melhoria deste trabalho.

Aos membros de minha banca de defesa da dissertação Prof^a. Dr^a. Cláudia Zinni e Prof^a. Dr^a. Neila Richards pelas excelentes contribuições, sugestões e comentários para melhoria deste trabalho.

Aos colegas e amigos do LARP pelo convívio e momentos de descontração. Obrigada a todos que de alguma forma contribuíram neste trabalho. Em especial, a Magali por dividir os momentos de alegrias e também aflições que ocorreram nesse período.

À minha amiga, e sempre colega, Maiara, que mesmo trabalhando em áreas diferentes da química, iniciamos juntas nossa jornada acadêmica começando com a graduação, passando aos estudos para a prova de seleção do mestrado, à felicidade de passar na prova desta seleção e também das angústias durante o mestrado e agora estamos juntas novamente rumo ao doutorado. Flor! Obrigada pela tua amizade.

Às minhas queridas amigas Fê e Lê! Obrigada por fazerem parte da minha vida, pelos conselhos, pelas palavras de conforto e pelas risadas.

Aos demais amigos, em especial a Daiane e a Magale, que mesmo a distância são pessoas que tenho um carinho enorme.

Ao meu namorado, Kelvis, por todo incentivo, apoio, compreensão, ajuda e amor, em especial nestes últimos meses.

Aos meus pais Antônio e Vani, e meus irmãos Bruno e Tiago que sempre torceram por mim. Obrigada pela força, compreensão e carinho.

À UFSM pela oportunidade de estar recebendo um ensino de alta qualidade.

À todos os professores do Departamento de Química da UFSM pela contribuição na minha formação.

Aos funcionários do PPGQ, Ademir e Valéria, pela atenção dispensada.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Agradeço à Deus, pela proteção e por iluminar o meu caminho em todos momentos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM SUCO DE LARANJA INTEGRAL EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS E UHPLC-MS/MS

AUTORA: TIELE MEDIANEIRA RIZZETTI

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. MARTHA BOHRER ADAIME

Santa Maria, 05 de março de 2013.

A indústria de suco de laranja é um dos setores de maior sucesso na economia brasileira e é também em que o consumo mais cresce na indústria mundial, uma vez que estes sucos são altamente nutritivos. Junto com esse aumento cresce também a preocupação da presença de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentares e assim se faz necessário o monitoramento destes resíduos para assegurar a saúde humana. Neste estudo, comparou-se diferentes métodos de extração baseados no método QuEChERS para a determinação de 76 agrotóxicos em suco de laranja integral por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em Série. Após a escolha do melhor teste preliminar foi realizado o planejamento experimental para otimização do mesmo. O procedimento de extração otimizado consistiu em 10 mL de suco extraído com 10,0 mL de acetonitrila acidificada com 1% de ácido acético (v/v), seguido de agitação em vortex por 1 min, para a etapa de partição utilizou-se 4,0 g de MgSO₄ anidro e 1,7 g de acetato de sódio. Agitou-se manualmente por 1 min, e posteriormente foi realizada a etapa de centrifugação a 3400 rpm, durante 8 min. A etapa de limpeza dispersiva, consistiu em 1,0 mL de extrato sobrenadante, 150 mg de MgSO₄ anidro, 40 mg de PSA em tubo do tipo *ependorf*, os quais foram agitados em vortex por 1 min e centrifugados a 10000 rpm por 3 min. Após a centrifugação, o extrato foi filtrado, diluído (1:4) em água ultra-pura e analisado por UHPLC-MS/MS. Os parâmetros avaliados para validação foram: faixa de linear das curvas analíticas, efeito matriz, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), bem como precisão e exatidão. O resultado da validação foi satisfatório, visto que o método apresentou recuperações de 70,5 a 117,5% e RSD inferiores a 19,2%. Os valores de LOD e LOQ do método variaram de 0,1 a 12,4 µg L⁻¹ e 4,9 a 26 µg L⁻¹ respectivamente, somente os compostos acefato e deltametrina não foram quantificados. Sendo assim, o método foi validado para 74 agrotóxicos em suco de laranja integral. O método desenvolvido mostrou-se adequado a análise de resíduos de agrotóxicos em suco de laranja integral, pois foram atendidos todos os parâmetros de validação referenciados pela legislação. Os resultados obtidos deste trabalho permitem dizer que a determinação por método QuEChERS em conjunto com UHPLC-MS/MS é excelente para análise de resíduos de agrotóxicos pela rapidez e eficácia.

Palavras-chave: Suco de laranja integral. Agrotóxicos. QuEChERS. UHPLC-MS/MS.

ABSTRACT

Master Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN INTEGRAL ORANGE JUICE USING QuEChERS METHOD AND UHPLC-MS/MS

AUTHOR: TIELE MEDIANEIRA RIZZETTI
ADVISOR: Prof^a. Dr^a. MARTHA BOHRER ADAIME
Santa Maria, 05th March 2013.

The orange juice industry is one of the most successful sectors in the Brazilian economy. It is also the fastest growing consumption in the industry worldwide, once these juices are highly nutritious. Combined to this increment also enhanced the concern of the presence of pesticide residues in food matrices, so it is necessary to monitor it, to ensure human health. In this study, it was compared different extraction procedures based on the QuEChERS method for the determination of 76 pesticides in integral orange juice by Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry. After choosing the best preliminary test it was carried out the experimental design to optimize the same. The optimized extraction procedure consisted in 10 mL of juice extracted with 10.0 mL of acetonitrile acidified with 1% acetic acid (v/v), followed by vortexing for 1 min. Partition step was performed using 4.0 g of MgSO₄ and 1.7 g of anhydrous sodium acetate. It was stirred manually for 1 min, and subsequently it was performed the centrifugation at 3400 rpm for 8 min. The dispersive cleanup step consisted of 1.0 mL of supernatant extract, 150 mg MgSO₄, 40 mg of PSA in Eppendorf tube, which were shaken on vortex for 1 min and centrifuged at 10,000 rpm for 3 min. After centrifugation, the extract was filtered, diluted (1:4) in ultrapure water and analyzed by UHPLC-MS/MS. The parameters evaluated for the validation were: linearity of the analytical curves, matrix effect, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), as well as precision and accuracy. The results of the validation were satisfactory, since the method presented recoveries between 70.5 to 117.5% and RSD lower than 19.2%. The method LOD and LOQ ranged from 0.1 to 12.4 µg L⁻¹ and from 4.9 to 26 µg L⁻¹ respectively, only acephate and deltamethrin compounds were not quantified. Thus, the method was validated for 74 pesticides in integral orange juice. The method developed was adequate for the analysis of pesticide residues in integral orange juice, since all parameters of validation were in according to the legislation. The results of this study allow to conclude that the combination of QuEChERS method and UHPLC-MS/MS is excellent for analysis of pesticide residues due to its quickness and effectiveness.

Key words: Integral orange juice. Pesticides. QuEChERS. UHPLC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Origem e distribuição da laranja no mundo. Adaptado da referência TETRA PAK MAGAZINE, 2009. 18
- Figura 2.** Período de colheita por variedade e percentual de produção de laranjas. Adaptado de CitrusBR, 2011. 20
- Figura 3.** Percentagem de amostras insatisfatórias encontradas no monitoramento pelo PARA dos anos de 2002 a 2010. Fonte: (PARA; 2009, 2010, 2011). 26
- Figura 4.** Esquema de um analisador do tipo triplo-quadrupolo. Adaptado de BROADINSTITUTE, 2013 30
- Figura 5.** Representação das etapas do Método QuEChERS (A) original (B) acetato (C) citrato. 35
- Figura 6.** Representação dos testes prévios realizados com variações do método QuEChERS. 57
- Figura 7.** Solução analítica $20 \mu\text{g L}^{-1}$ preparada no extrato da matriz “branco”, contendo todos compostos quantificados. 64
- Figura 8.** Solução analítica $20 \mu\text{g L}^{-1}$ preparada no solvente, contendo todos compostos quantificados. 64
- Figura 9.** Transições relativas ao MRM de alguns compostos analisados. (A) atrazina (B) carbofurano (C) acetamiprido (D) tiabendazol (E) carbendazim 65
- Figura 10.** Resultados obtidos de recuperação de agrotóxicos em investigação para os testes iniciais, descritos na Figura 6. 66
- Figura 11.** Valores dos efeitos para as quatro variáveis (NaOH, C_{18} , PSA e CH_3COOH) e para as interação delas. 68
- Figura 12.** Resultados em percentagem do número de compostos com recuperação satisfatória nos ensaios realizados pelo planejamento fatorial (E = ensaio). Condições experimentais para estes ensaios estão descritas no item 3.6.1, tabela 3. 68
- Figura 13.** Superfícies de resposta geradas através do planejamento fatorial 2^4 dos compostos que apresentaram valores de recuperação aceitáveis A) utilizando condição intermediária de acetato de sódio (1,7 g) e PSA (40 mg) B) Utilizando condição máxima de PSA (80 mg) e intermediária de acetato de sódio (1,7 g). 70
- Figura 14.** Representação do método para determinação de resíduos de agrotóxicos em suco de laranja integral, utilizando método QuEChERS. 71
- Figura 15.** Demonstração de ausência de pico cromatográfico de interferente no tempo de retenção do tiobencarbe (A) branco reagente e na (B) amostra “branco” e (C) pico cromatográfico do composto tiobencarbe fortificado no nível de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ 72
- Figura 16.** Representação da hidrólise do benomil em carbendazim. 73
- Figura 17.** Curvas analíticas preparada no solvente e no extrato branco da matriz para os compostos (A) carbendazim e (B) carbofurano. 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição nutricional da laranja e suco de laranja.	22
Tabela 2. Informações sobre os agrotóxicos estudados e Limites Máximos de Resíduos.	51
Tabela 3. Condições utilizadas para avaliação do planejamento fatorial com quatro variáveis.	59
Tabela 4. Gradiente Linear da fase móvel.	61
Tabela 5. Agrotóxicos com seus respectivos tempo de retenção, íons precursores, íons produto e energia de colisão.	62
Tabela 6. Faixas de trabalho e curvas analíticas obtidas para cada agrotóxico em estudo, preparadas em acetonitrila.	74
Tabela 7. Faixas de trabalho e curvas analíticas obtidas para cada agrotóxico em estudo, preparadas no extrato do suco de laranja integral.	77
Tabela 8. Avaliação do efeito matriz dos agrotóxicos analisados por UHPLC-MS/MS.	80
Tabela 9. Valores dos Limites de Detecção e Quantificação.	83
Tabela 10. Percentuais de recuperação e RSD para a repetibilidade do método.	86
Tabela 11. Percentuais RSD para a repetibilidade do instrumento para solução analítica de 20 µg L ⁻¹ preparada no extrato da matriz.	88
Tabela 12. Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método QuEChERS, no nível de fortificação de 50 µg L ⁻¹	90
Tabela 13. Resultados das amostras de suco de laranja integral analisadas.	92
Tabela 14. Fórmulas estruturais dos compostos estudados.	108
Tabela 15. Transições relativas ao modo MRM dos compostos estudados nesta dissertação.	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists
- APCI – Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*
- C₁₈ – Sílica modificada com hidrocarboneto linear C₁₈, octadecilsilano
- CitrusBR- Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos.
- d-SPE – Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*
- ESI (+) – Ionização por Eletrobulização no modo positivo, do inglês *Electrospray Ionization Positive Mode*
- EUA – Estados Unidos da América
- FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
- FDA – *Food and Drug Administration* dos EUA
- FUNDECITRUS - Fundo de Defesa da citricultura
- FCOJ - suco de laranja concentrado e congelado do inglês *Frozen Concentrate Orange Juice*
- GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*
- GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*
- GC-MS/MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Gas Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry Chromatography*
- HAc – Ácido acético
- HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- LARP – Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas
- LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*
- LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Liquid Chromatography - Coupled Mass Spectrometry*

LMR – Limite Máximo de Resíduos

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

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

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

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

LOQm – Limite de Quantificação do método, do inglês *Limit of Quantification of The Method*

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

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeCN – Acetonitrila

NFC - suco não concentrado do inglês *Not From Concentrate*

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

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

n – número de replicatas

NaAc – Acetato de sódio

PC – Padrão de Controle

PI – Padrão Interno

PLE – Extração com Líquido Pressurizado, do inglês *Pressurized Liquid Extraction*

PNCRC – Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes de Origem Animal

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

QuEChERS – Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*

r^2 – coeficiente de determinação

rpm – rotações por minuto

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

RSDpi – Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

RSDr – Desvio Padrão Relativo para Repetitividade

SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

SPME – Microextração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*

t_R – tempo de retenção

UE – União Européia

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria

UHPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled Tandem Mass Spectrometry*

v/v – Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Origem da laranja no Brasil.....	18
2.2 A laranja e os tipos de suco de laranja	20
2.3 Características nutricionais da laranja e suco de laranja.....	21
2.4 Importância econômica	23
2.5 Agrotóxicos e seus resíduos em alimentos	24
2.6 Técnicas cromatográficas para determinação de agrotóxicos em alimentos	27
2.6.1 Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em série (UHPLC-MS/MS).....	28
2.7 Técnicas de preparo de amostras empregadas para determinação de agrotóxicos em frutas.....	31
2.7.1 Método QuEChERS	33
2.8 Planejamento de experimentos	38
2.9 Validação de método	40
2.9.1 Seletividade.....	41
2.9.2 Linearidade, curva analítica e faixa de trabalho	42
2.9.3 Efeito matriz em cromatografia líquida	43
2.9.4 Limite de Detecção e quantificação.....	44
2.9.5 Exatidão.....	46
2.9.6 Precisão.....	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1 Instrumentação	48
3.2 Materiais, reagentes e solventes	49
3.3 Preparo das soluções analíticas.....	50
3.4 Escolha e processamento da amostra “branco”	54
3.5 Otimização das condições de detecção por UHPLC-MS/MS.....	54
3.6 Otimização do método QuEChERS para análise de resíduos de agrotóxicos em suco de laranja integral.....	55
3.6.1 Planejamento Fatorial 2⁴	58

3.7 Validação do método QuEChERS para análise de resíduos de agrotóxicos em suco de laranja integral.....	59
3.8 Aplicação do método em amostras reais.....	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
4.1 Otimização do Sistema Cromatográfico UHPLC - MS/MS para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em suco de laranja	61
4.2 Otimização do método QuEChERS modificado para análise de resíduos de agrotóxicos em suco de laranja integral.....	65
4.2.1 <i>Planejamento Fatorial 2⁴</i>	67
4.3 Validação do método QuEChERS otimizado	71
4.3.1 <i>Seletividade</i>	72
4.3.2 <i>Faixa de trabalho e curva analítica</i>	72
4.3.3 <i>Efeito Matriz</i>	80
4.3.5 <i>Limite de Detecção e quantificação</i>	83
4.3.6 <i>Exatidão</i>	85
4.3.7 <i>Precisão</i>	87
4.3.8 <i>Aplicação do método em amostras reais</i>	91
CONCLUSÕES	93
DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS	95
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXO 1.....	105
ANEXO 2.....	107
ANEXO 3.....	113

1 INTRODUÇÃO

Os sucos, em especial os de laranja, são a bebida que mais cresce na indústria mundial, uma vez que são altamente nutritivos e contêm diversos compostos bioativos com atividade antioxidante, bem como compostos fenólicos. O Brasil é o maior produtor de laranjas e exportador de suco de laranja do mundo. Sabe-se ainda, que é um dos maiores polos mundiais de produção de sucos de frutas, e que destes 95,5% correspondem ao suco de laranja (MAPA, 2013a; PÉREZ *et al.*, 2008).

A fim de garantir a qualidade do produto e aumentar a produtividade de frutas e hortaliças são utilizados agrotóxicos. Contudo, estes quando não são degradados naturalmente acabam por penetrar nos tecidos de plantas e permanecem então na polpa e no suco. Em comparação com os adultos, as crianças consomem maiores quantidades de sucos, e assim se tornam mais suscetíveis aos resíduos de agrotóxicos (JIN *et al.*, 2012; PÉREZ *et al.*, 2008).

Visando a importância de controlar a exposição humana aos resíduos de agrotóxicos, bem como, garantir a saúde pública torna-se necessário o monitoramento desses resíduos nos alimentos (SOLER; MAÑES; PICÓ, 2005). Para tal, através das agências regulamentadoras de vários países foram criados os programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Por exemplo, no Brasil, em 2001 foi implantado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Programa Nacional de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA).

Produtos voltados à exportação como é o caso do suco de laranja, é importante que se tenha conhecimento das legislações internacionais dos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos para os países em questão. Um exemplo de tal relevância foi a suspensão da importação do suco de laranja brasileiro nos Estados Unidos da América (EUA) em janeiro de 2012, pois foram encontrados traços do fungicida carbendazim, cujo uso é proibido nos EUA (GLOBO, 2012).

Os fatores econômicos aliados ao uso indevido de agrotóxicos, os quais podem provocar danos à saúde humana, geram grande preocupação e assim procura-se desenvolver métodos para determinação multirresíduos de agrotóxicos

em alimentos buscando limites de detecção e quantificação ainda menores, a fim de atender as legislações em vigor.

Os métodos mais utilizados para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos são a cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência. Devido à necessidade de se detectar simultaneamente um grande número de compostos com baixos níveis de concentração, têm sido desenvolvidas técnicas de análise de agrotóxicos cada vez mais rápidas, seletivas e sensíveis. Aqui se destacam a cromatografia líquida de ultra eficiência e a detecção por espectrometria de massas em série (CHIARADIA, 2009).

O uso de ferramentas estatísticas, como planejamentos experimentais, para a realização de ensaios experimentais tem se destacado nos últimos anos por possibilitar uma melhor interpretação dos resultados, além de proporcionar uma sequência de ensaios, evitando gastos desnecessários de reagentes e promover um menor tempo na execução dos ensaios (CUNICO et al., 2008).

Baseados nestes fatos, e também dada a importância da produção e exportação de suco de laranja no Brasil, percebe-se a relevância dessa matriz para desenvolvimento de métodos para determinação multirresíduos de agrotóxicos. Portanto, este trabalho teve por objetivos otimizar e validar um método de determinação de resíduos de agrotóxicos em suco de laranja integral empregando método QuEChERS (rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*), através de testes preliminares e da utilização de planejamento experimental, e UHPLC-MS/MS (cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas em série, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatograph - Tandem Mass Spectrometry*).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão tem por objetivo abordar a origem, características e importância econômica que fazem da laranja e do suco de laranja matrizes de interesse para análise de resíduos de agrotóxicos. Dessa forma, será apresentado o uso de agrotóxicos em alimentos, a importância de controlar os resíduos dos mesmos nos alimentos e os métodos de preparo de amostra, planejamento experimental, determinação por cromatografia e ainda os conceitos de alguns parâmetros de validação. Vale ressaltar que será enfatizado ao QuEChERS como método de preparo de amostra e análise por UHPLC-MS/MS, os quais foram realizados neste trabalho.

2.1 Origem da laranja no Brasil

A laranja tem sua origem no sul da Ásia, possivelmente da China, por volta de 4.000 anos atrás. Fatores como o comércio e as guerras entre as nações ajudaram a expandir o cultivo dos citros. Na expedição de Cristóvão Colombo (1500), mudas de frutas cítricas foram trazidas para o continente americano a fim de combater o escorbuto, doença que afetava marinheiros carentes de vitamina C (**Figura 1**). E assim, a laranja chegou ao Brasil e encontrou as melhores condições para vegetar e produzir, e logo se expandiu por todo território nacional (BIGGI, 1986; KOLLER, 1994; NEVES, 2010).



Figura 1. Origem e distribuição da laranja no mundo. Adaptado da referência TETRA PAK MAGAZINE, 2009.

Inicialmente a produção de citros destinava-se quase que exclusivamente ao consumo de subsistência, sendo comercializado apenas o excedente em mercados e feiras livres. O aumento da área cultivada promoveu o volume desse excedente e assim se tornando significativo, ao ponto de, em 1911, ser feita a primeira exportação de laranja, que teve como destino a Argentina. A possibilidade de colocação da laranja em mercados externos levou os citricultores a darem maior atenção à cultura e aos problemas encontrados nas plantações (MAIA, 1996). A citricultura caminhava a passos largos, chegando a exportar em 1939 o equivalente a 5 milhões de caixas; mas com a paralisação do tráfego marítimo devido a II Guerra Mundial, e com o aparecimento nos laranjais da doença denominada “tristeza”, que eliminou grande parte das árvores, a citricultura ressurgiu a partir de meados da década de 50 (BIGGI, 1986; MAIA, 1996).

Na Flórida, em 1962, houve a ocorrência de uma forte geada o que beneficiou a citricultura brasileira. E foi neste mesmo ano que o Brasil exportou pela primeira vez o suco de laranja concentrado e congelado. A partir deste as exportações se elevaram significativamente (BIGGI, 1986; MAIA, 1996). Em 1982 ocorreu uma inovação no sistema de transporte do suco concentrado e congelado onde os tradicionais tambores de aço foram substituídos por caminhões tanque e navios de carga a granel. No ano de 1984 houve novamente uma severa geada nos pomares da Flórida nos EUA e assim iniciou-se uma grande prosperidade da citricultura brasileira. Outras inovações ocorreram até 2003, quando tiveram início as exportações de suco não concentrado. Nos anos seguintes o preço do suco de laranja no mercado internacional atinge patamares recorde. Atualmente, mais de 50% de todo o suco de laranja consumido no planeta sai do Brasil (CitrusBR, 2011).

No Rio Grande do Sul, a introdução da citricultura teria sido efetuada por colonizadores açorianos em 1960, no vale do Rio Taquari, de onde ela se espalhou também para o Vale do Rio Caí. Entretanto, a região norte havia sido colonizada por jesuítas espanhóis muito antes dessa época, com a fundação dos Sete Povos das Missões. Nesta região, presumivelmente, foi efetuada a introdução de plantas cítricas, cujo cultivo não deve ter evoluído face à destruição das reduções jesuíticas, tanto por tropas portuguesas como espanholas (KOLLER, 1994).

2.2 A laranja e os tipos de suco de laranja

No Brasil há uma diversificação de variedades de laranja ao longo do ano (**Figura 2**) e isto se torna de suma importância, pois evita a oferta em excesso em determinados meses e possibilita à indústria o prolongamento do período de processamento de laranjas para a produção de sucos. Com certeza a maior importância econômica da laranja está na produção do suco, que são voltados para exportação, em especial para os EUA e países europeus (CitrusBR, 2011; MOREIRA; CRUZ, 2011; NEVES, 2010;).

Da laranja, além do suco, são extraídos óleos essenciais e líquidos aromáticos. O bagaço de citros, com alto teor energético, é um subproduto industrial de expressivo valor econômico, para alimentação animal, sobretudo para ruminantes e, em especial, a vaca de leite (MAPA, 2013a). Ainda, no processamento de 1000 kg de laranja são obtidas aproximadamente 553 kg de suco (CitrusBR, 2011).

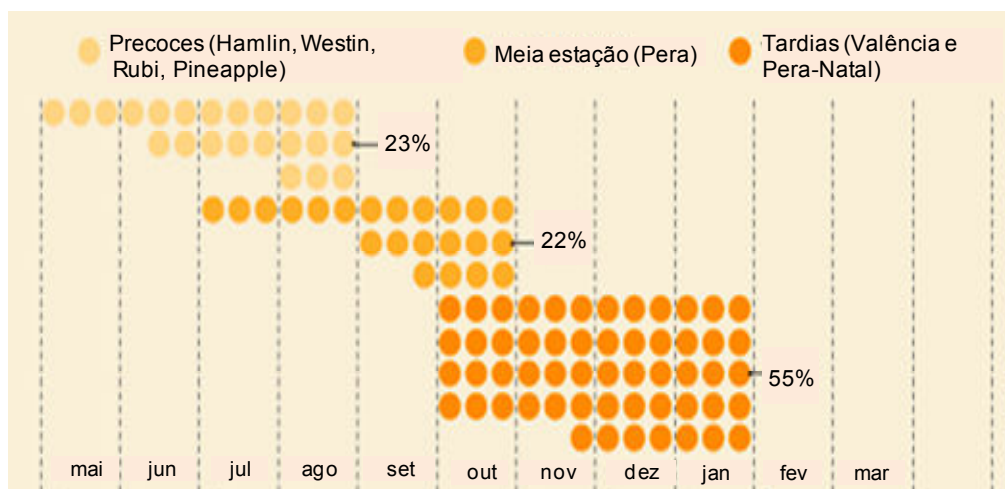


Figura 2. Período de colheita por variedade e percentual de produção de laranjas. Adaptado de CitrusBR, 2011.

Há três categorias de bebidas classificadas de acordo com teor de fruta ou polpa natural: os sucos, néctares e refrescos. O suco integral contém 100% de suco puro extraído da fruta; o néctar, no Brasil, possui 50% de suco e os refrescos possuem uma quantidade inferior a 25% (BRASIL, 2012; CitrusBR, 2011).

O suco pode ser apresentado ao consumidor de três formas: integral, concentrado ou reconstituído. O integral refere-se ao suco na concentração original da fruta, isto é, ao suco proveniente somente da fruta, sem adição de açúcar. O

suco concentrado é parcialmente desidratado, de onde foi removida parte da água natural e o reconstituído é feito a partir do suco concentrado, com adição de água e este deve atender aos mesmos parâmetros de qualidade do suco integral. A única forma de conservação do suco é exclusivamente através da pasteurização e quando levar adição de açúcar deve ser devidamente indicado na embalagem como adoçado (BRASIL, 2009, CitrusBR, 2011; GONÇALVES, 2009).

No Brasil, em especial, o consumo de suco de laranja é preferencialmente do tipo integral, não industrializado. Visto que, a oferta da fruta *in natura* é grande e por preços baixos o que faz com que os consumidores prefiram o suco de laranja espremido na hora (TETRA PAK MAGAZINE, 2009).

2.3 Características nutricionais da laranja e suco de laranja

A laranja é uma fruta com elevado teor de água e um baixo teor calórico. Assim, como as demais frutas cítricas a laranja é rica em vitamina C e constitui-se também em uma excelente fonte de ácido fólico, potássio e magnésio. Por possuir quantidades apreciáveis de β -caroteno apresenta cor amarelo-alaranjada. Outra característica é a grande quantidade de fibras que podem auxiliar na função intestinal, diminuir a absorção dos níveis de colesterol e diminuir os picos glicêmicos (reduzir os picos de açúcar no sangue). A fibra encontra-se principalmente no bagaço e na casca, porém muitas vezes estes são descartados antes do consumo, devido ao fato da laranja ser consumida principalmente sob a forma de suco. Entre as propriedades benéficas de sucos de frutas, as que mais se destacam são aquelas com efeitos antioxidantes. Alguns dos componentes responsáveis por este efeito são as vitaminas (em especial vitamina C), flavonoides e os β -carotenos (NESTLÉ, 2012; PICÓ; KOZMUTZA, 2007).

O efeito antioxidante proporcionado por estes compostos tornam a laranja uma fruta especialmente interessante para a saúde cardiovascular, pois esta ação antioxidante evita a oxidação do colesterol LDL (do inglês "*low density lipoprotein*"), uma vez que sua forma oxidada, por radicais livres presente na célula, faz com que haja a acumulação do mesmo nas artérias. A vitamina C (ácido ascórbico) quando ingerida com alimento de origem vegetal rico em ferro aumenta a absorção do mesmo pelo organismo, pois atua como facilitador para tornar o ferro ali presente em

uma forma de mais fácil absorção (NESTLÉ, 2012; QUEIROZ; TORRES, 2000). Na **Tabela 1** está demonstrada a composição nutricional básica da laranja e do suco de laranja por 100 g de porção comestível.

Tabela 1. Composição nutricional da laranja e suco de laranja.

	Laranja	Suco de laranja
Nutrientes		
Água (g)	86,75	88,30
Energia (kcal)	47	45
Energia (kJ)	197	188
Proteínas (g)	0,94	0,70
Gorduras totais (g)	0,12	0,20
Cinzas (g)	0,44	0,40
Carboidratos (g)	11,75	10,40
Fibras totais (g)	2,4	0,2
Acúcares totais (g)	9,35	8,40
Minerais		
Cálcio (mg)	40	11
Ferro (mg)	0,10	0,20
Magnésio (mg)	10	11
Fósforo (mg)	14	17
Potássio (mg)	181	200
Sódio (mg)	0	1
Zinco (mg)	0,07	0,05
Cobre (mg)	0,045	0,044
Manganês (mg)	0,025	0,014
Selênio (µg)	0,5	0,1
Vitaminas		
Vitamina C (mg)	53,2	50,0
Tiamina (mg)	0,087	0,090
Riboflavina (mg)	0,040	0,030
Niacina (mg)	0,282	0,400
α-caroteno (µg)	11	6
β-caroteno (µg)	71	33
Foleato total (µg)	30	30
Ácido Fólico (µg)	30	0
Ácido pantotênico (mg)	0,250	0,190
Vitamina B-6 (mg)	0,060	0,040
Vitamina B-12 (µg)	0,00	0,00
Vitamina A (µg)	11	10
Vitamina E (mg)	0,18	0,04
Vitamina K (µg)	0,0	0,1
Lipídios		
Ácidos graxos saturados totais (g)	0,024	0,018
Ácidos graxos monoinsaturados totais (g)	0,036	0,025
Ácidos graxos poliinsaturados totais (g)	0,040	0,034
colesterol (mg)	0	0

Fonte: USDA, 2012.

2.4 Importância econômica

O setor da citricultura é altamente organizado e competitivo, sendo uma das mais destacadas agroindústrias brasileiras. O Brasil é o maior produtor de laranjas do mundo, seguido por EUA, China, Índia e México (FAO, 2013). Enquanto Brasil e EUA utilizam mais de 70% das laranjas que produzem para a fabricação de sucos, México e China vendem as frutas para o consumo *in natura*. O rendimento da fruta é a principal característica que influenciará no destino da produção citrícola, e através dele identificadas as laranjas que possuem a quantidade de sólidos solúveis adequada para o uso industrial. Assim, o Brasil é autossuficiente na produção de laranjas e um dos maiores pólos mundiais de produção de sucos de frutas, em que 95,5% corresponde ao suco de laranja. As importações feitas pelo País são apenas residuais (CitrusBR, 2011; MAPA, 2013a).

Aproximadamente 85% do suco de laranja exportado mundialmente é provenientes do Brasil. Sendo que os principais mercados consumidores do suco concentrado são a Europa e os EUA, que importam aproximadamente 70% e 13% do suco brasileiro, respectivamente. Questões como renda per capita, logística e principalmente hábitos de consumo são fatores que limitam uma maior diversificação nas importações. Em alguns países a preferência é pelos néctares e refrescos, produtos com pouca quantidade de suco. Pode-se afirmar que, no Brasil, o setor de produção de suco de laranja exerce uma posição de liderança isolada. Das laranjas cultivadas no Brasil, é produzido o suco mais bebido no mundo. A cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo três são provenientes do Brasil. São exportados o suco de laranja concentrado e congelado (FCOJ, do inglês *Frozen Concentrate Orange Juice*) e o suco não concentrado (NFC, do inglês *Not From Concentrate*) (CitrusBR, 2011).

No ano de 2012 a citricultura sofreu com a superprodução e com a exportação devido à suspensão da venda do suco concentrado e congelado para os EUA. A suspensão de lotes de suco de laranja brasileiro se deu, pois foram encontrados resíduos do fungicida carbendazim, sendo o uso deste proibido o uso nos EUA (GLOBO, 2012). Assim, o Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS, 2012) elaborou a reformulação da lista de Produção Integrada dos Citros (PIC), em que banuiu o uso do carbendazim. Esta lista traz os ingredientes ativos dos agrotóxicos que estão autorizados para o uso na Produção Integrada dos

Citros. A fim de tentar contornar a crise que se instalou no setor citrícola brasileiro e também no mundo, estão sendo promovidas campanhas para aumentar o consumo de suco de laranja (FUNDECITRUS, 2012).

2.5 Agrotóxicos e seus resíduos em alimentos

De acordo com a legislação brasileira vigente, agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos para uso no cultivo, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, para alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação de seres vivos nocivos (BRASIL, 2002; MAPA, 2013b).

Os agrotóxicos são amplamente utilizados em todo o mundo. Segundo dados obtidos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Observatório da Indústria dos Agrotóxicos da Universidade Federal do Paraná, nos últimos dez anos, o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, enquanto que o mercado brasileiro cresceu 190%. Em 2008 o Brasil ultrapassou os EUA e desde então, assumiu o 1º lugar no ranking, como maior mercado mundial de agrotóxicos (CARNEIRO et al., 2012).

A utilização de agrotóxicos em vários estágios do cultivo e durante o armazenamento pós-colheita, desempenha um papel fundamental na preservação e proteção dos alimentos. No entanto, os agrotóxicos são altamente nocivos para a saúde, e a utilização indevida dos mesmos pode ocasionar a contaminação por resíduos destes nos alimentos e conseqüentemente dos seres humanos a eles expostos. Para evitar e/ou prevenir que ocorram esses malefícios é realizado monitoramento de agrotóxicos em alimentos, tendo como base os Limites Máximos de Resíduos (LMR) definidos pelas agências regulamentadoras de cada país (SOLER; MAÑES; PICÓ, 2005).

O termo “resíduo” de acordo com o órgão das Nações Unidas, A Food and Agriculture Organization (FAO), é definido como a fração de uma substância, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento proveniente de produtos agrícolas e/ou animais tratados com estas substâncias (CODEX ALIMENTARIUS, 2001)

O *Codex Alimentarius*, fórum internacional de normatização do comércio de alimentos estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU), tem por finalidade de proteger a saúde dos consumidores e assegurar práticas equitativas no comércio regional e internacional de alimentos (MAPA, 2013c). Este, estabelece entre outras definições que, LMR é a concentração máxima de um agrotóxico, expresso em mg kg^{-1} , recomendado pela Comissão do *Codex alimentarius* como sendo legalmente permitido, em alimentos e rações animais. Os LMRs aqui estabelecidos são principalmente destinados a serem aplicados no comércio internacional e são feitas pelo JMPR (do inglês, *Joint Meetings on Pesticide Residues*) a partir de estimativas da avaliação toxicológica do agrotóxico e seu resíduo, e a revisão dos dados de resíduos provenientes de ensaios controlados e usos supervisionados incluindo aqueles refletindo práticas alimentares agrícolas nacionais. Exame das diferentes estimativas de resíduos alimentares e determinações quer a nível nacional e internacional, em comparação com a ingestão diária aceitável, deve indicar que os alimentos cumpram LMR do Codex garantindo a segurança alimentar para o consumo humano (CODEX ALIMENTARIUS, 2010). Nas principais agências regulamentadoras não há LMR específico para sucos, e sendo assim, são utilizados aqueles estabelecidos para a matéria-prima (PÉREZ et al., 2008).

Em 2001, foi criado pela ANVISA o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), com o objetivo de avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor. A ANVISA coordena o programa com o auxílio das vigilâncias sanitárias dos estados participantes, nas quais se realizam os procedimentos de coleta dos alimentos e de seu envio aos laboratórios, para análise (ANVISA, 2012a).

Além do PARA há também, no Brasil, o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC, que é um programa federal de inspeção e fiscalização de alimentos, que visa verificar a presença de resíduos de substâncias químicas potencialmente nocivas à saúde do consumidor, como resíduos de medicamentos veterinários, de agrotóxicos ou afins, de contaminantes ambientais e de contaminantes inorgânicos (ANVISA, 2012b).

Na **Figura 3** estão representados os dados obtidos de amostras insatisfatórias do monitoramento da cultura de laranja, desde seu início em 2002 até o ano de 2010. Os resultados considerados insatisfatórios são as amostras que

apresentaram níveis de resíduos de agrotóxicos acima dos limites máximos estabelecidos pela legislação ou as amostras que apresentaram resíduos de agrotóxicos não autorizados para a cultura (PARA; 2009, 2010, 2011). Grande parte das amostras insatisfatórias resulta do uso de agrotóxicos não permitidos para a laranja. Isto faz com que haja exposição tanto para os produtores como para os consumidores a agrotóxicos e resíduos de agrotóxicos. Assim, fica evidente a necessidade contínua de monitoramento dos resíduos de agrotóxicos nesta cultura.

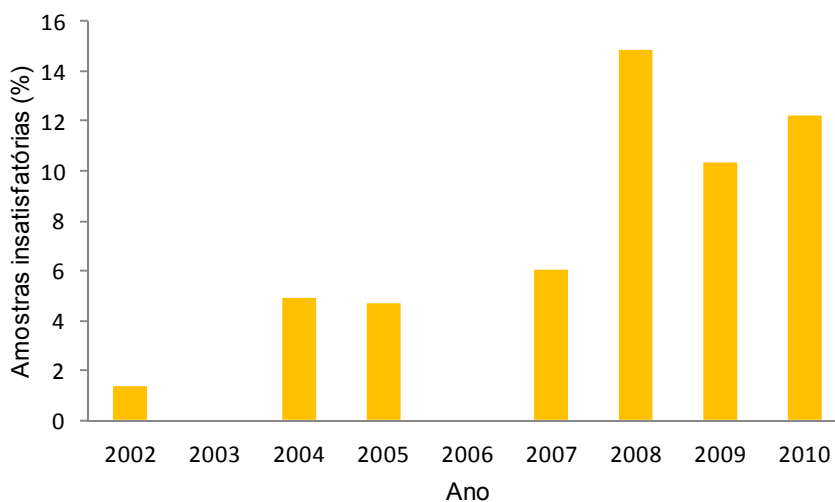


Figura 3. Percentagem de amostras insatisfatórias encontradas no monitoramento pelo PARA dos anos de 2002 a 2010. Fonte: (PARA; 2009, 2010, 2011).

No monitoramento realizado para cultura de laranja, de acordo com o PNCRC ano safra 2011/2012, 23,81% das amostras analisadas não estão em conformidade com os LMR estipulados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2013). Além disso, como já foi referido anteriormente, também é importante analisar substâncias, cujo uso é proibido, já que seu uso indevido pode ocasionar sérios riscos para saúde, ambiente e saúde ocupacional.

A degradação e conseqüentemente o desaparecimento de resíduos de agrotóxicos, geralmente se dão por mecanismos oxidativos. Dessa forma, em alimentos ricos em antioxidantes a oxidação do seu composto de origem para seus metabólitos pode tornar-se mais lenta. Assim, o controle de resíduos de agrotóxicos é especialmente importante, pois matrizes como suco de laranja são consumidas em grande quantidade e preferencialmente por crianças, quando comparadas aos adultos (PÉREZ et al, 2008; PICÓ; KOZMUTZA, 2007).

Devido à exigência de melhor qualidade dos alimentos tanto por parte dos órgãos governamentais quanto por consumidores, os LMR têm sido diminuídos. Isso faz com que haja a necessidade de métodos mais sensíveis, com menores limites de detecção e que sejam confiáveis (RIDGWAY et al., 2007).

2.6 Técnicas cromatográficas para determinação de agrotóxicos em alimentos

Houve progressos significativos relativamente aos métodos de análise de agrotóxicos nos últimos anos, principalmente devido à evolução dos instrumentos de cromatografia. Atualmente, o ambiente de química analítica exige a implantação de métodos e instrumentação mais sofisticados para manter o ritmo com as profundas mudanças em técnicas de separação. A combinação de equipamentos cromatográficos com detecção por espectrometria de massas é essencial para a análise abrangente de agrotóxicos e cumpre os requisitos da União Europeia para a quantificação e identificação dos agrotóxicos (FERNANDES, et al. 2011).

Ao longo dos anos a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*) tem sido a técnica selecionada para a análise multirresíduo de agrotóxicos em produtos de origem vegetal. Porém, com o desenvolvimento de agrotóxicos modernos muitos destes são polares ou iônicos, os quais apresentam menor persistência e toxicidade ao meio ambiente, e assim compostos com essas características não são adequados para a separação por GC e conseqüentemente não podem ser analisados por GC-MS (QUEIROZ; FERRACINI; ROSA, 2012; JIN, et al., 2012). Assim, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS, do inglês *Liquid Chromatography coupled with tandem Mass Spectrometry*) tornou-se a melhor escolha para substâncias que apresentam baixa volatilidade e/ou instabilidade térmica. A separação dos analitos é muito efetiva por cromatografia líquida e o acoplamento da espectrometria de massas em série permite a sua identificação e/ou confirmação em concentrações da ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$ ou menores (LACINA; URBANOVA, POUSTKA; HAJŠLOVA, 2010; QUEIROZ; FERRACINI; ROSA, 2012).

Atualmente está sendo muito utilizada a cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*), que se

usa velocidades mais lineares, e, por consequência gera tempo de corrida mais rápido, aumento da sensibilidade e melhor resolução, os quais são de particular interesse na análise de matrizes complexas. Avanços relativamente recentes em instrumentação cromatográfica permitiram o desenvolvimento de métodos alternativos, tais como o UHPLC-MS/MS. Esta técnica utiliza uma nova geração de colunas com partículas de 1,7 μm de diâmetro, que pode operar a pressões mais elevadas (FERNANDES, et al. 2011).

2.6.1 Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em série (UHPLC-MS/MS)

A tecnologia UHPLC desenvolveu-se a partir da introdução das partículas de fase estacionárias (FE) porosas $\leq 2 \mu\text{m}$, a fim de se obter análises mais rápidas e eficientes. A UHPLC fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) tendo como principais diferenças as colunas cromatográficas empregadas que são de dimensões reduzidas (5-10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1-2,1 mm), recheadas com partículas de FE $\leq 2 \mu\text{m}$, as quais, juntamente com as altas velocidades lineares de fase móvel (FM) aumentam a resolução e a detectabilidade, diminuem o tempo das análises, no entanto, geram um aumento significativo na pressão cromatográfica. Em vista disso, é necessário um equipamento adequado capaz de operar em altas pressões (15000 psi) (MALDANER E JARDIM, 2012).

Desde seu surgimento em 2004, a UHPLC vem se destacando e ganhando espaço em todas as áreas de aplicação da HPLC, devido as suas principais vantagens: diminuição considerável no tempo de análise, melhor resolução e conseqüentemente mais detectabilidade, economia de fase estacionária e fase móvel, pequeno volume de amostra, facilidade de transferência de um método desenvolvido por HPLC para UHPLC, grande variedade de colunas e equipamentos disponíveis e menor geração de resíduos atendendo, desta forma, à Química Verde (MALDANER E JARDIM, 2012).

O princípio básico de espectrometria de massas consiste na geração de íons a partir de compostos orgânicos ou inorgânicos e separação de acordo com sua

razão massa-carga (m/z), seguida de detecção qualitativa e quantitativa da respectiva razão m/z e abundância. O analito pode ser ionizado termicamente, por campos elétricos ou por impacto de elétrons, íons ou fótons. O espectrômetro de massas é constituído por uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector (GROSS, 2004). Apenas a fonte de íons pode ficar ou não sob pressão atmosférica, sendo as demais partes do equipamento operados sob condições de alto vácuo.

As fontes de ionização mais comumente utilizadas em Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC/MS, do inglês *Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*) são a ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*) e a ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray interface*) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). A APCI é utilizada na análise de moléculas menores e menos polares, já a ESI é empregada na análise de moléculas de maior polaridade e massa molecular (LANÇAS, 2009). Neste trabalho será dado enfoque à fonte ESI, visto que esta foi utilizada para o desenvolvimento do mesmo.

Na ionização por ESI, o analito de interesse se encontra dissolvido na fase móvel, e esta passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar é formado o “*spray*”, este é constituído por pequenas gotas altamente carregadas que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N_2) na região do “*spray*”. No decorrer da dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). É aqui que ocorre a chamada “explosão coulômbica”, que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais se originaram. Assim, passa a ocorrer uma série de explosões até que são produzidos íons do analito a partir destas gotas, os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

A ESI permite que os compostos sensíveis à temperatura sejam ionizados sem sofrer degradação, pois a ionização ocorre diretamente na solução. O modo de obtenção de íons proporcionado por esta fonte favorece a sua aplicação a compostos ionizáveis em solução e compostos altamente polares (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

O modo de operação e o analisador de massas empregado neste trabalho são monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reactions Monitoring*) e sistema triplo quadrupolo (QqQ), respectivamente. No modo MRM, o espectrômetro é programado de forma que dois ou mais íons são separados e fragmentados novamente (MS/MS). Este modo proporciona analisar multianálitos dentro de uma mesma análise, visto 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 detectabilidade, diminuindo a resposta dos interferentes e reduzindo o ruído de fundo (HARRIS, 2001).

O QqQ é constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons de mesma razão m/z , mas sim como cela de colisão. No primeiro, o íon selecionado é separado da corrente de íons vinda da fonte e no segundo quadrupolo, este íon sofre nova fragmentação por colisão com íons de N_2 ou argônio. Por fim, o terceiro quadrupolo seleciona um dos íons formados para enviar ao detector de espectrometria de massas (HARRIS, 2001). O analisador de massas do tipo QqQ, representado na **Figura 4**, possui como algumas de suas vantagens alta sensibilidade, alta reprodutibilidade e baixo ruído.

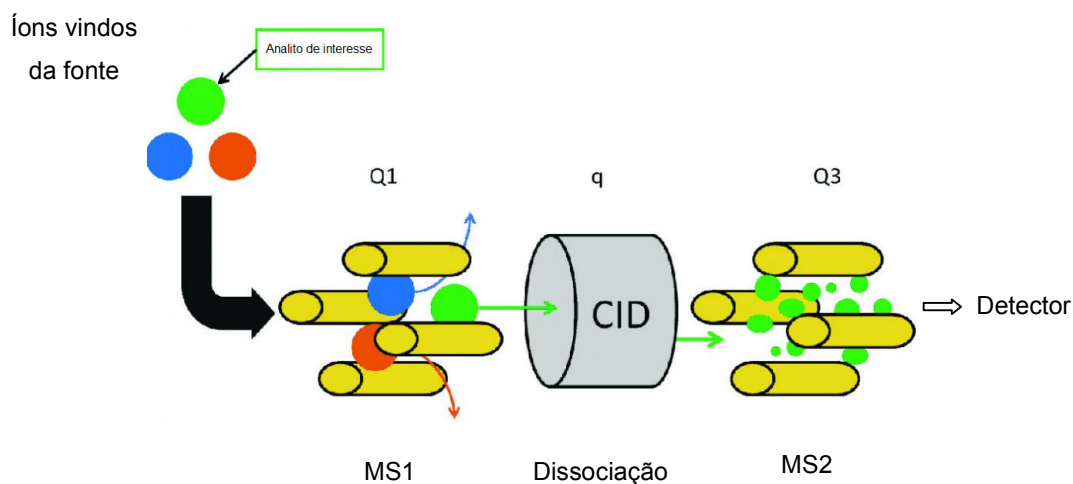


Figura 4. Esquema de um analisador do tipo triplo-quadrupolo. Adaptado de BROADINSTITUTE, 2013

2.7 Técnicas de preparo de amostras empregadas para determinação de agrotóxicos em frutas

Os alimentos são matrizes complexas, ou seja, neles estão presentes uma grande quantidade de substâncias interferentes (co-extrativos) que juntamente com a pequena quantidade de resíduos tornam a determinação de resíduos de agrotóxicos um verdadeiro desafio (WILKOWSKA e BIZIUK, 2011). Os métodos de análises de resíduos de agrotóxicos envolvem basicamente duas etapas: extração de dos compostos de interesse da matriz e determinação/separação cromatográfica. A etapa de preparo de amostra em matrizes complexas requer muito tempo, e assim, é muitas vezes o fator limitante na análise de resíduos de pesticidas. Isso faz com que haja a necessidade de minimizar o número de etapas a fim de reduzir as fontes de erro (FRENICH *et al.*, 2008; RIDGWAY *et al.*, 2007).

Os métodos clássicos de preparo de amostras (como exemplo, método de Mills, de Storherr e de Luke) são complicados, demorados e utiliza uma quantidade elevada de solvente orgânico. Visando eliminar esses problemas e aumentar o desempenho de extração, a partir da década de 90, foram propostas diversas formas de preparo de amostras para determinação de resíduos em frutas e sucos de frutas, tais como: a Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*), Microextração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*), Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*), Extração Acelerada por Solventes (PLE, do inglês *Pressurized Liquid Extraction*) e a Extração Assistida por Micro-ondas (MAE, *Microwave Assisted Extraction*) (CABRERA *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2011. PRESTES; ADAIME; ZANELLA; 2011).

As técnicas SPE, SPME, MSPD se baseiam principalmente na extração de agrotóxicos em fase sólida, o que permite a concentração de analitos no sorvente e sua subsequente eluição ou dessorção, frequentemente de uma forma seletiva. Já com a PLE a amostra e solvente são aquecidos e submetidos a alta pressão em uma cela fechada e na MAE a amostra é imersa em um frasco aberto ou fechado, contendo solvente, e é irradiada com micro-ondas.

BLASCO et al. (2005) mostraram que a utilização de extração por PLE 50% dos agrotóxicos estudados apresentaram valores de recuperações acima de 76%. O composto metidationa apresentou a recuperação mais baixa para matriz laranja, sendo que este foi de 60%.

BOONCHIANGMA et al. (2012) utilizaram DLLME acoplado a UHPLC com detecção por UV para a determinação de seis piretróides em sucos de diversas frutas, incluindo maçã, uva vermelha, laranja, kiwi, maracujá, romã e goiaba. Os parâmetros que afetam a eficiência da extração do método DLLME foram investigados. As condições ótimas foram 5,00 mL de solução da amostra, extraídas com 1,25 mL de metanol (solvente dispersor) e 300 µL de clorofórmio (solvente extrator). As recuperações médias dos piretróides avaliadas por meio de fortificação foram de 84-94% e os limites de detecção variaram de 2 a 5 µg L⁻¹.

RAVELO-PÉREZ et al. (2008) desenvolveram método o qual envolve SPE e análise por cromatografia gasosa com detecção de nitrogênio, fósforo. O procedimento de preparo de amostra consistiu primeiro no condicionamento dos cartuchos com 10 mL de água ultra-pura e 10 mL de acetonitrila, após foi realizada a diluição 1:1 dos sucos, apenas com água ultra-pura, e ajuste do pH do suco (10 mL) para 6,0 antes do procedimento -SPE: em que foi utilizado 40mg de fase estacionária MWCNTs (do inglês, Multi-walled carbon nanotubes) Após o carregamento da amostra, foi passado água ultra-pura para lavar o cartucho (2, 3, 6 e 6 ml foram transferidos para os sucos de maçã, laranja, uva e abacaxi, respectivamente). Após, os cartuchos foram secos a vácuo durante 20 min. E então, os agrotóxicos foram eluídos com 20 mL de diclorometano e o solvente orgânico foi evaporado até à secura a 40° C. Os resíduos foram dissolvidos em 1 mL de ciclohexano e foi adicionado sulfato de sódio anidro. Por fim, os sobrenadantes foram filtrados e analisados por GC-NPD. Valores médios de recuperação foram acima de 73% para todos os pesticidas (entre 77 e 101% para o suco de maçã, 75 e 103% para o suco de uva, 73 e 103% de suco de laranja, e 73 e 93% para o suco de abacaxi), com um desvio padrão relativo (RSD) menor do que 8,5% em todos os casos.

Estes são exemplos de métodos que apresentam, dentre outras características, elevada eficiência, entretanto, geralmente demandam investimento considerável em instrumentação. Essas técnicas geralmente possuem um escopo limitado de agrotóxicos que podem ser extraídos sob determinadas condições.

Dessa forma, estes procedimentos, podem ser empregados em algumas aplicações, mas geralmente estão distantes de serem considerados ideais para um método multirresíduo de agrotóxicos em alimentos, uma vez que os agrotóxicos apresentam grande variedade de propriedades químicas (CABRERA et al., 2012; FERNANDES et al., 2011; PRESTES; ADAIME; ZANELLA; 2011; WILKOWSKA e BIZIUK, 2011).

No ano de 2003, Anastassiades e colaboradores introduziram um método de preparo de amostra para análise de resíduos de agrotóxicos, denominado QuEChERS (rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*). Este método foi criado com o objetivo de superar as limitações dos métodos citados anteriormente. Além disso, atende às características necessárias para um método multirresíduo e assim garante resultados verdadeiros e precisos, e baixos limites de detecção para uma gama de compostos. É um método rápido de análise, fácil de ser realizado, econômico por usar pequenas quantidades de solvente e reagente e ainda os reagentes e aparelhos utilizados são de baixo custo (ANASTASSIADES et al., 2003; FRENICH et al., 2008; PRESTES; ADAIME; ZANELLA; 2011; WILKOWSKA e BIZIUK, 2011).

2.7.1 Método QuEChERS

O método QuEChERS proposto por Anastassiades et al. (2003) foi desenvolvido para extração de ampla faixa de agrotóxicos em frutas e vegetais. Este método é baseado nas etapas de extração com solvente polar (acetonitrila), seguida da partição, promovida pela adição de sais, e por fim uma etapa de limpeza utilizando Extração em Fase Sólida Dispersiva (d-SPE, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*). A escolha da acetonitrila como solvente de extração ocorreu por proporcionar uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos em matrizes como cereais, gorduras e pigmentos, e por extrair uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades e ainda, por permitir a análise tanto por cromatografia líquida quanto por cromatografia gasosa, devido à compatibilidade do extrato final com ambas as técnicas (PRESTES et al., 2009).

Durante o desenvolvimento do método foram testados sais a fim de promover a separação das fases orgânica e aquosa e permitir a análise de agrotóxicos com polaridades diferentes. Entre os sais avaliados destacou-se o sulfato de magnésio

anidro (MgSO_4) como sendo mais eficaz, pois reduz o volume da fase aquosa e facilita a partição de analitos polares na fase orgânica. Isto ocorre devido ao efeito “*salting out*”, em que a adição de sais diminui a solubilidade dos compostos polares na fase aquosa. Por fim a etapa de limpeza por d-SPE tem como base a extração em fase sólida, porém o sorvente utilizado é adicionado diretamente ao extrato, não sendo necessário o condicionamento de cartuchos. Este fato aliado ao emprego de pequenas quantidades de sorventes torna o método econômico, rápido e menos trabalhoso quando comparado à SPE (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Na primeira versão do método QuEChERS foram analisados 25 pesticidas comumente analisados por GC-MS/MS (ANASTASSIADES *et al.*, 2003), sendo que para este caso foi empregado o chamado então método QuEChERS original, conforme **Figura 5(A)**. Esta versão apresentou excelentes resultados para as diferentes amostras testadas, porém para algumas aplicações, determinados compostos apresentavam problemas de recuperação e/ou estabilidade de acordo com o pH da matriz. A partir destes resultados começaram a ser feitas modificações para melhoria do método QuEChERS. Verificou-se que a utilização de tampões (pH 5) promovia recuperações satisfatórias para compostos dependentes do pH independente da matriz utilizada. Os tampões empregados como modificadores deste método foram o acetato de sódio (pH 4,8) e a mistura de citrato de sódio diidratado e hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado (pH 5,0-5,5). Ambos os métodos foram considerados como métodos oficiais para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos: o “QuEChERS-acetato” (**Figura 5(B)**) foi assim considerado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) em 2007 e o “QuEChERS-citrato” (**Figura 5(C)**) método de referência em 2008 pelo *Comité Européen de Normalisation* (CEN) (PRESTES; ADAIME; ZANELLA; 2011; LEHOTAY *et al.*, 2005).

Foram realizadas modificações na etapa de limpeza por d-SPE, pois o método original utiliza como sorvente somente amina primária secundária (PSA). Este sorvente possui um elevado efeito quelante devido à presença dos grupamentos amino primário e secundário, acarretando em remoção ou retenção de ácidos orgânicos polares, pigmentos polares, alguns açúcares e ácidos graxos. No entanto, a fim de promover uma limpeza mais efetiva de algumas matrizes, principalmente aquelas que contêm gordura, a adição de C_{18} com PSA mostrou-se ser eficaz. Pode ainda ser utilizado carbono grafitizado para remover esteróis e

pigmentos como clorofila. De forma geral, a depender da composição da matriz a ser analisada, podem ser empregados diferentes sorventes de modo a atingir melhor eficiência na extração. Deve-se ressaltar, que uma limpeza eficiente garante uma maior vida útil para insersores e colunas cromatográficas, reduzindo assim a contaminação do sistema cromatográfico e minimizando o efeito matriz (ANASTASSIADES et al., 2003; PRESTES; ADAIME; ZANELLA; 2011; WILKOWSKA; BIZIUK, 2011).

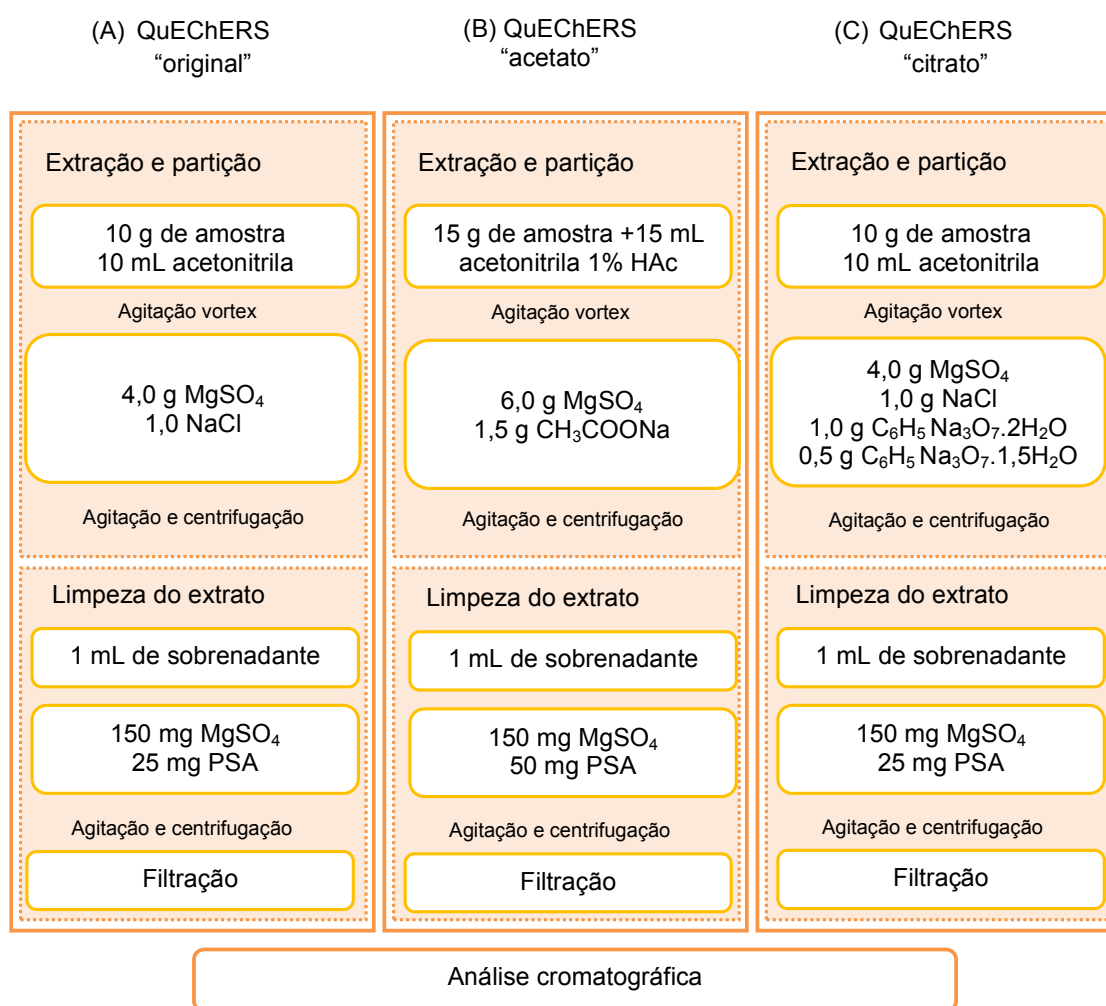


Figura 5. Representação das etapas do Método QuEChERS (A) original (B) acetato (C) citrato.

FENOLL e colaboradores (2010) desenvolveram um método multirresíduo para determinação simultânea de 54 agrotóxicos em vegetais (pimentão e tomate) e frutas cítricas (laranja e limão) por LC-MS/MS. O preparo de amostra foi realizado

através do método QuEChERS, o qual consistiu no uso de 10 g de amostra extraídas com 10 mL de acetonitrila, agitadas por 2 minutos e o “*salting out*” foi promovido pela adição de 2 g de NaCl. Com posterior agitação e centrifugação por 10 min a 3000 g. Uma alíquota do extrato foi filtrada e diluída para análise por LC-MS/MS. As recuperações obtidas para todos os agrotóxicos variaram de 67,0-110,2% para pimentão, 68,0-112,5% para o tomate, 66,2-114,5% para o limão e 65,5-112,% para laranja. Os compostos que apresentaram as recuperações inferiores a 70% foram o diniconazol e procloraz. O desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) foi menor que 8,3%, no caso mais desfavorável.

FRENICH e colaboradores (2008) desenvolveram um método para análise de 53 agrotóxicos em frutas e vegetais por UPLC-MS/MS. Foram estudadas as matrizes pepino, laranja, morango e olivas. O método QuEChERS consistiu em 10 g de amostra, adição de 10 mL de acetonitrila 1% ácido acético e para partição utilizou-se 4 g de sulfato de magnésio e 1 g de acetato de amônio, tendo sido feita agitação manual por 1 minuto e centrifugação por 5 minutos a 4300 g. A limpeza do extrato foi realizada apenas para a matriz oliva, com florisil que é muito utilizado para matrizes com alto teor de gordura. A média de recuperação variou de 70 a 109% com desvio padrão relativo inferior a 20% para todos os agrotóxicos analisados nas quatro matrizes estudadas. O método foi aplicado para a análise de 200 amostras de vegetais, e o imidacloprido foi o agrotóxico mais frequentemente encontrado em concentrações compreendidas entre 0,01 e 1,00 mg kg⁻¹.

ROMERO-GONZÁLEZ e colaboradores (2008), aplicaram o método QuEChERS para sucos de frutas. Para extração dos agrotóxicos em 10 mL de suco adicionou-se 10 mL de acetonitrila 1% ácido acético, agitação em vortex 1 min, a etapa de partição a partir de 4 g de sulfato de magnésio e 1 g de acetato de sódio, que foram agitados por 1 min e centrifugados a 4300 g por 5 min. Do sobrenadante foi retirado 1 mL e diluído com 1 mL de água antes da análise UPLC-MS/MS. Não houve necessidade da etapa de limpeza. A fim de comparação foi também realizado o preparo de amostra por SPE em que 2 mL de suco fortificados com 50 µg L⁻¹ foram diluídos com 2 mL de água ultra pura, os cartuchos utilizados foram pré-condicionados com 4 mL de diclorometano, 4 mL de metanol e 5 mL de água, com vazão de 8 mL min⁻¹. Os cartuchos foram secos por 30 min sob vácuo e os analitos foram eluídos com 5 mL de MeOH e 5 mL de diclorometano. O solvente orgânico foi evaporado até à secura e o resíduo foi dissolvido em 1 mL de fase móvel. A

comparação dos resultados obtidos pelos dois métodos mostrou que QuEChERS apresentou maior eficiência para maioria dos compostos do que o SPE convencional. No entanto, a SPE proporcionou melhor ou similar eficiência do que QuEChERS para alguns agrotóxicos, como propamocarbe, carbendazim, tiametoxam quando se utilizou Strata-X ou Oasis como fase estacionária. Contudo, a SPE é trabalhosa e demorada e não é apropriada para todos os agrotóxicos estudados, sendo o QuEChERS, portanto, mais conveniente. Nas amostras de suco analisadas foram encontrados os agrotóxicos carbendazim, tiabendazol e ciprodinil, mas abaixo do LMR estabelecidos.

KITTLAUS e colaboradores (2012) fizeram uso do método QuEChERS modificado a fim de avaliar o efeito matriz em diversas matrizes, para a matriz limão utilizou-se 10 g da mesma, 10 mL de acetonitrila, após agitação por 2 min centrifugação a 3000 rpm por 5 min). Do extrato é retirada uma alíquota de 200 µL e que foi acondicionada em vial. O restante segue na adição de 600 µL de hidróxido de sódio 5N e dos sais 4 g MgSO₄, 1,0 g de NaCl, 0,5 g hidrogenocitrato de sódio, 1,0 g de citrato de sódio procedeu-se com a agitação manual de 2 min e centrifugados a 3000 rpm por 5 min. Então, foi retirada uma alíquota de 200 µL e acondicionada em vial. Foram retirados 8 mL de extrato e deixados durante a noite no freezer a -18 °C, após foi centrifugado e foi retirado 200 µL. Do extrato foram ainda, retirados 6 mL extrato e adicionados 150 mg de PSA e 900 mg de MgSO₄ (agitação 2 min e centrifugação). Deste, 200 µL foram separados. Todos foram devidamente preparados e encaminhados para análise por LC-MS/MS. Os diferentes passos de limpeza na abordagem QuEChERS não resultaram na diminuição dos efeitos de matriz significativamente. No entanto, produtos com alta concentração de compostos de matriz problemáticos ainda causam forte supressões após a limpeza.

WANG e colaboradores (2010) utilizaram “QuEChERS acetato” para extração de 148 agrotóxicos em frutas e vegetais (maçã, banana, melão, laranja e suco de laranja, cenoura, milho, cebola, ervilha, batata, espinafre e tomate) e determinação por LC-ESI-MS/MS e UHPLC QqTOF/MS. Para extração de 15 g da amostra foram utilizados um volume de 15 mL de acetonitrila 1% ácido acético e para partição 1,5 g de acetato de sódio e 6 g de sulfato de magnésio e agitação manual de 45 s e centrifugou-se a 3000 rpm por 3 minutos. Foram retirados 9 mL do sobrenadante, e adicionados estes, para limpeza, 0,6 g de PSA e 1,8 g de MgSO₄ por tubo e

preparados para análise cromatográfica. As recuperações e o RSD obtidos para maioria dos compostos por ambos os equipamentos mostraram-se dentro da faixa aceitável.

Fica evidente que, dentre os métodos mais comumente utilizados para o preparo de amostra, o método QuEChERS é o mais usual, requer menos etapas e, considerando as características deste método já apresentadas, pode-se afirmar que o mesmo é uma excelente ferramenta para a análise de multirresíduos de agrotóxicos em alimentos.

2.8 Planejamento de experimentos

Dado o avanço em todos os campos da ciência, incluindo automação na geração e aquisição de dados, ocorre a obtenção de uma grande quantidade de dados numéricos e informações. A fim de se obter a exploração e o correto entendimento faz-se necessário o uso de ferramentas estatísticas, em que se tornam indispensáveis para esses fins (COSTA et al., 2006; CUNICO et al., 2008).

A fim de proporcionar melhor compreensão dos fundamentos do planejamento fatorial é necessário ter uma boa visão de alguns conhecimentos básicos. Dentre eles destacam-se as definições de fator, nível, modelo estatístico, efeito, efeito principal, efeitos de interação e erro padrão para os efeitos. O fator corresponde a cada variável do sistema em estudo; os níveis são as condições de operação dos fatores de controle investigada nos experimentos, em geral, identificados por nível baixo (-) e nível alto (+); o modelo estatístico sendo do tipo $y=b_0+b_1x_1$ onde b_0 , b_1 ..., b_n efeitos de cada fator na resposta; o efeito indica a mudança ocorrida na resposta quando se muda do nível baixo (-) para o nível alto (+). O efeito principal consiste na diferença média observada na resposta quando se muda o nível do fator de controle investigado; enquanto que o efeito de interação refere-se à metade da diferença entre os efeitos principais de um fator nos níveis de outro fator. Os valores dos efeitos de interação entre as variáveis podem ser calculados considerando os sinais já atribuídos às variáveis envolvidas, na forma de uma operação matemática de multiplicação. O erro na determinação dos efeitos, é o denominado erro padrão para os efeitos, sendo o mesmo tanto para os efeitos principais quanto para os de interação (CUNICO et al., 2008; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Há várias formas de se otimizar as variáveis em um planejamento experimental. Quando se utilizam processos univariados há desvantagem devido ao tempo gasto para otimização e também pela falta de avaliação das interações entre as variáveis do estudo. Entre os tipos de planejamento experimental, destacam-se os sistemas de planejamento fatorial em que demonstram ser uma ferramenta estatística muito útil e simples, pois permitem avaliar simultaneamente o possível efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais, quando comparados aos processos univariados (CUNICO et al., 2008).

Um planejamento fatorial completo consiste em experimentos em que sejam realizadas todas as possíveis combinações dos níveis de fatores. Sendo que cada um desses experimentos, em que o sistema é submetido a um conjunto de níveis definidos, é um ensaio experimental. Para estudar o efeito de qualquer fator sobre uma dada resposta, precisa-se fazer variar de nível, e observar o resultado que essa variação produz sobre a resposta. Para isso, é necessário que o fator assuma, pelo menos, dois níveis diferentes. Portanto, o planejamento mais simples é aquele em que todos os fatores são estudados em apenas dois níveis. O planejamento fatorial 2^k é chamado assim, pois para k fatores (k variáveis controladas), um planejamento completo de dois níveis exige a realização de $2 \times 2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ ensaios diferentes. (CUNICO et al., 2008; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

O planejamento fatorial utilizado neste trabalho é do tipo 2^4 , ou seja, dois níveis diferentes e quatro variáveis controladas, portanto gera 16 ensaios diferentes. A **Equação 1** representa este modelo estatístico, em que coeficiente b_0 é o valor populacional da média de todas as respostas obtidas, b_1 , b_2 , b_3 , b_4 são os coeficientes relacionados com as variáveis x_1 , x_2 , x_3 , x_4 respectivamente, b_{12} , b_{13} , b_{14} , b_{23} , b_{24} , b_{34} são os coeficientes para as interações x_1x_2 , x_1x_3 , x_1x_4 , x_2x_3 , x_2x_4 , x_3x_4 ; b_{123} , b_{124} , b_{134} , b_{234} , são os coeficientes para as interações destas variáveis $x_1x_2x_3$; $x_1x_2x_4$, $x_1x_3x_4$, $x_2x_3x_4$ e b_{1234} corresponde ao coeficiente das interações entre $x_1x_2x_3x_4$ (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

$$\begin{aligned} \hat{y}(x_1x_2x_3x_4) = & b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 \\ & + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{34}x_3x_4 + b_{123}x_1x_2x_3 + b_{124}x_1x_2x_4 + b_{134}x_1x_3x_4 \\ & + b_{234}x_2x_3x_4 + b_{1234}x_1x_2x_3x_4 \end{aligned} \quad (1)$$

Este tipo de planejamento pode gerar quinze efeitos: quatro efeitos principais, seis interações de dois fatores, quatro interações de três fatores e uma interação de quatro fatores. Os níveis são codificados com os sinais (+) e (-), a atribuição aos níveis superiores ou inferiores se dá de forma arbitrária e não interfere na realização dos experimentos ou interpretação dos resultados. A codificação dos níveis torna possível esquematizar estas variáveis na forma de matrizes de planejamento e dessa forma determinar, por meio de cálculos, a influência das mesmas e sua interação no sistema. A matriz de coeficientes de contraste X , juntamente com o vetor de respostas y , obtido experimentalmente, é utilizada para cálculo dos coeficientes do modelo. Neste tipo de planejamento podem ainda ser realizadas repetições do ponto central e ainda extrapolações dos níveis (BRASIL et al., 2007; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Uma ferramenta de otimização muito utilizada, baseada em planejamento fatorial, é a metodologia de superfícies de resposta (RSM, do inglês *Response Surface Methodology*). Esta é uma ferramenta de otimização baseada em planejamentos fatoriais e desde a sua “descoberta” tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos. A superfície de resposta descreve como as variáveis influenciam na resposta, mostrando informações a respeito do comportamento das variáveis na região estudada. A metodologia de superfícies de resposta apresenta duas etapas distintas, a modelagem e deslocamento. As mesmas são repetidas tantas vezes quanto necessário, com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada. Normalmente, a modelagem é feita ajustando-se modelos simples (em geral, lineares ou quadráticos) a respostas obtidas com planejamentos fatoriais ou planejamentos fatoriais ampliados. Já o deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

2.9 Validação de método

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. A fim de garantir que um novo

método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI, 2004)

A validação tem por objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, como por exemplo, para determinações qualitativas ou quantitativas. Ainda, a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003).

A fim de auxiliar no processo de validação as agências governamentais dispõem de guias para validação. No Brasil, por exemplo, tem-se da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2011). Alguns parâmetros que podem ser avaliados são: seletividade, efeito matriz, linearidade e faixa de trabalho, precisão, exatidão, limite de detecção e de quantificação.

2.9.1 Seletividade

Pode ser definida como a habilidade dos métodos de extração, separação, de purificação, de derivação, do sistema de separação e detecção, em realizar a discriminação entre o analito de interesse e outros compostos (SANCO, 2011). Isto é importante, pois a matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição e esses interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração dos mesmos.

A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas (INMETRO, 2011; RIBANI et al., 2004).

Para avaliar a seletividade são realizadas extrações e análise da amostra “branco” para verificar se a matriz é isenta dos compostos de interesse e também extração somente com os reagentes, chamado de “branco reagente”, a fim de avaliar se há contaminação dos mesmos.

2.9.2 Linearidade, curva analítica e faixa de trabalho

A linearidade avaliada é a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003). A ferramenta de quantificação mais comumente utilizada para quantificação é a curva analítica. Esta corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental (área/altura da banda cromatográfica)(eixo y) e a concentração do analito (eixo x) (RIBANI et al.,2004).

A curva analítica muitas vezes, produz uma equação de regressão linear (**Equação 2**). A partir dos pontos experimentais pode-se calcular o coeficiente de correlação (r), que permite estimar a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al., 2004). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e o Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2011) recomendam valores de r iguais ou superiores a 0,99 e 0,90, respectivamente.

$$y = ax + b \quad (2)$$

Onde: x e y: variáveis

a = coeficiente angular (inclinação da curva)

b= coeficiente linear (intersecção da curva com o eixo y, quando x=0)

Alguns procedimentos analíticos não demonstram linearidade mesmo após qualquer transformação. Nesses casos, a resposta analítica pode ser descrita por uma outra função que modela a concentração do analito na amostra (INMETRO, 2011). Em geral, recomenda-se verificar vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva analítica (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011).

Há diferentes formas de padronização da curva analítica, podendo ser: padronização externa, padronização interna, superposição de matriz e adição padrão. A escolha para cada é realizada de acordo com o tipo de análise e do tratamento utilizado para a amostra. A padronização interna bem como a padronização externa possibilita que as curvas analíticas sejam construídas com superposição da matriz, assim é feita adição do padrão da substância de interesse,

em diversas concentrações, em uma matriz similar à amostra e isenta dessa substância, denominada amostra “branco”, relacionando as áreas obtidas com as concentrações das soluções de padrões empregadas na construção da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

O padrão interno (PI) utilizado na padronização interna deve ser um analito que não está presente na amostra e que possua características similares aos analitos de interesse (RIBANI et al., 2004).

Todo experimento de determinação da faixa de trabalho é iniciado pela escolha de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. No limite inferior da faixa de concentração, o fator limitante é o valor do limite de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição.

2.9.3 Efeito matriz em cromatografia líquida

Os efeitos da matriz são conhecidos por um aumento ou uma supressão da resposta do analito, devido à co-eluição de componentes da matriz. Estes têm sido amplamente estudados e reconhecidos como uma fonte de erro na análise quantitativa de LC-MS-MS de amostras de alimentos (NIESSEN et al., 2006).

O efeito matriz pode ser calculado de várias formas. Para curvas que apresentam modelo linear de equação o efeito matriz pode ser calculado através dos coeficientes angulares (inclinação) das equações de reta, obtidas por uma curva preparada no solvente e outra no extrato da matriz “branco” (FERRER et al., 2011). Dessa forma pode ser calculado conforme a **equação 3**:

$$\text{Efeito matriz}\% = \left(\frac{S_m - S_s}{S_s} \right) \times 100 \quad (3)$$

Sendo:

S_m = Coeficiente angular da curva na matriz

S_s = Coeficiente angular da curva no solvente

Outra forma de avaliar o efeito matriz é através da comparação das áreas obtidas. Para isso, injetam-se replicatas de soluções de mesma concentração preparada no solvente e no extrato da amostra “branco”. Isto pode ser demonstrado através da **equação 4** (GOSETTI *et al.*, 2010; SANCO 2011).

$$\text{Efeito matriz}\% = \left(\frac{X_1 - X_2}{X_2} \right) \times 100 \quad (4)$$

onde:

X_1 = Média das áreas da solução analítica de cada composto avaliado, preparado no extrato da matriz, numa dada concentração;

X_2 = Média das áreas da solução analítica de cada composto avaliado, preparada em solvente, numa dada concentração.

Dessa forma, verifica-se se a matriz exerce efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (decréscimo de sinal) sobre o resultado da análise. O efeito matriz começa a exercer influência nas análises quando o resultado for superior a 20% (FERRER *et al.*, 2011). Neste caso, recomenda-se a construção das curvas analíticas no extrato da matriz para minimizar este efeito.

2.9.4 Limite de Detecção e quantificação

Limite de detecção (LOD, do inglês *Limit Of Detection*) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003). Pode-se definir como limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit Of Quantitation*) a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

Existem diversas formas de se calcular o limite de detecção e quantificação, sendo que o limite de detecção corresponde à concentração que resulte em uma

relação entre o sinal analítico e o ruído igual a 3 vezes e o de quantificação na relação sinal/ruído superior a 10:1 (ANVISA, 2003). Vale ressaltar que ambos podem ser determinados experimentalmente.

O LOD pode ser calculado através da **Equação 5**, na qual o número (n) de replicatas de análise deve expressar a rotina do laboratório, pois uma quantidade muito elevada de replicatas pode superestimar o limite de detecção. É recomendado um mínimo de 7 replicatas para a determinação do LOD (INMETRO, 2011).

$$LOD = t \times s \quad (5)$$

Onde: s corresponde ao desvio-padrão amostral e t refere-se a distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança. Por exemplo, na análise de 7 alíquotas, tem-se $7-1 = 6$ graus de liberdade de uma matriz de branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito. Para esses graus de liberdade, o valor de t unilateral, para 99% de confiança é 3,143. Logo, o LOD será igual a 3,143 vezes o desvio padrão amostral (INMETRO, 2011).

O limite de quantificação pode ser calculado de forma que a concentração do analito corresponda ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios padrão. No entanto, a maneira mais realista é determinar o LOQ experimentalmente (**Equação 6**), com base em critérios de aceitação pré-definidos (INMETRO, 2011).

$$LOQ = m - \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}} \quad (6)$$

Sendo:

m = média dos resultados de injeções de amostras branco fortificadas

n = número de replicatas

s = desvio padrão dos resultados obtidos para os brancos fortificados.

t = distribuição de Student, para distribuição bicaudal com nível de confiança de 99%.

O LOD e o LOQ são avaliados através dos resultados das análises de no mínimo sete replicatas de brancos fortificados (para cada limite), contendo a mistura dos compostos em estudo. Sendo que para o LOD a concentração para fortificação seja na menor concentração da curva analítica (abaixo do LOQ) e para o LOQ com concentração selecionada acima do LOD (dentro da faixa de concentração da curva analítica) (INMETRO, 2011).

2.9.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é avaliada numericamente através da tendência/recuperação. Esta pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito (*spike*) (INMETRO, 2011).

As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações: baixa, média e alta, da faixa de uso do método (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011). A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que a presente na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação. A recuperação é calculada de acordo com a **Equação 7** (INMETRO, 2011):

$$Recuperação = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (7)$$

Onde:

C_1 = concentração do analito na amostra fortificada,

C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada,

C_3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

O intervalo aceitável para as recuperações na análise de resíduos geralmente são de 70 a 120% com precisão de 20% (SANCO, 2011).

Outra forma complementar de avaliar a exatidão do método pode ser através do uso de um padrão de controle (PC), do inglês *surrogate*. Este é adicionado às amostras em uma concentração conhecida com a finalidade de monitorar possíveis discrepâncias nos valores de recuperação, e conseqüentemente detectar problemas durante a extração. Vale ressaltar que este padrão deve possuir características similares aos analitos de interesse.

2.9.6 Precisão

É o grau de concordância entre resultados analíticos independentes obtidos pela aplicação do procedimento experimental sob condições estipuladas. Quanto menor for a parte aleatória dos erros experimentais que afetem os resultados, mais preciso será o procedimento (SANCO, 2011). É comumente determinada para circunstâncias específicas de medição e as três formas mais comuns de expressá-la são: por meio da repetibilidade, precisão intermediária e da reprodutibilidade (ANVISA, 2003).

A repetibilidade corresponde à concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. Precisão intermediária é o grau de concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. A reprodutibilidade é dada pela concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopeias. As três formas de avaliação da precisão são usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação (ANVISA, 2003). O coeficiente de variação (CV, usualmente expresso em %), também conhecido como desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*), é calculado da seguinte forma, **Equação 8** (INMETRO, 2011):

$$RSD = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad (8)$$

Onde:

s = Estimativa do desvio padrão; x_m = Média aritmética das replicatas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento da parte experimental deste trabalho consistiu na otimização e validação do método de preparo de amostra QuEChERS para a extração de resíduos de agrotóxicos em suco de laranja integral e posterior quantificação por UHPLC-MS/MS.

Na etapa de validação foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos: seletividade, linearidade, curva analítica e faixa de trabalho, efeito matriz, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão (em termos de repetibilidade e precisão intermediária).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria.

3.1 Instrumentação

- ✓ Agitador vortex Biomixer, modelo QL-901- (Brasil);
- ✓ Balança analítica AND, modelo SV-200 - (Japão);
- ✓ Balança analítica Shimadzu, modelo UX420H - (Japão);
- ✓ Balança analítica Shimadzu, modelo AUW 220D - (Japão);
- ✓ Centrífuga refrigerada Nova Técnica, modelo NT 825, com rotação máxima 3500 rpm (Brasil);
- ✓ Centrífuga refrigerada SOLAB, modelo SL 703, com rotação máxima 10000 rpm - (Brasil);
- ✓ Purificador de água Milli-Q Direct 3UV - resistividade 18,2 MΩcm - (França);
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável marca Brand - (Alemanha) e marca Eppendorf - (Canadá);
- ✓ Sistema UHPLC-MS/MS equipado com:
 - Cromatográfico líquido Waters (EUA);
 - Coluna analítica ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 1,7 μm - 2,1 x 50 mm, Waters (EUA);

- Detector MS do tipo Triplo Quadrupolo, modelo Xevo TQ (EUA);
- Interface/Fonte de Ionização por eletronebulização (EUA);
- Gerador de nitrogênio Atlas (EUA);
- Sistema controlador de solventes (sistema binário de bombas) para operação de gradientes a alta pressão (EUA);
- Sistema de injeção com agulha de Poli (éter-éter-cetona) (PEEK) dentro da agulha de aço (EUA);
- Sistema de aquisição de dados através do *software Masslynx* 4.1(Waters, EUA).

3.2 Materiais, reagentes e solventes

- ✓ Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 mL;
- ✓ Filtro de nylon para seringa (13 mm de diâmetro e 0,2 µm de porosidade)
- ✓ Tubos “ependorf” de 2,0 mL;
- ✓ Tubos de polipropileno de fundo cônico, com tampas de rosquear, capacidade de 50 e 15 mL;
- ✓ Vidraria comum de laboratório;
- ✓ Acetato de sódio anidro (J.T. Baker - México);
- ✓ Acetato de amônio (Sigma aldrich, EUA)
- ✓ Acetato de sódio anidro (J.T. Baker - México);
- ✓ Amina primária secundária (PSA) com tamanho de partículas de 40 µm - Bondesil (Agilent Technologies - EUA);
- ✓ Citrato de sódio diidratado (Sigma Aldrich, EUA)
- ✓ Cloreto de sódio (J.T. Baker - EUA);
- ✓ Octadecilsilano (C18) com tamanho de partículas de 40 µm – Bondesil (Agilent Technologies - EUA);
- ✓ Padrões sólidos dos agrotóxicos, adquiridos da firma Dr. Ehrenstorfer, Alemanha.
- ✓ Hidrogenocitrato de sódio sesquidratado (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro (J.T. Baker - Japão);
- ✓ Gás argônio 6.0 usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS (White Martins, Brasil);

- ✓ Acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker - EUA);
- ✓ Ácido acético glacial, grau HPLC (J.T. Baker - EUA);
- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct 3UV (resistividade de 18,2 M cm);

3.3 Preparo das soluções analíticas

Foram preparadas soluções estoque individuais na concentração de 1000 mg L⁻¹ de cada agrotóxico em estudo, levando em consideração a pureza dos padrões sólidos. Todos os compostos foram preparados em acetonitrila grau HPLC exceto para o composto carbendazim que foi utilizado uma solução de acetonitrila 8% HCl para total solubilização do padrão sólido. Informações tais como, pureza, classe, grupo químico, fórmula molecular, LMR dos compostos analisados podem ser vistas na **Tabela 2** (ALAN WOOD, 2012; PAN, 2012; USDA, 2013). As fórmulas estruturais dos compostos estudados estão apresentadas no **Anexo 2**. A diluição destas soluções foi realizada em duas etapas: primeiramente preparou-se uma mistura das soluções na concentração de 5 mg L⁻¹ e a seguir a 1 mg L⁻¹, utilizando-se acetonitrila.

O padrão de controle e padrão interno utilizados foram preparados individualmente na concentração de 10 mg L⁻¹.

As soluções estoque bem como as posteriores diluições foram armazenadas em frascos âmbar à temperatura de - 4 °C.

Tabela 2. Informações sobre os agrotóxicos estudados e Limites Máximos de Resíduos.

Composto	Pureza (%)	Classe ^a	Grupo Químico	Fórmula Molecular	M.M. (g mol ⁻¹)	LMR ^b (mg kg ⁻¹)		Br
						EUA	Codex UE	
3-OH-Carbofuran ^e	97,0	I	Carbamato	C ₁₂ H ₁₅ NO ₄	237,25	-	-	-
Acefato	99,0	I	Organofosforado	C ₄ H ₁₀ NO ₃ PS	183,16	0,02	-	0,02
Acetamiprido	99,0	I	Neonicotinóide	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	222,7	0,5	1	1
Ametrina	99,0	H	Triazina	C ₉ H ₁₇ N ₅ S	227,3	-	-	0,02
Atrazina	99,5	H	Triazina	C ₈ H ₁₄ CIN ₅	215,7	-	-	NA
Azoxistrobina	99,5	F	Estrobulurina	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	403,4	15	15	15
Benornil	98,0	F	Benzimidazol	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	290,3	-	-	-
Boscalida	99,5	F	Anilida	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	343,2	1,6	2	2
Bromoconazole	98,8	F	Triazol	C ₁₃ H ₁₂ BrCl ₂ N ₃ S	377,1	-	-	NA
Buprofezina	99,0	I e A	Tiadiazinona	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS	305,4	2,5	1	1
Carbaril	98,5	I	Carbamato de naftila	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	201,2	10	15	0,05
Carbendazim ^f	99,0	F	Benzimidazol	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	191,2	-	1	-
Carbofurano	98,5	I, A e N	carbamato	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221,3	-	-	0,05
Carboxina	99,9	F	Carboxanilida	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ S	235,3	-	-	NA
Cianazina	99,0	H	Triazina	C ₁₀ H ₁₄ CIN ₅	239,7	-	-	NA
Clomazone	95,5	H	Isoxazolidinona	C ₁₂ H ₁₄ CINO ₂	239,7	-	-	NA
Deltametrina	99,0	I e Fo	Piretróide	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	505,2	0,05	0,02	0,05
Demeton-S-metil-sulfona	97,0	A e I	Organofosforado	C ₆ H ₁₅ O ₆ PS ₂	262,28	-	-	NA
Diazinona	96,0	A e I	Organofosforado	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	304,35	-	-	0,7
Diclotofós	97,5	I	Organofosforado	C ₈ H ₁₆ NO ₅ P	237,19	-	-	NA
Difenoconazol	99,0	F	Triazol	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	406,26	0,6	-	0,1
Dimetoato ^g	98,5	I e A	Organofosforado	C ₅ H ₁₂ NOPS ₂	229,3	2	5	0,02
Dimetomorfe	99,0	F	Morfolina	C ₂₁ H ₂₂ CINO ₄	387,86	-	-	NA
Dimoxistrobina	99,0	F	Amida	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₃	326,39	-	-	-
Diurom	97,5	H	Uréia	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	233,09	0,05	-	0,1
Dodemorfe	98,0	F	Morfolina	C ₁₈ H ₃₅ NO	281,48	-	-	NA
Epoxiconazol	99,0	F	Triazol	C ₁₇ H ₁₃ CIFN ₃ O	329,8	-	-	NA
Espinosade A	91,0	I	Espinosinas	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₀	731,96	0,3	0,3	0,3
Etiofencarbe sulfona ^h	98,0	I	Metil-carbamato	C ₁₁ H ₁₅ NO ₄ S	257,31	-	-	NA
Etiofencarbe sulfóxido	98,5	I	Metil-carbamato	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃ S	241,31	-	-	NA
Etoprofos	93,0	N e I	Organofosforado	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₂	242,3	-	-	NA
Fempiroximato	97,5	A	Pirazol	C ₂₄ H ₂₇ N ₃ O ₄	421,49	0,5	0,5	0,5
Fempromorfe	94,5	F	Morfolina	C ₂₀ H ₃₃ NO	303,5	-	-	NA
Fenamifós	92,5	N	Organofosforado	C ₁₃ H ₂₂ NOPS ₃	303,4	-	-	NA
Fenazaquina	99,0	A	Quinazolina	C ₂₀ H ₁₂ N ₂ O	306,4	-	-	NA

Tabela 2. Informações sobre os agrotóxicos estudados e Limites Máximos de Resíduos (continuação).

Composto	Pureza (%)	Classe ^a	Grupo Químico	Fórmula Molecular	M.M. (g mol ⁻¹)	LMR ^b (mg kg ⁻¹)		Br	
						EUA	Codex		
Flusilfop- <i>p</i> -butílico	97,0	H	Piridina	C ₁₉ H ₂₀ F ₃ NO ₄	383,36	0,03	-	0,1	0,05
Flusilazol	98,0	F	Triazol	C ₁₆ H ₁₅ F ₂ N ₃ Si	315,39	-	-	-	NA
Flutolanil	99,0	F	Benzanilida	C ₁₇ H ₁₆ F ₃ NO ₂	323,31	-	-	-	-
Flutriafol	99,5	F	Triazol	C ₁₆ H ₁₃ F ₂ N ₃ S	301,3	-	-	-	NA
Imazalil	97,5	F	Imidazol	C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O	297,18	10	5	5	5
Linurom	99,4	H	Uréia	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	249,1	-	-	-	NA
Linurom deuterado ^c	99,9	-	Uréia	C ₉ D ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	259,16	-	-	-	-
Mecarbam	98,0	A e I	Organofosforado	C ₁₀ H ₂₀ NO ₅ PS ₂	329,37	-	-	-	-
Mefosfolam	97,0	I	Fosforamidata	C ₈ H ₁₆ NO ₃ PS ₂	269,32	-	-	-	-
Mepromil	99,0	F	Benzanilida	C ₁₇ H ₁₉ NO ₂	269,34	-	-	-	-
Metalaxil	99,5	F	Acilalaninato	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄ S	279,3	1	-	0,5	NA
Metiocarbe sulfona	99,0	I	Carbamato de fenila	C ₁₁ H ₁₅ NO ₄ S	257,31	-	-	-	NA
Metobromuron	98,0	H	Fenil uréia	C ₉ H ₁₁ BrN ₂ O ₂	259,1	-	-	-	-
Metolaclo	99,0	H	Cloro acetanilida	C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂	283,79	-	-	-	NA
Mevinfós	92,0	I e A	Organofosforado	C ₇ H ₁₃ O ₆ P	224,1	-	-	-	NA
Monocrotofós	99,0	I	Organofosforado	C ₇ H ₁₄ NO ₅ P	223,2	-	-	-	NA
Monolinurom	99,0	H	Fenil uréia	C ₉ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	214,65	-	-	-	NA
Ometoato	98,0	A e I	Organofosforado	C ₅ H ₁₂ NO ₄ PS	213,19	-	-	-	-
Paraoxon etílico	99,0	I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₄ NO ₆ P	275,2	-	-	-	NA
Penconazol	99,2	F	Triazol	C ₁₃ H ₁₅ Cl ₂ N ₃	284,18	-	-	-	NA
Picoxistrobina	98,5	F	Metóxiacrilato	C ₁₈ H ₁₆ F ₃ NO ₄	367,32	-	-	-	NA
Piridafentona	99,0	I e A	Organofosforado	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₄ PS	340,3	-	-	-	1
Pirifenox	96,5	F	Piridina	C ₁₄ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	295,16	-	-	-	NA
Pirimifós metílico	99,0	I e A	Organofosforado	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	305,3	-	-	-	5
Piriproxifem	99,0	I	Piridina	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃	321,37	0,5	0,5	0,6	1
Propanil	99,0	H	Anilida	C ₉ H ₉ Cl ₂ NO	218,08	-	-	-	-
Propiconazol	97,5	F	Triazol	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	342,2	-	-	-	NA
Rotenona	93,8	I	Benzopirano	C ₂₃ H ₂₂ O ₆	394,42	-	-	-	NA
Simazina	98,0	H	Triazina	C ₇ H ₁₂ CIN ₅	201,7	0,25	-	0,01	0,02
Tebuconazol	98,0	F	Triazol	C ₁₆ H ₂₂ CIN ₃ O	307,8	-	-	-	5
Tebuconozida	97,0	I	Diacilhidrazina	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂	352,47	0,8	2	2	0,5
Terbutilazina	99,0	H	Triazina	C ₉ H ₁₆ CIN ₅	229,71	-	-	-	-
Tetraconazol	97,5	F	Triazol	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ F ₄ N ₃ O	372,1	-	-	-	NA
Tiabendazol	99,0	F	Benzimidazol	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	201,3	10	7	5	10
Tiaproprido	98,0	I	Neonicotinóide	C ₁₀ H ₉ CIN ₄ S	252,7	-	-	-	0,1

Tabela 2. Informações sobre os agrotóxicos estudados e Limites Máximos de Resíduos (*continuação*).

Composto	Pureza (%)	Classe ^a	Grupo Químico	Fórmula Molecular	M.M. (g mol ⁻¹)	LMR ^b (mg kg ⁻¹)		
						EUA	Codex	Br
Tiobencarbe	98,0	H	Tiocarbamato	C ₁₂ H ₁₆ CINOS	257,78	-	-	NA
Tiofanato-metílico	99,0	F	Benzimidazol	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S ₂	342,39	-	-	-
Triadimefom	99,5	F	Triazol	C ₁₄ H ₁₆ CIN ₃ O ₂	293,8	-	-	NA
Triazofós	81,0	I, A e N	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS	313,3	-	-	0,01
Trifenilfosfato ^d	99,5	I	Organofosforado	C ₁₈ H ₁₅ O ₄ P	326,28	-	-	-
Triflumizol	98,0	F	Imidazol	C ₁₅ H ₁₅ ClF ₃ N ₃ O	345,7	-	-	NA
Triflumurom	99,5	I	Benzoluréia	C ₁₅ H ₁₀ ClF ₃ N ₂ O ₃	358,7	-	-	-
Vamidationa	98,0	I	Organofosforado	C ₈ H ₁₈ NO ₄ PS ₂	287,3	-	-	NA

^a Leia-se: A como Acaricida, F como Fungicida, Fo como Formicida, H como Herbicida, I como Inseticida e N como Nematicida.

^b Os LMRs em mg kg⁻¹ são referentes à laranja ou frutas cítricas. Fonte: USDA, 2013.

^c Padrão de controle

^d Padrão Interno

^e Os LMRs referem-se à soma de 3-OH-carbofurano e carbofurano, expresso como carbofurano.

^f Os LMRs de carbendazim, benomil e tiofanato-metílico são expressos em carbendazim.

^g Os LMRs referem-se à soma de dimetoato e ometoato, expresso como dimetoato.

^h Os LMRs referem-se à soma de etofencarbe sulfona e sulfoxido, expresso como etofencarbe.

3.4 Escolha e processamento da amostra “branco”

Foram adquiridas laranjas do tipo valência, por ser uma das variedades mais consumida e também, por estar disponível no período avaliado, de uma cooperativa de citricultores ecológicos localizada na cidade de Montenegro – RS.

As laranjas foram processadas em um aparelho elétrico, a fim de tornar o processo de extração do suco o mais próximo possível ao processo caseiro. Uma peneira plástica foi empregada para retirar o excesso de material sólido. O suco foi condicionado em frascos de polipropileno de 200 mL, devidamente identificados, e armazenados em freezer com temperatura inferior a -10 °C. Na realização dos ensaios esperou-se que a amostra “branco” atingisse a temperatura ambiente e foi realizada a homogeneização por 30 s manualmente.

3.5 Otimização das condições de detecção por UHPLC-MS/MS

Os parâmetros empregados no espectrômetro de massas, como temperatura de dessolvatação e voltagem do capilar (entre outras), foram previamente otimizados pelo laboratório. O espectrômetro de massas operou no modo de espectrometria de massa sequencial, no modo de varredura MRM e ionização por eletronebulização no modo positivo.

A primeira etapa a ser realizada com os compostos selecionados foi a montagem do método. Para tal, fez-se uso da “*Quanpedia*”, do UHPLC-MS/MS, em que constam compostos com os íons precursores e produtos, com suas respectivas energias do cone e de colisão. Portanto, as informações relativas a alguns dos compostos utilizados neste trabalho foram retiradas deste banco de dados e os demais foram infundidos com uma solução analítica da mistura dos agrotóxicos estudados ($500 \mu\text{g L}^{-1}$), no modo combinado, sem coluna e com fase móvel contendo 0,1% de ácido fórmico. Após a infusão e consequentemente determinação das transições, os dados foram inseridos no banco de dados *Quanpedia*.

A fim de verificar a intensidade do sinal e o tempo de retenção dos analitos fez-se a análise de uma solução analítica de todos os agrotóxicos de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ preparada no solvente (acetonitrila grau HPLC).

A fase móvel (FM) inicialmente consistiu do uso do aditivo ácido fórmico aos solventes utilizados. Porém, foi verificado que alguns dos compostos que já estavam na *Quanpedia* foram infundados com a adição do aditivo formiato de amônio. Dessa forma, optou-se por testar uma fase móvel contendo os dois aditivos, ácido fórmico e formiato de amônio. A FM que mostrou ser mais eficaz foi aquela em que se utilizou os dois aditivos: Solvente (A) Solução aquosa 98% de água e 2% metanol, contendo 0,1% ácido fórmico, 5 mM de formiato de amônio e Solvente (B) metanol com 0,1% ácido fórmico, 5 mM de formiato de amônio.

A curva analítica foi preparada com soluções de todos agrotóxicos em acetonitrila nas seguintes concentrações 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e optou-se para a linearidade da curva, os pontos 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 20,0; 50,0; 100,0; 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ devido aos compostos apresentarem faixas lineares diferentes. Isto ocorre, pois alguns compostos não foram detectáveis nas concentrações mais baixas da curva analítica.

Por fim, foram avaliadas as transições escolhidas para quantificação e confirmação dos compostos em estudo. Sendo que a transição de maior intensidade corresponde àquela a ser empregada para a quantificação do analito e a segunda de maior intensidade àquela a ser usada para a confirmação do mesmo.

3.6 Otimização do método QuEChERS para análise de resíduos de agrotóxicos em suco de laranja integral

Para os testes iniciais foram realizados ensaios a partir do QuEChERS original e do QuEChERS modificado, fazendo uso dos sorventes PSA e C₁₈ e dos sais de extração sulfato de magnésio, cloreto de sódio, acetato de amônio, acetato de sódio, hidrogenocitrato de sódio sesquidratado e citrato de sódio diidratado.

Com isso, foram realizados oito testes, sendo que foram testados quatro tipos de extrações e dois processos de limpeza. Cada teste foi realizado com o mesmo procedimento de fortificação, agitação, centrifugação. A diferença entre eles, como já foi citado é a variação dos sais, diferentes sorventes e acetonitrila, como pode ser visto na **Figura 6**. Dessa forma, todos os ensaios foram realizados na seguinte sequência:

- ✓ 10 mL de suco de laranja integral.
- ✓ Fortificação no nível $100 \mu\text{g L}^{-1}$: agitação em vortex 1 min. Para os brancos foi feita diretamente a adição da acetonitrila, sem a etapa de fortificação.
- ✓ 10 mL de acetonitrila (acidificada ou não).
- ✓ Agitação manual 1min.
- ✓ Adição dos sais.
- ✓ Agitação manual por 1 min e centrifugação 3400 rpm por 8min.
- ✓ 1 mL do sobrenadante é retirado e adicionado aos tubos contendo o sulfato de magnésio e os sorventes.
- ✓ Agitação em vortex 1 min e centrifugação a 10000 rpm por 3 minutos.
- ✓ Filtração do extrato final.
- ✓ Diluição em água ultra-pura (5 vezes).
- ✓ Injeção no UHPLC-MS/MS.

Os testes foram realizados com curva analítica, nos níveis de concentrações já citados, e triplicatas da fortificação no nível $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Os volumes de 10 mL de suco de laranja integral, 10 mL de acetonitrila (acidificada ou não), bem como a quantidade de 4,0 g de sulfato de magnésio foram utilizados em todos os testes. O procedimento de extração, adição de sais e solvente, entre os testes diferiu na seguinte forma: os testes 1 e 2 (T1 e T2) utilização acetato de amônio e acetonitrila 1% ácido acético, para os testes 3 e 4 (T3 e T4) empregou-se o acetato de sódio e acetonitrila 1% ácido acético, os testes 5 e 6 (T5 e T6) foi baseado no QuEChERS citrato, ou seja, 1,0 g de Cloreto de sódio + 0,5 g de higenocitrato + 1,0 g de citrato de sódio e acetonitrila; para os testes 7 e 8 (T7 e T8) fez se uso do método QuEChERS original, 1,0 g de cloreto de sódio e acetonitrila. Os processos de limpeza empregados para os testes 1, 3, 5 e 7 (T1,T3,T5,T7) foram 50 mg de PSA; enquanto que para os testes 2, 4, 6 e 8 (T2,T4,T6,T8) utilizou-se 50 mg de PSA+50 mg de C_{18} .

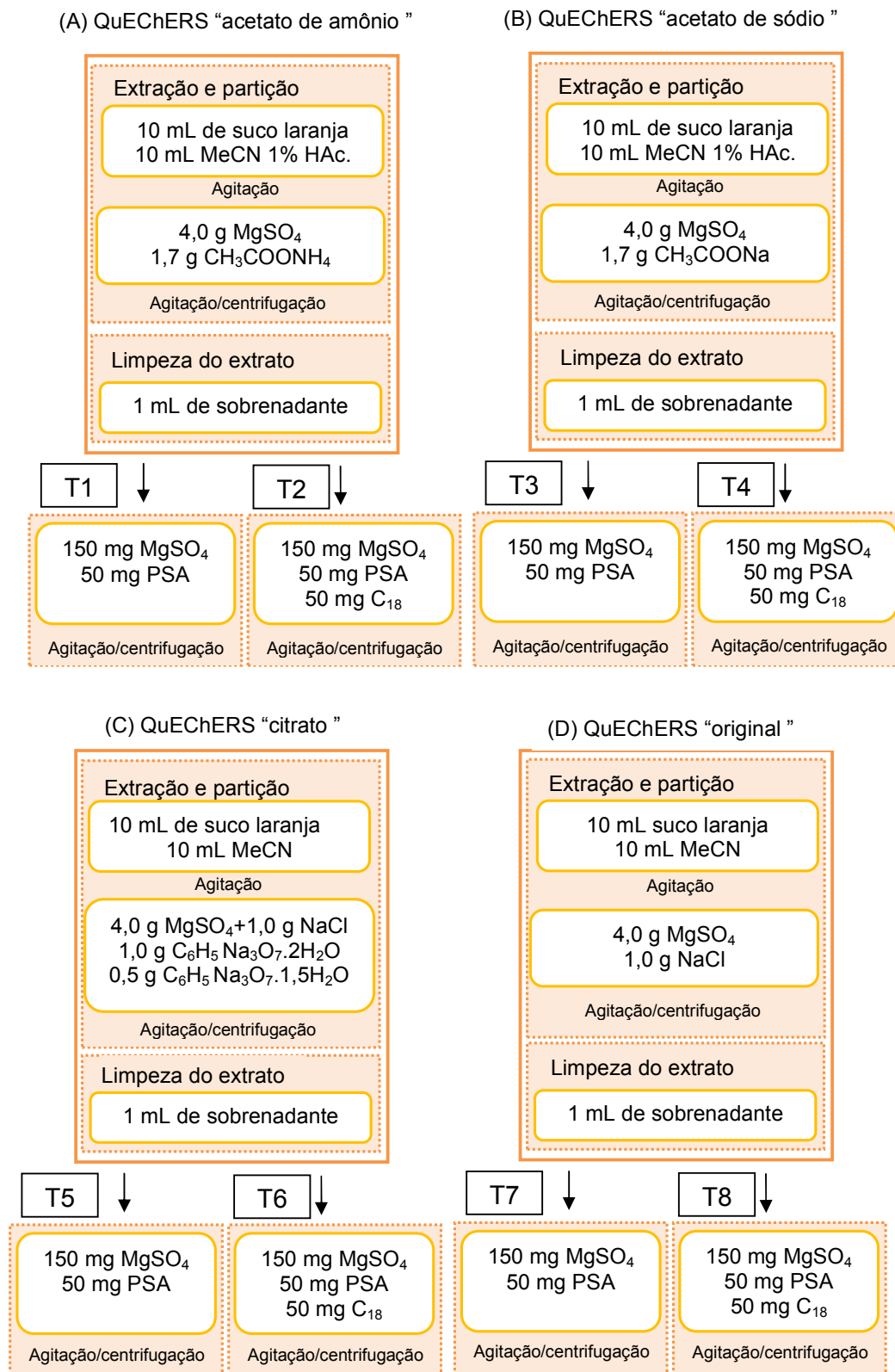


Figura 6. Representação dos testes prévios realizados com variações do método QuEChERS.

3.6.1 Planejamento Fatorial 2^4

Com a escolha do melhor método de extração, Teste 3 (T3), realizou-se, a fim de otimizar o método, um planejamento fatorial de quatro variáveis em que variou-se as quantidades de acetato de sódio, PSA, C_{18} e NaOH. As variáveis escolhidas foram de forma com que fosse possível avaliar o procedimento de extração e também, limpeza do extrato. De acordo com o T3, a utilização do meio tamponado com acetato de sódio melhorou a eficiência da extração de agrotóxicos, portanto, optou-se por testar variações da quantidade do mesmo. Através de estudos encontrados na literatura, demonstrados na revisão bibliográfica (item 2.7.1) desta dissertação, verificou-se que a adição de uma solução de hidróxido de sódio 5 mol L^{-1} em matrizes ácidas, como o limão, proporciona melhores recuperações; e através deste a fim de verificar a melhoria na recuperação dos compostos estudados a variável NaOH foi escolhida (KITTLAUS et al., 2012). Na etapa de limpeza do extrato o PSA e o C_{18} apresentaram valores próximos na recuperação dos compostos, tendo em vista que nos testes preliminares não foram testadas variações desses sorventes não ficou claro o quanto influenciará a utilização dos mesmos para limpeza e assim foram adicionados as variáveis a serem estudadas.

O planejamento fatorial 2^4 foi empregado, com o uso de repetição de triplicata do ponto central e extrapolação dos níveis das variáveis. Portanto, foram realizados 16 ensaios gerados pelo planejamento fatorial 2^4 , 3 ensaios de repetição do ponto central e 8 ensaios das extrapolações dos níveis, totalizando 27 ensaios a serem realizados, como mostra a **Tabela 3**. As quantidades de suco de laranja (10 mL), acetonitrila acidificada (10 mL) e sulfato de magnésio (4 g) permaneceram constantes.

Tabela 3. Condições utilizadas para avaliação do planejamento fatorial com quatro variáveis.

Ensaio	NaOH (μL)	C ₁₈ (mg)	PSA (mg)	CH ₃ COONa (g)
1	50,0	20,0	20,0	1,0
2	150,0	20,0	20,0	1,0
3	50,0	60,0	20,0	1,0
4	150,0	60,0	20,0	1,0
5	50,0	20,0	60,0	1,0
6	150,0	20,0	60,0	1,0
7	50,0	60,0	60,0	1,0
8	150,0	60,0	60,0	1,0
9	50,0	20,0	20,0	2,4
10	150,0	20,0	20,0	2,4
11	50,0	60,0	20,0	2,4
12	150,0	60,0	20,0	2,4
13	50,0	20,0	60,0	2,4
14	150,0	20,0	60,0	2,4
15	50,0	60,0	60,0	2,4
16	150,0	60,0	60,0	2,4
17	100,0	40,0	40,0	1,7
18	100,0	40,0	40,0	1,7
19	100,0	40,0	40,0	1,7
20	0,0	40,0	40,0	1,7
21	200,0	40,0	40,0	1,7
22	100,0	0,0	40,0	1,7
23	100,0	80,0	40,0	1,7
24	100,0	40,0	0,0	1,7
25	100,0	40,0	80,0	1,7
26	100,0	40,0	40,0	0,3
27	100,0	40,0	40,0	3,1

3.7 Validação do método QuEChERS para análise de resíduos de agrotóxicos em suco de laranja integral

A validação do método foi feita através dos parâmetros analíticos descritos no item 2.9. Os níveis de fortificação avaliados para calcular a recuperação (exatidão) e RSD (precisão) foram 10, 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. O nível 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ corresponde ao avaliado para o LOQ, no entanto, alguns compostos que não existe linearidade em baixas concentrações foi realizado um nível adicional somente para esses compostos na concentração de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Para a verificação do limite de detecção foram feitas fortificações nos níveis 2,5 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para os compostos com faixa linear maior fez-se uso da fortificação 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Vale ressaltar, que os níveis de fortificação foram escolhidos levando-se em consideração os LMR estabelecidos pela legislação nacional e que as concentrações relativas aos níveis de fortificação na matriz 10,0; 25,0; 50,0; 100,0

$\mu\text{g L}^{-1}$, correspondem no solvente a 2,0; 5,0; 10,0 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, devido à diluição do extrato de 1:4 em água ultra-pura.

A verificação da precisão intermediária foi realizada usando o mesmo procedimento de preparo de amostra no nível 50 g L^{-1} , porém em dias diferentes.

A avaliação da linearidade das curvas analíticas, a partir das soluções analíticas contendo a mistura dos agrotóxicos em estudo, foi preparada curvas no solvente e no extrato da matriz nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 20,0; 50,0; 100,0; 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo que ambos os conjuntos de soluções foram injetadas sete vezes. Os dados obtidos permitiram a determinação da equação, do coeficiente de determinação e a faixa linear para cada composto.

A adição de padrões analíticos em diferentes estágios do procedimento analítico pode auxiliar na localização de fontes de erros (SANCO, 2010). Dessa forma, a fim de avaliar a estabilidade do instrumento utilizou-se como padrão interno o trifenilfosfato e como padrão de controle o linurom deuterado. O padrão interno foi adicionado a 200 μL do extrato final e 800 μL de água ultra-pura, na quantidade de 20 μL de uma solução de 1,0 mg L^{-1} . O linurom deuterado foi adicionado antes do procedimento de extração e na mesma concentração da mistura dos compostos utilizados para as fortificações, com objetivo de avaliar a eficiência do procedimento de extração. Ambos os padrões não foram utilizados para fins de cálculos, apenas para os fins citados.

3.8 Aplicação do método em amostras reais

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em 14 amostras de suco de laranja integral. As laranjas foram obtidas em supermercados, feiras e fruteiras da cidade de Santa Maria-RS. O processo de obtenção do suco ocorreu conforme descrito no item 3.4 dessa dissertação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Otimização do Sistema Cromatográfico UHPLC - MS/MS para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em suco de laranja

Foram utilizados dois solventes para Fase Móvel (FM); Solvente (A) Solução aquosa 98% de água e 2% metanol, contendo 0,1% ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio; e Solvente (B) metanol com 0,1% ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio. A escolha por dois aditivos na fase móvel visto que os mesmos geraram melhores intensidades e respostas reprodutíveis. Para os analitos em estudo quando de utilização de ácido fórmico no modo de ionização positivo há formação de íons $[M + H]^+$ e, no caso do formiato de amônio ocorre a formação de adutos de amônio $[M + NH_4]^+$ os quais impedem a formação de adutos de sódio com os agrotóxicos, os quais podem ser formados espontaneamente, por alguns analitos quando se utiliza a ionização por ESI (CHIARADIA, 2009). Empregou-se gradiente linear (**Tabela 4**) com vazão de $0,225 \text{ mL min}^{-1}$, com volume de injeção $10 \mu\text{L}$ e tempo de corrida total 10 minutos.

Tabela 4. Gradiente Linear da fase móvel.

Tempo (min)	Vazão (mL min^{-1})	%A	%B
Inicial	0,225	95	5
0,25	0,225	95	5
7,75	0,225	0	100
8,50	0,225	0	100
8,51	0,225	95	5
10,0	0,225	95	5

As condições empregadas para o espectrômetro de massas foram:

- ✓ Temperatura da coluna: $40 \text{ }^\circ\text{C}$;
- ✓ Pressão: 15000 psi;
- ✓ capilar: 2,0 kV;
- ✓ Temperatura de dessolvatação: $500 \text{ }^\circ\text{C}$;
- ✓ Vazão gás: 600 L h^{-1} ;
- ✓ Vazão no cone: 80 L h^{-1} ;
- ✓ Vazão gás colisão (Argônio): $0,15 \text{ mL min}^{-1}$.

✓ Temperatura da fonte: 150 °C.

Os parâmetros energia de colisão, transição relativas ao MRM utilizados para cada agrotóxico, verificados através da infusão da solução de 500 µg L⁻¹ de uma mistura dos agrotóxicos estudados, conforme descrito no item 3.6, estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Agrotóxicos com seus respectivos tempo de retenção, íons precursores, íons produto e energia de colisão.

t _R (min)	Composto	1ª Transição Quantificação			2ª Transição Confirmação		
		Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Energia de colisão (ev)	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Energia colisão (ev)
1,88	Ometoato	214,1	125,1	22	214,1	183,1	11
2,65	Carbendazim	192,1	132,1	28	192,1	160,1	18
2,65	Demeton-S-metil-sulfona	263,0	169,0	17	263,0	121,0	17
2,81	Monocrotofós	224,1	127,1	16	224,1	98,1	12
3,04	Tiabendazol	202,0	175,0	25	202,0	131,0	30
3,05	Dicrotofós	238,0	193,0	10	238,0	112,0	10
3,09	Etiofencarbe sulfona	258,0	107,0	18	258,0	201,1	5
3,16	Etiofencarbe sulfóxido	242,1	107,1	18	242,1	185,1	8
3,45	Vamidationa	288,0	118,0	28	288,0	146,0	10
3,47	3-OH-Carbofuran	238,0	163,0	16	238,0	181,0	10
3,47	Dimetoato	230,1	125,0	20	230,1	199,0	10
3,51	Acetamiprido	223,0	126,0	20	223,0	56,1	15
3,67	Metiocarbe Sulfona	258,1	107,1	38	258,1	122,1	19
3,85	Tiacloprido	253,0	126,0	20	253,0	90,1	40
3,94	Mevinfós	225,1	127,1	15	225,1	193,1	8
4,47	Cianazina	241,0	214,0	17	241,0	96,0	25
4,63	Tiofanato metílico	343,1	151,0	21	343,1	311,1	11
4,64	Mefosfolan	270,1	140,0	24	270,1	75,1	22
4,65	Simazina	202,0	96,0	22	202,0	124,0	16
4,73	Carbofurano	222,1	165,1	16	222,1	123,0	16
4,89	Carboxin	236,0	143,0	16	236,0	87,0	22
4,93	Carbaril	202,0	145,0	22	202,0	117,0	28
5,01	Monolinurom	215,0	99,0	34	215,0	126,0	22
5,22	Metobromuron	259,1	170,0	20	259,1	148,1	15
5,27	Paraoxon etílico	276,1	220,1	17	276,1	248,2	16
5,29	Atrazina	216,1	174,1	18	216,1	96,1	23
5,32	Flutriafol	302,1	70,2	18	302,1	123,1	29
5,32	Imazalil	297,0	159,0	22	297,0	69,0	22
5,41	Metaxil-M	280,1	192,1	17	280,1	220,1	13
5,43	Ametrina	228,1	186,1	18	228,1	68,1	36
5,46	Diurom	233,0	72,1	18	233,0	46,3	14

Tabela 5. Agrotóxicos com seus respectivos tempo de retenção, íons precursores, íons produto e energia de colisão (*continuação*).

t_R (min)	Composto	1ª Transição Quantificação			2ª Transição Confirmação		
		Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Energia de colisão (ev)	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Energia colisão (ev)
5,57	Dodemorfe	282,1	116,0	21	282,1	98,0	28
5,67	Clomazone	240,0	125,0	18	240,0	89,0	46
5,76	Azoxistrobina	404,0	329,0	30	404,0	372,0	15
5,81	Linurom deuterado ^a	255,3	160,0	20	255,3	185,5	17
5,83	Fempropimorfe	304,2	147,1	28	304,2	57,2	30
5,84	Linurom	249,1	160,1	18	249,1	181,1	16
5,88	Propanil	217,9	161,9	16	217,9	127,0	22
5,92	Terbutilazina	230,0	174,0	16	230,0	96,0	28
5,94	Boscalida	342,9	307,0	20	342,9	139,9	20
6,02	Flutalonil	324,1	262,1	18	324,1	65,0	40
6,04	Dimetomorfe	388,1	165,0	30	388,1	300,9	20
6,06	Mepronil	270,1	91,0	44	270,1	119,0	28
6,1	Triadimefon	294,1	69,3	20	294,1	197,2	15
6,13	Piridafentiona	341,0	189,0	22	341,0	92,0	34
6,15	Bromuconazol	376,0	158,9	35	376,0	70,1	25
6,16	Pirifenox	295,0	93,1	22	295,0	67,2	60
6,16	Triazofós	314,1	161,9	35	314,1	118,9	18
6,28	Mecarban	330,0	97,0	35	330,0	227,1	8
6,32	Tetraconazol	372,0	159,0	30	372,0	70,1	20
6,33	Epoxiconazol	330,0	101,0	50	330,0	121,0	22
6,35	Etoprofós	243,2	97,0	31	243,2	131,0	20
6,4	Metolaclo	284,1	176,1	25	284,1	252,1	15
6,42	Rotenona	395,0	213,1	24	395,0	192,1	24
6,46	Fenamifós	304,1	217,1	24	304,1	202,1	36
6,48	Picoxistrobina	368,0	145,1	22	368,0	205,1	10
6,48	Tebufenozida	353,1	133,0	20	353,1	297,1	8
6,54	Dimoxistrobina	327,1	116,1	21	327,1	205,2	10
6,57	Flusilazol	316,0	247,0	18	316,0	165,0	28
6,63	Penconazol	284,0	159,0	34	284,0	70,1	16
6,66	Benomil	291,0	160,0	28	291,0	192,0	16
6,66	Tebuconazol	308,0	70,1	22	308,0	125,0	40
6,69	Diazinona	305,1	96,9	35	305,1	169,0	22
6,72	Propiconazol	342,0	159,0	34	342,0	69,0	22
6,72	Trifenilfosfato ^d	327,2	152,1	37	327,2	215,2	28
6,78	Triflumuron	359,0	139,1	35	359,0	156,1	16
6,79	Pirimifós metílico	306,1	108,1	32	306,1	164,1	22
6,87	Espinosade A	732,6	142,0	59	732,6	98,1	31
6,88	Tiobencarbe	258,2	125,1	17	258,2	100,1	12
6,97	Difenoconazol	406,0	251,1	25	406,0	111,1	60
7,05	Triflumizol	346,0	277,9	10	346,0	277,9	10
7,19	Fluasifope - p - Butílico	384,1	282,1	22	384,1	328,1	16
7,25	Buprofezina	306,1	201,0	12	306,1	57,4	20
7,36	Piriproxifem	322,1	227,1	14	322,1	96,0	14
7,65	Fempiroximato	422,2	366,1	15	422,2	138,1	32
7,82	Fenazaquina	307,2	57,2	25	307,2	161,0	19
9,2	Acefato	184,1	143,0	8	184,1	125,1	8

^a Padrão de controle^b Padrão interno

Nas **Figuras 7 e 8** podem ser visualizados os cromatogramas obtidos para os compostos quantificados, preparados no extrato a matriz “branco” e no solvente, respectivamente, na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$.

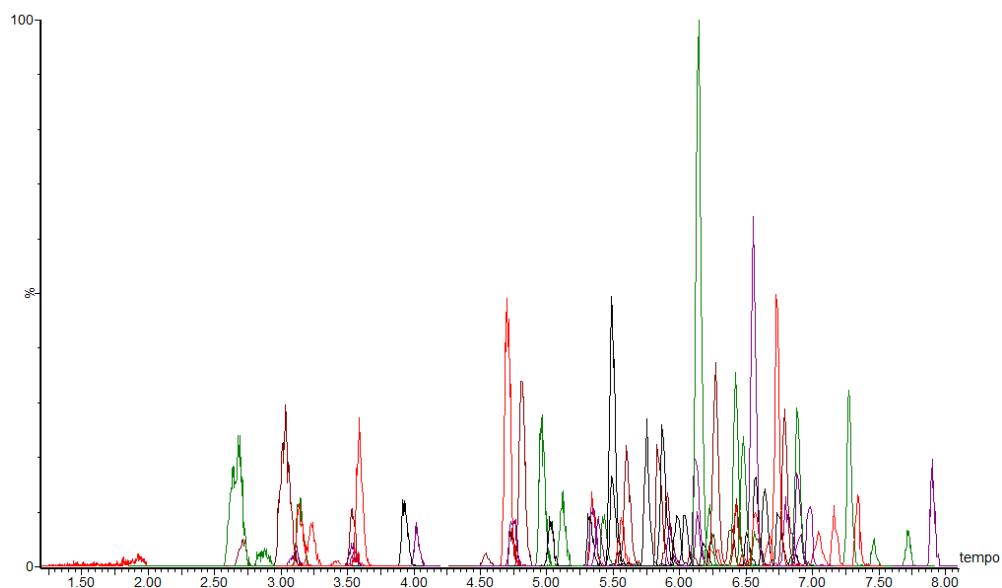


Figura 7. Solução analítica $20 \mu\text{g L}^{-1}$ preparada no extrato da matriz “branco”, contendo todos compostos quantificados.

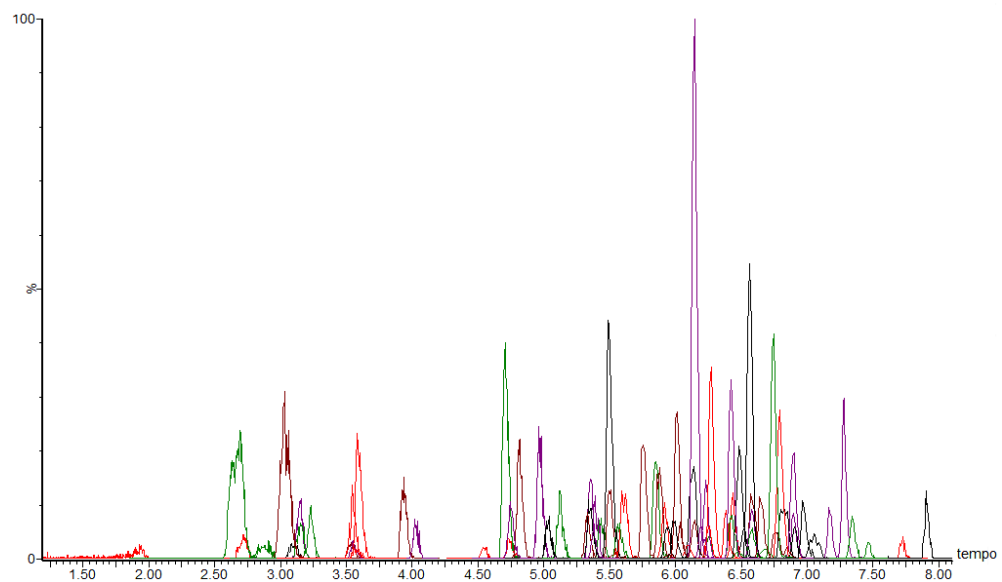


Figura 8. Solução analítica $20 \mu\text{g L}^{-1}$ preparada no solvente, contendo todos compostos quantificados.

Na **Figura 9** estão representadas as transições MRM de alguns compostos analisados neste trabalho, a partir de uma solução preparada no extrato da matriz “branco” na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. As transições relativas ao MRM de todos compostos encontram-se no **Anexo 3**.

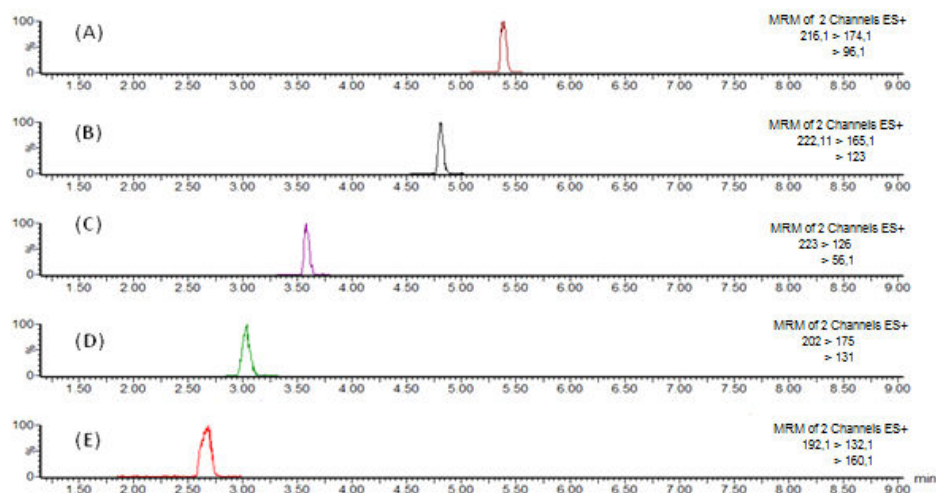


Figura 9. Transições relativas ao MRM de alguns compostos analisados. (A) atrazina (B) carbofurano (C) acetamiprido (D) tiabendazol (E) carbendazim

4.2 Otimização do método QuEChERS modificado para análise de resíduos de agrotóxicos em suco de laranja integral

Com base em trabalhos encontrados na literatura, foram feitos testes a fim de verificar qual melhor procedimento de extração e limpeza, conforme descrito no item 3.7. Na **Figura 10** estão representados os resultados dos testes em termos de recuperação dos analitos.

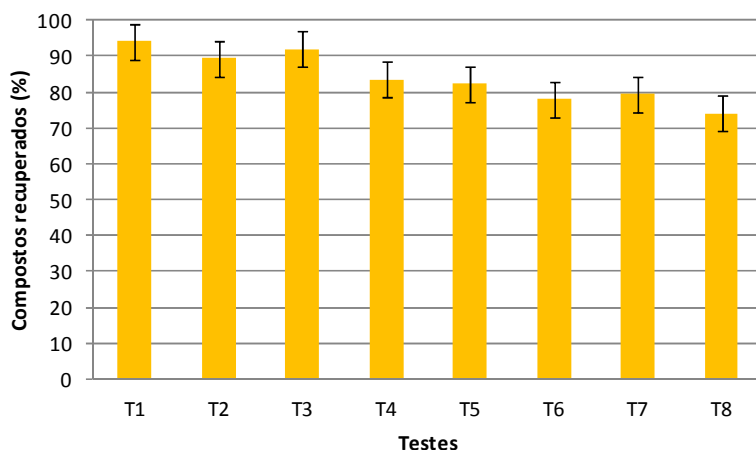


Figura 10. Resultados obtidos de recuperação de agrotóxicos em investigação para os testes iniciais, descritos na Figura 6.

A utilização da acetonitrila proporciona a extração de uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades e, quando acidificada, permite recuperações satisfatórias de pesticidas que geralmente apresentam problemas de estabilidade e também por ser mais adequada para trabalhar com cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial, do que acetona ou acetato de etila (PRESTES *et al.*, 2009).

Pode-se perceber claramente, através dos resultados, que os testes que envolveram os procedimentos de extração QuEChERS tamponado com acetato de amônio e acetato de sódio (T1-T4) mostraram ser mais eficazes na extração dos compostos do que os procedimentos convencionais. Isto já era esperado, pois o suco de laranja é uma matriz com pH ácido, em torno de 3,5, o que implica em dificuldades na extração de alguns analitos ocasiona na dificuldade de extrair alguns analitos. A utilização dos tampões acetato ou citrato deixa o pH do extrato próximo a 4,8 e 5,0-5,5, respectivamente, facilitando a extração dos compostos suscetíveis a baixos pH, como o imazalil e tiabendazol, e/ou aqueles que apresentam problema quanto a estabilidade (OSMAR; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Os testes em que se utilizaram os tampões acetato de amônio (T1) e acetato de sódio (T3) apresentaram maior número de compostos com resultados satisfatórios de recuperação, sendo que a utilização de acetato de amônio apresentou uma leve melhora na sensibilidade do sinal. Em virtude dos resultados da utilização desses tampões serem praticamente os mesmos quanto aos

compostos recuperados, optou-se pela escolha do acetato de sódio, já que este é mais usual e que se encontrava disponível no laboratório.

Como visto na revisão bibliográfica, o $MgSO_4$ é muito necessário pois reduz o volume de fase aquosa, facilitando a partição de analitos polares para a fase orgânica e a sua hidratação é uma reação exotérmica, ocorrendo o aquecimento da amostra entre 40 e 45 °C durante os passos de extração/partição, beneficiando a extração de compostos apolares (PRESTES *et al.*, 2009). A adição do sal acetato de sódio, além de ajudar a promover o efeito “*salting out*”, proporciona tamponamento do meio em conjunto com a acetonitrila 1% ácido acético possibilitando uma maior extração de agrotóxicos.

Na etapa de limpeza, os resultados variaram um pouco quanto à utilização do C_{18} +PSA quando comparado à limpeza somente com PSA. Com o emprego de C_{18} com PSA houve a diminuição de recuperação de alguns compostos, isto ocorre devido à quantidade maior de sorventes utilizado e possivelmente em função da retenção de compostos apolares na fase C_{18} . Portanto, a fim de otimizar o processo de extração escolhido, bem como a etapa de limpeza foi realizado um planejamento fatorial com quatro variáveis.

4.2.1 Planejamento Fatorial 2^4

A realização dos vinte e sete ensaios ocorreu, conforme descrito no item 3.7.1. Um dos gráficos que pode ser gerado pelo planejamento experimental aos efeitos que cada variável tem individualmente e em conjunto, uma com as outras, como demonstrado na **Figura 11**.

Os efeitos considerados significativos são aqueles que estão fora do intervalo da estimativa do erro, e, portanto influenciam de forma positiva ou negativa os resultados obtidos. Os efeitos 1 e 2 individualmente quando passa do nível baixo para o nível alto acabam por influenciar de forma negativa, bem como a combinação dos fatores 3, 4 e combinação 1,2, 4. Da mesma forma o efeito 3 sozinho é positivo, assim como a combinação dos fatores 1,2; 2,3,4; e 1,2,3,4. Portanto, pode-se concluir que somente com a utilização do PSA o efeito é mais pronunciado de forma positiva.

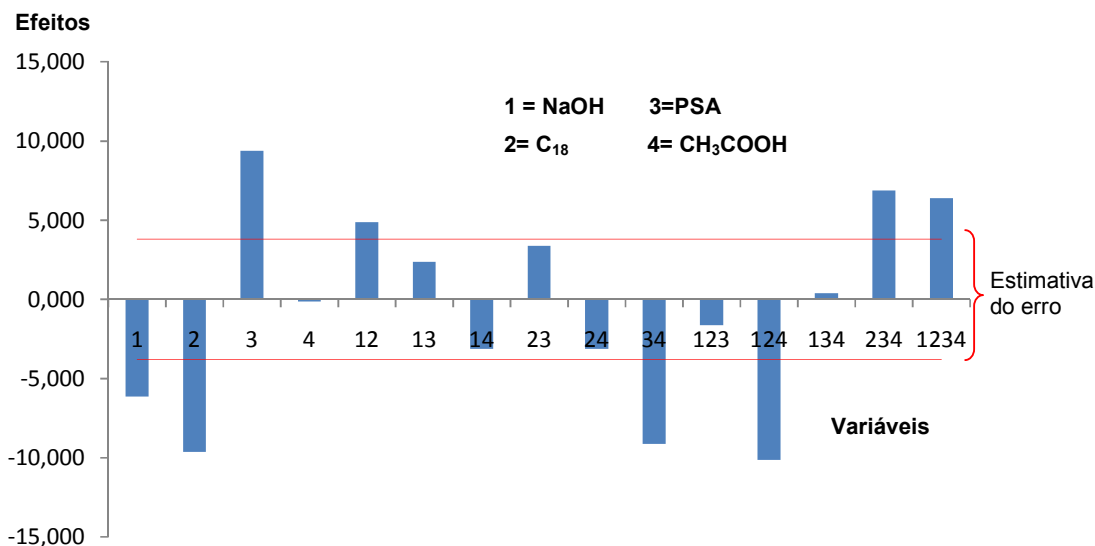


Figura 11. Valores dos efeitos para as quatro variáveis (NaOH, C₁₈, PSA e CH₃COOH) e para as interação delas.

Os percentuais de compostos que apresentaram valores de recuperação aceitáveis, de 70 a 120%, dos ensaios realizados através do planejamento 2⁴ estão demonstrados na **Figura 12**.

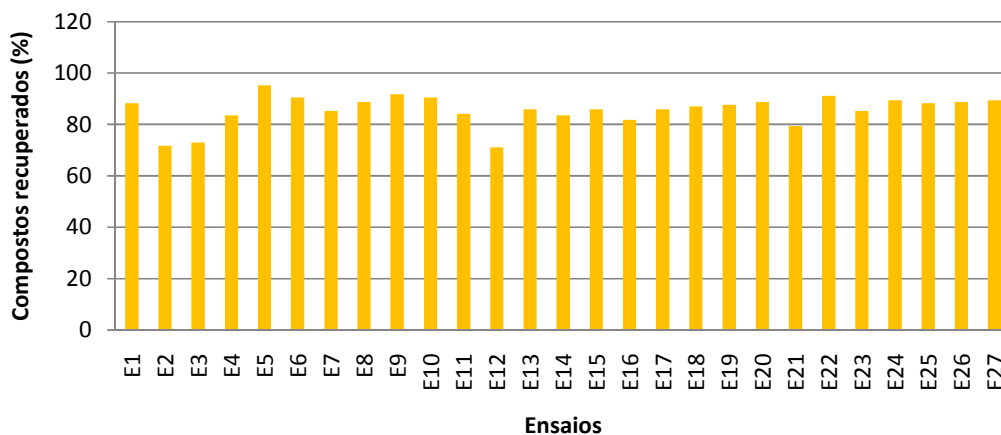


Figura 12. Resultados em porcentagem do número de compostos com recuperação satisfatória nos ensaios realizados pelo planejamento fatorial (E = ensaio). Condições experimentais para estes ensaios estão descritas no item 3.6.1, tabela 3.

Com base nestes dados foram geradas as superfícies de respostas demonstradas no **Anexo 1**. Na **Figura 13** estão representadas as que se mostraram mais coerentes com o método de extração e limpeza visados, e através delas, conclui-se que: na **Figura 13 (A)**, nota-se com quantidades intermediárias de acetato de sódio (1,7 g) e PSA (40 mg) e sem adição de C_{18} e NaOH acarretará bons resultados de recuperação, já na **Figura 13 (B)** utilizando a quantidade máxima de PSA (80 mg) e a intermediária de acetato (1,7g), não torna-se necessária a adição de C_{18} e a quantidade de NaOH adicionado seria o mínimo possível (50 μ L). Pode-se afirmar através desta superfície que: a quantidade de acetato intermediária é a melhor, não há a necessidade de utilização de C_{18} para etapa de limpeza, sendo o PSA suficiente. Na **Figura 13 (B)**, indica para adicionar uma quantidade mínima de NaOH e máxima de PSA, optou-se por não adicionar NaOH, pois é uma quantidade pequena e esta poderia sofrer variações durante a pipetagem, acarretando erros e também seria uma etapa a mais no processo de extração. Esta mesma superfície de resposta indica a utilização da quantidade máxima de PSA, mas como demonstradas na **Figura 13 (A)**, uma quantidade intermediária de PSA é suficiente para se obter ótimas recuperações. Vale ressaltar que, o custo do sorvente PSA é elevado e com isso torna-se desnecessário o seu uso em grandes quantidades, quando não é preciso.

Portanto, de acordo com as superfícies de respostas obtidas, as melhores condições empregadas foram: 1,7 g de acetato de sódio para etapa de extração/partição e para etapa de limpeza a utilização de 40 mg de PSA. Assim, o esquema do método QuEChERS utilizado para validação está demonstrado na **Figura 14**.

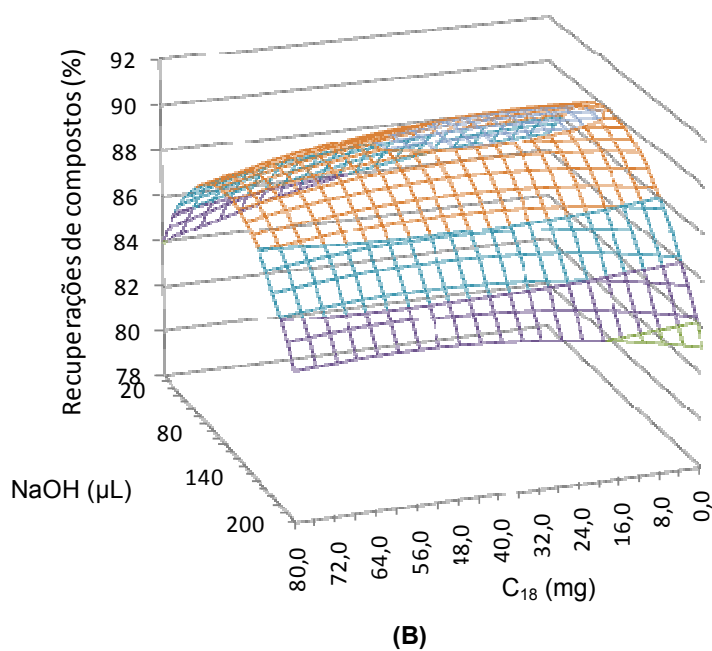
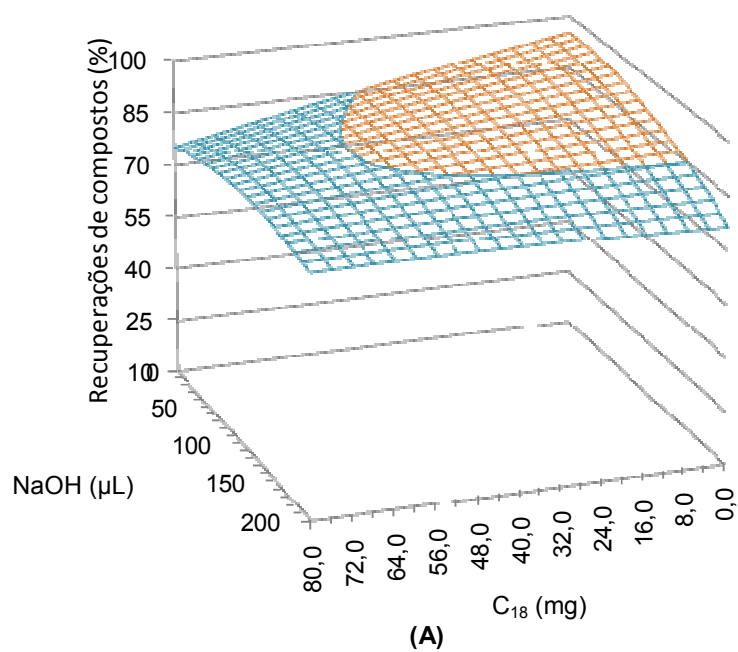


Figura 13. Superfícies de resposta geradas através do planejamento fatorial 2^4 dos compostos que apresentaram valores de recuperação aceitáveis A) utilizando condição intermediária de acetato de sódio (1,7 g) e PSA (40 mg) B) Utilizando condição máxima de PSA (80 mg) e intermediária de acetato de sódio (1,7 g).

Entre as superfícies que não foram escolhidas, algumas apresentaram uma quantidade mínima de acetato de sódio o qual não proporciona o efeito tamponante desejado e outras apresentaram uma quantidade máxima de acetato e sem utilização de sorventes para limpeza o que não é almejado por este trabalho.

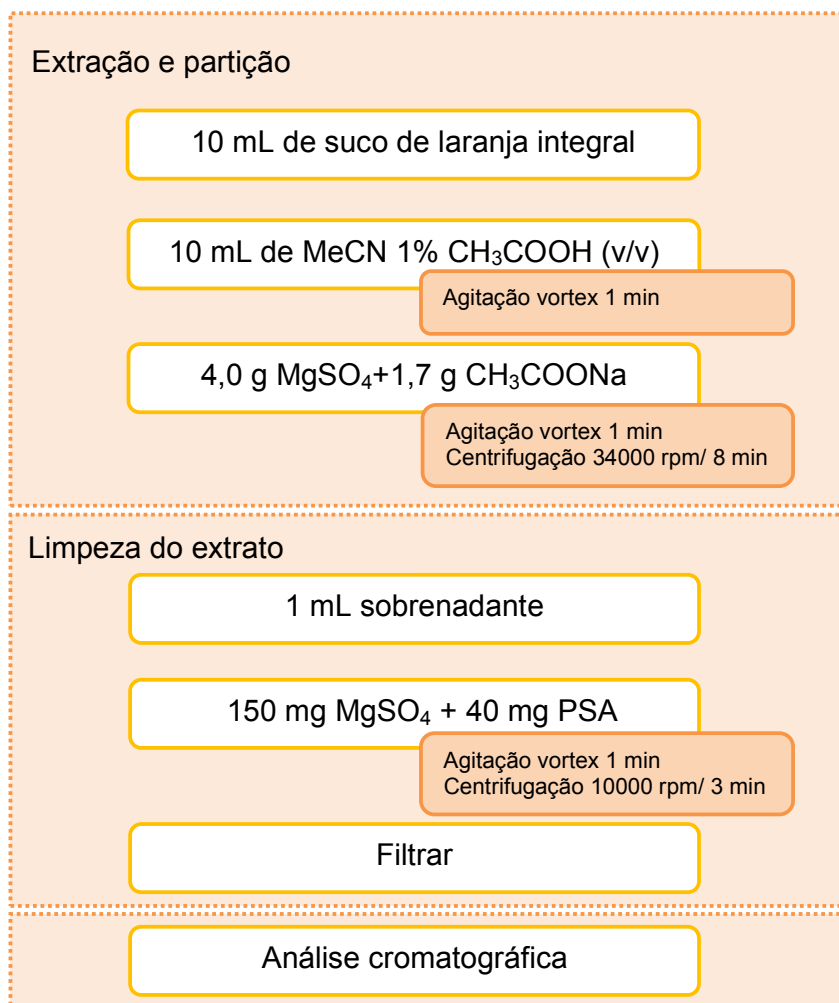


Figura 14. Representação do método para determinação de resíduos de agrotóxicos em suco de laranja integral, utilizando método QuEChERS.

4.3 Validação do método QuEChERS otimizado

A validação do método QuEChERS modificado para a análise dos agrotóxicos propostos, foi realizada de acordo com os parâmetros a seguir. Vale ressaltar que os níveis de fortificação na matriz 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, correspondem no

solvente a 2,0; 5,0; 10,0 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, devido à diluição do extrato de 1:4 em água ultra-pura.

4.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi garantida, visto que não há interferentes com mesmos íons de quantificação e confirmação no tempo de retenção dos analitos estudados na amostra “branco”, como pode ser visto para o composto tiobencarbe na **Figura 15**. Assim, a amostra “branco” foi utilizada para o preparo das curvas analíticas e ensaios de fortificação.

Os solventes e reagentes também foram avaliados, através do procedimento de extração, porém sem a amostra. Neste, também verificou-se a ausência de contaminantes que poderiam vir a interferir na análise.

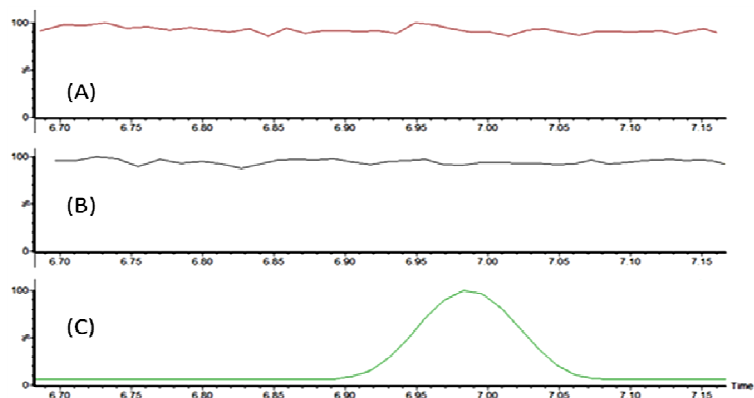


Figura 15. Demonstração de ausência de pico cromatográfico de interferente no tempo de retenção do tiobencarbe (A) branco reagente e na (B) amostra “branco” e (C) pico cromatográfico do composto tiobencarbe fortificado no nível de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.3.2 Faixa de trabalho e curva analítica

As **Tabelas 6 e 7** apresentam as equações das curvas obtidas no solvente (acetonitrila) e no extrato branco da matriz, bem como os coeficientes de determinação, modelo da equação e faixa de trabalho referente a cada composto. Vale ressaltar, que para os compostos que não apresentaram coeficiente de

determinação maior ou igual a 0,99 com o modelo linear, optou-se então pelo modelo quadrático, a fim de torná-lo aceitável para quantificação.

A estabilidade do instrumento foi comprovada através do uso trifenílfosfato (PI), na verificação da repetibilidade do sinal do sistema cromatográfico em todas as injeções. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que os modelos lineares e quadráticos das equações são satisfatórios, visto que, a maioria dos compostos apresentaram coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,99. Os compostos acefato, benomil e deltametrina não estão representados nas **Tabelas 6 e 7**, pois não apresentaram faixa linear. Este fato pode ter ocorrido devido aos compostos acefato e deltametrina necessitarem de condições diferenciadas de análise, e conseqüentemente não foram quantificados neste estudo. O acefato por se degradar facilmente precisa de condições especiais como a utilização de menores temperaturas da fonte e/ ou de dessolvatação. Este é um problema que também ocorre quando se utiliza GC-MS. A deltametrina por pertencer à classe dos piretróides é mais sensível à quantificação por GC-MS quando comparada ao LC-MS e assim para que seja analisada por tal deve-se otimizar parâmetros cromatográficos específicos (RAINA, 2011). O composto benomil o fato de não apresentar faixa linear pode-se dizer que já era esperado, visto que vários estudos relatam que o composto benomil é muito instável e se degrada facilmente. Esta degradação é resultado de uma hidrólise, em que o benomil perde o grupo amida e se degrada em carbendazim, como pode ser visto na **Figura 16** (ANASTASSIADES e SCHWACK, 1998). Dessa forma, o composto benomil é quantificado através do carbendazim.

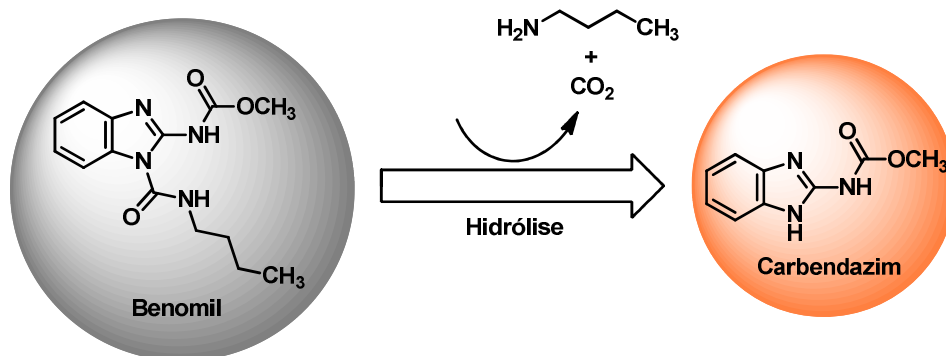


Figura 16. Representação da hidrólise do benomil em carbendazim.

Tabela 6. Faixas de trabalho e curvas analíticas obtidas para cada agrotóxico em estudo, preparadas em acetoneitrila.

Composto	Faixa de trabalho $\mu\text{g L}^{-1}$	Coefficiente de determinação (r^2)	Modelo	Equação
3-OH-Carbofuran	0,5 a 200	0,9997	Linear	$y = 68976,57x - 120964,4$
Acetamiprido	0,5 a 200	0,9984	Linear	$y = 953407,236x - 1836855,5$
Ametrina	0,5 a 200	0,9932	Linear	$y = 1006759,827x - 3681877,8$
Atrazina	0,5 a 200	0,9979	Linear	$y = 337416,665x - 571468,7$
Azoxistrobina	0,5 a 200	0,9967	Linear	$y = 697270,647x - 1803220,7$
Boscalida	0,5 a 200	0,9934	Linear	$y = 388809,149x - 1918305,9$
Bromuconazol	0,5 a 200	0,9972	Linear	$y = 369568,346x - 859704,9$
Buprofezina	0,5 a 200	0,9933	Linear	$y = 264114,547x - 861740,2$
Carbaryl	0,5 a 200	0,9987	Linear	$y = 132451,41x + 98010,7$
Carbendazim	0,5 a 200	0,9980	Linear	$y = 1150347,307x - 2403064,3$
Carbofurano	0,5 a 200	0,9945	Linear	$y = 853090,709x - 2909897,5$
Carboxin	0,5 a 200	0,9995	Linear	$y = 594745,708x - 267768,8$
Cianazina	2 a 200	0,9974	Linear	$y = 88411,705x - 409338,5$
Clomazone	0,5 a 200	0,9978	Linear	$y = 364607,219x - 437880,7$
Demeton-S-metil-sulfona	0,5 a 200	0,9989	Linear	$y = 164946,085x - 43237,6$
Diazinona	0,5 a 200	0,9979	Linear	$y = 885173,919x - 2110092,5$
Dicrotofós	0,5 a 200	0,9964	Linear	$y = 133453,386x - 459197,9$
Difenoconazol	0,5 a 200	0,9974	Linear	$y = 187866,329x - 380164,6$
Dimetoato	0,5 a 200	0,9997	Linear	$y = 278703,888x - 133312,1$
Dimetomorfe	0,5 a 200	0,9922	Linear	$y = 470166,341x - 2810142,8$
Dimoxistrobina	0,5 a 200	0,9811	Linear	$y = 623771,371x - 3804921,6$
Diurom	0,5 a 200	0,9921	Linear	$y = 394031,957x - 1682815,6$
Dodemorfe	0,5 a 200	0,9964	Linear	$y = 434089,185x - 1294667,5$
Epoxiconazol	2 a 200	0,9987	Quadrática	$y = -62,03503x^2 + 257135,206x + 83622,32$
Espinosade A	2 a 200	0,9993	Quadrática	$y = -48,23493x^2 + 201426,358x - 483566,53$
Etiofencarbe sulfona	2 a 200	0,9997	Linear	$y = 245028,229x + 2412,2$
Etiofencarbe sulfoxido	2 a 200	0,9985	Linear	$y = 181857,455x + 408533,3$
Etoprofós	0,5 a 200	0,9984	Linear	$y = 958642,419x - 868761,7$
Fempiroximato	2 a 200	0,9993	Quadrática	$y = 142,89093x^2 + 63283,385x - 106507,63$
Fempropimorfe	0,5 a 200	0,9998	Quadrática	$y = 1051,77564x^2 + 575356,374x - 300786,16$

Tabela 6. Faixas de trabalho e curvas analíticas obtidas para cada agrotóxico em estudo, preparadas em acetonitrila (continuação)

Composto	Faixa de trabalho $\mu\text{g L}^{-1}$	Coefficiente de determinação (r^2)	Modelo	Equação
Fenamifós	0,5 a 200	0,9990	Quadrática	$y = -475,61125x^2 + 1579990,214x - 1113769,03$
Fenazaquina	2 a 200	0,9921	Linear	$y = 233376,292x - 1204450,2$
Fluasifop-P-butílico	0,5 a 200	0,9911	Linear	$y = 1153748,989x - 5386170,4$
Flusilazol	2 a 200	0,9953	Linear	$y = 264928,407x - 1298083,6$
Flutolanil	0,5 a 200	0,9963	Linear	$y = 493646,928x + 785197$
Flutriafol	2 a 200	0,9982	Linear	$y = 265474,921x - 1223126,2$
Imazalil	0,5 a 200	0,9989	Linear	$y = 629218,13x - 674322,3$
Linurom	0,5 a 200	0,9997	Quadrática	$y = 727,78468x^2 + 290361,024x - 381661,18$
Linurom deuterado	0,5 a 200	0,9999	Quadrática	$y = 1384,74992x^2 + 418278,656x - 366154,47$
Mecarbam	2 a 200	0,9980	Quadrática	$y = -407,01819x^2 + 201862,993x - 107590,98$
Mefosfolam	0,5 a 200	0,9964	Linear	$y = 2213611,348x - 7795244,5$
Mepronil	0,5 a 200	0,9982	Quadrática	$y = -4619,58525x^2 + 2686188,111x - 9266650,75$
Metaxil	0,5 a 200	0,9918	Linear	$y = 546656,474x - 2570289,2$
Metiocarbe sulfona	0,5 a 200	0,9970	Linear	$y = 286151,468x + 603132,9$
Metobromurom	0,5 a 200	0,9930	Linear	$y = 441925,673x - 2066253$
Metolaclo	0,5 a 200	0,9899	Linear	$y = 744104,29x - 3537829,8$
Mevinfós	0,5 a 200	0,9993	Linear	$y = 292618,911x - 596276,3$
Monocrotofós	2 a 200	0,9989	Linear	$y = 181096,907x - 194061,7$
Monolinurom	0,5 a 200	0,9974	Linear	$y = 345780,99x - 810152,1$
Ometoato	0,5 a 200	0,9982	Linear	$y = 153671,187x - 261890$
Paraoxon etil	0,5 a 200	0,9990	Linear	$y = 475746,73x - 685997,5$
Penconazole	0,5 a 200	0,9991	Quadrática	$y = -385,33151x^2 + 1324509,914x - 287952,3$
Picoxistrobin	0,5 a 200	0,9820	Linear	$y = 814477,336x - 4051800$
Piridafentona	2 a 200	0,9942	Linear	$y = 357959,411x - 1613024,7$
Pirifenox	2 a 200	0,9978	Linear	$y = 291410,976x - 781387$
Pirimifós-metil	0,5 a 200	0,9967	Linear	$y = 855147,191x - 2826012,6$
Piriproxifen	2 a 200	0,9971	Linear	$y = 75730,608x - 309389$
Propanil	0,5 a 200	0,9991	Linear	$y = 169827,268x - 248441,7$
Propiconazole	0,5 a 200	0,9989	Linear	$y = 530326,777x + 242761,9$
Rotenona	0,5 a 200	0,9870	Linear	$y = 217531,164x - 1200555,4$
Simazina	0,5 a 200	0,9995	Quadrática	$y = -381,40228x^2 + 367348,159x - 497292,02$

Tabela 6. Faixas de trabalho e curvas analíticas obtidas para cada agrotóxico em estudo, preparadas em acetonitrila (*continuação*)

Composto	Faixa de trabalho $\mu\text{g L}^{-1}$	Coefficiente de determinação (r^2)	Modelo	Equação
Tebuconazol	2 a 200	0,9997	Quadrática	$y = 866,95493x^2 + 246738,135x - 174972,27$
Tebuconazol	0,5 a 200	0,9934	Linear	$y = 294137,566x - 1219084,7$
Terbutilazina	0,5 a 200	0,9958	Linear	$y = 615465,965x - 937108,5$
Tetraconazol	0,5 a 200	0,9986	Linear	$y = 493389,795x - 971960,2$
Tiabendazol	0,5 a 200	0,9994	Linear	$y = 786567,849x + 211625,4$
Tiactoprido	2 a 200	0,9993	Linear	$y = 308645,233x - 365319,8$
Tiobencarbe	0,5 a 200	0,9900	Linear	$y = 625553,646x - 3120058,1$
Tiofanato metil	2 a 200	0,9983	Quadrática	$y = -228,09228x^2 + 159900,473x - 287145,42$
Triadimefom	2 a 200	0,9966	Linear	$y = 259794,209x - 1518146,6$
Triazofós	0,5 a 200	0,9988	Linear	$y = 819573,468x + 494970,2$
Triflumizol	0,5 a 200	0,9991	Linear	$y = 413733,492x - 895990,7$
Triflumurom	0,5 a 200	0,9996	Linear	$y = 175308,041x - 251681,8$
Vamidationa	0,5 a 200	0,9997	Linear	$y = 75219,006x - 67128,1$

Tabela 7. Faixas de trabalho e curvas analíticas obtidas para cada agrotóxico em estudo, preparadas no extrato do suco de laranja integral.

Compostos	Faixa de trabalho $\mu\text{g L}^{-1}$	Coefficiente de determinação (r^2)	Modelo	Equação
3-OH-Carbofuran	8,0 a 1000	0,9992	Linear	$y = 92058,636x - 216864,9$
Acetamiprido	8,7 a 1000	0,9997	Linear	$y = 974532,926x - 1093341,4$
Ametrina	6,8 a 1000	0,9945	Linear	$y = 1064895,362x - 3871774,1$
Atrazina	8,1 a 1000	0,9982	Linear	$y = 353326,832x - 851714,7$
Azoxistrobina	7,8 a 1000	0,9990	Linear	$y = 733172,176x - 1582991,3$
Boscalida	8,3 a 1000	0,9960	Linear	$y = 396180,991x - 1585876,8$
Bromuconazol	5,9 a 1000	0,9993	Linear	$y = 384614,449x - 286742,6$
Buprofezina	6,2 a 1000	0,9950	Linear	$y = 395301,383x - 1492290,6$
Carbaryl	7,7 a 1000	0,9998	Linear	$y = 191579,502x - 156894,7$
Carbendazim	7,9 a 1000	0,9978	Linear	$y = 1136219,431x - 3091100,6$
Carbofurano	7,5 a 1000	0,9963	Linear	$y = 1513096,757x - 5293799,2$
Carboxim	7,2 a 1000	0,9997	Linear	$y = 625854,944x + 177863,3$
Cianazina	19,3 a 1000	0,9983	Linear	$y = 92704,826x - 395262,6$
Clomazone	7,4 a 1000	0,9998	Linear	$y = 372004,175x - 368433,4$
Demeton-S-metil-sulfona	5,7 a 1000	0,9994	Linear	$y = 238143,237x - 266398,8$
Diazinona	6,7 a 1000	0,9993	Linear	$y = 871280,98x - 1546577$
Dicrotofós	5,8 a 1000	0,9977	Linear	$y = 132506,887x - 418971,5$
Difenoconazol	6,2 a 1000	0,9995	Linear	$y = 182142,882x - 84290,8$
Dimetoato	8,6 a 1000	1,0000	Linear	$y = 293222,823x - 136198,7$
Dimetomorfe	8,5 a 1000	0,9950	Linear	$y = 472947,411x - 2162141,9$
Dimoxistrobina	6,9 a 1000	0,9925	Linear	$y = 618582,552x - 2978301,6$
Diurum	7,7 a 1000	0,9953	Linear	$y = 412632,224x - 1610502,4$
Dodemorfe	9,3 a 1000	0,9946	Linear	$y = 602805,884x - 2463314,1$
Epoxiconazol	14,0 a 1000	0,9995	Quadrática	$y = -238,41545x^2 + 290259,794x - 556021,05$
Espinosade A	16,2 a 1000	0,9999	Quadrática	$y = -380,99078x^2 + 354272,314x - 228740,86$
Etiofencarbe sulfona	22,4 a 1000	0,9997	Linear	$y = 484461,75x - 1074052,7$
Etiofencarbe sulfóxido	16,0 a 1000	0,9994	Linear	$y = 388562,731x - 924825,4$
Etoprofos	5,4 a 1000	0,9987	Linear	$y = 969192,571x - 96702,6$
Femproximoato	25,5 a 1000	0,9994	Quadrática	$y = 63,67245x^2 + 123569,531x - 281982,93$
Fempropimorfe	7,5 a 1000	0,9999	Quadrática	$y = 1787,59423x^2 + 708611,711x - 684958,87$

Tabela 7. Faixas de trabalho e curvas analíticas obtidas para cada agrotóxico em estudo, preparadas no extrato do suco de laranja integral (*continuação*).

Compostos	Faixa de trabalho $\mu\text{g L}^{-1}$	Coefficiente de determinação (r^2)	Modelo	Equação
Fenamifós	7,3 a 1000	0,9990	Quadrática	$y = -1447,34007x^2 + 1721161,295x - 2146454,34$
Fenazacina	26,0 a 1000	0,9962	Linear	$y = 324573,765x - 1470268,7$
Fluasifop-P-butílico	7,1 a 1000	0,9979	Linear	$y = 1234546,16x - 3557247,8$
Flusilazol	25,4 a 1000	0,9977	Linear	$y = 269362,287x - 1245909,5$
Flutolanil	6,5 a 1000	0,9961	Linear	$y = 499726,839x + 1011392,9$
Flutriafol	23,4 a 1000	0,9985	Linear	$y = 262201,763x - 882021,4$
Imazalil	8,5 a 1000	0,9980	Linear	$y = 577061,983x - 917530,4$
Linurom	6,0 a 1000	0,9995	Quadrática	$y = 897,24112x^2 + 296595,35x - 403155,25$
Linurom deuterado	5,9 a 1000	0,9998	Quadrática	$y = 1564,5584x^2 + 450738,381x - 573469,92$
Mecarbam	15,9 a 1000	0,9999	Quadrática	$y = -180,02278x^2 + 300118,693x - 506131,52$
Mefosfolan	10,0 a 1000	0,9989	Linear	$y = 2193727,769x - 4707685,7$
Mepronil	7,4 a 1000	1,0000	Quadrática	$y = -5026,6645x^2 + 2756451,454x - 1306420,78$
Metlaxil	8,8 a 1000	0,9934	Linear	$y = 560968,114x - 2554884,8$
Metiocarbe sulfona	6,4 a 1000	0,9988	Linear	$y = 543125,356x + 110869$
Metobromurom	7,3 a 1000	0,9967	Linear	$y = 439862,176x - 1612223,1$
Metolacoloro	8,6 a 1000	0,9936	Linear	$y = 765397,484x - 3322053,1$
Mevinfós	8,2 a 1000	0,9989	Linear	$y = 302505,947x - 691977,3$
Monocrotofós	18,5 a 1000	0,9993	Linear	$y = 190437,816x - 226387,9$
Monolinurom	7,6 a 1000	0,9991	Linear	$y = 347254,706x - 731502,5$
Ometoato	9,1 a 1000	0,9986	Linear	$y = 206578,16x - 593543,3$
Paraoxon etil	7,4 a 1000	0,9998	Linear	$y = 482349,447x - 404178,1$
Penconazole	7,0 a 1000	0,9998	Quadrática	$y = -1675,32814x^2 + 1493164,178x - 741786,3$
Picoxistrobin	5,9 a 1000	0,9954	Linear	$y = 796648,754x - 3167438,4$
Piridafentiona	22,2 a 1000	0,9986	Linear	$y = 366842,403x - 1530577,8$
Pirifenox	21,8 a 1000	0,9980	Linear	$y = 306649,18x - 1167988,5$
Pirimifós-metil	7,9 a 1000	0,9989	Linear	$y = 881297,995x - 1921997,9$
Piriproxifem	17,2 a 1000	0,9963	Linear	$y = 109187,099x - 515042,6$
Propanil	6,3 a 1000	0,9998	Linear	$y = 179643,988x - 271852,8$
Propiconazole	8,3 a 1000	0,9948	Linear	$y = 507829,093x + 894673,4$
Rotenona	7,6 a 1000	0,9974	Linear	$y = 215357,523x - 745147,1$

Tabela 7. Faixas de trabalho e curvas analíticas obtidas para cada agrotóxico em estudo, preparadas no extrato do suco de laranja integral (continuação).

Compostos	Faixa de trabalho $\mu\text{g L}^{-1}$	Coefficiente de determinação (r^2)	Modelo	Equação
Simazina	6,0 a 1000	0,9991	Quadrática	$y = -456,9635x^2 + 359986,516x - 521660,18$
Tebuconazol	15,3 a 1000	0,9999	Quadrática	$y = 737,39171x^2 + 287559,329x - 550167,19$
Tebuconozida	9,3 a 1000	0,9966	Linear	$y = 292673,21x - 967391,1$
Terbutilazina	5,3 a 1000	0,9985	Linear	$y = 652337,047x - 981118,4$
Tetraconazol	6,9 a 1000	0,9986	Linear	$y = 495176,826x - 349828,4$
Tiabendazol	7,3 a 1000	0,9995	Linear	$y = 815303,31x - 684342,5$
Tioclóprido	22,1 a 1000	0,9998	Linear	$y = 278229,484x - 250813,8$
Tiobencarbe	4,9 a 1000	0,9940	Linear	$y = 643736,976x - 2537005,4$
Tiofanato metil	13,1 a 1000	0,9998	Quadrática	$y = -305,64413x^2 + 184144,032x - 6650,05$
Triadimefom	21,2 a 1000	0,9980	Linear	$y = 262263,962x - 1353419,9$
Triazofós	9,7 a 1000	0,9988	Linear	$y = 854418,572x - 182241$
Triflumizol	7,1 a 1000	0,9889	Linear	$y = 528895,912x - 2553864,8$
Triflumurom	7,0 a 1000	0,9986	Linear	$y = 165765,8x - 59383,8$
Vamidação	6,1 a 1000	0,9998	Linear	$y = 78288,665x - 101833,9$

4.3.3 Efeito Matriz

Os efeitos da matriz são conhecidos por serem problemáticos no que tange à análise de resíduos de agrotóxicos por LC-MS/MS. Os efeitos causados podem ser o aumento ou a supressão do sinal analítico (HAJSLOVÁ & ZROSTLÍKOVÁ, 2003; LEHOTAY *et al.*, 2010). Há diversos fatores que podem interferir na ionização, identificação e quantificação nas interfaces ESI, e, por isso, é de fundamental importância a escolha adequada do processo de preparo da amostra e otimização das condições cromatográficas.

Na **Tabela 8** estão listados os resultados obtidos para o efeito matriz, para os quais nos casos de modelo linear fez-se uso dos coeficientes angulares das equações de reta das curvas analíticas, preparadas no solvente e no extrato da matriz. Nos casos de modelo quadrático foram utilizadas as áreas da concentração do nível 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ da curva analítica, conforme Equações 4 e 5.

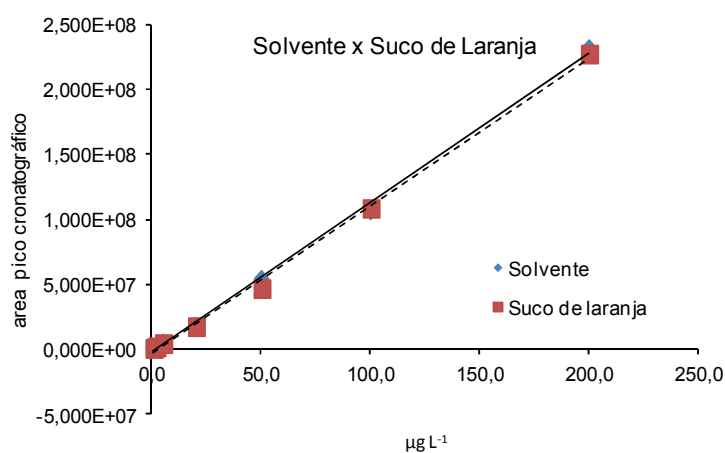
Tabela 8. Avaliação do efeito matriz dos agrotóxicos analisados por UHPLC-MS/MS.

Compostos	Efeito Matriz (%)
3-OH-Carbofuran	33,5
Acetamiprido	2,2
Ametrina	5,8
Atrazina	4,7
Azoxistrobina	5,1
Boscalida	1,9
Bromuconazol	4,1
Buprofezina	49,7
Carbaril	44,6
Carbendazim	-1,2
Carbofurano	77,4
Carboxin	5,2
Cianazina	5,0
Clomazone	2,0
Demeton-S-metil-sulfona	44,4
Diazinona	-1,6
Dicrotofós	-0,7
Difenoconazol	-3,0
Dimetoato	5,2
Dimetomorfe	0,6
Dimoxistrobina	-0,8
Diurum	4,7
Dodemorfe	38,9
Epoxiconazol	-9,5
Espinosade A	29,4
Etiofencarbe sulfona	96,5

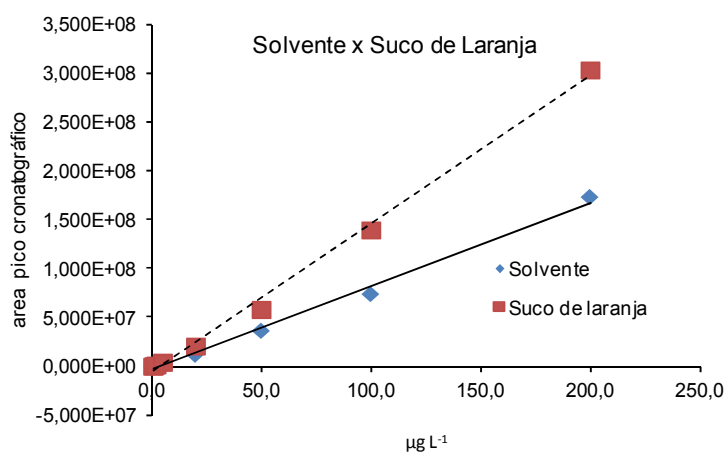
Tabela 8. Avaliação do efeito matriz dos agrotóxicos analisados por UHPLC-MS/MS (continuação).

Compostos	Efeito Matriz (%)
Etiofencarbe sulfóxido	111,0
Etoprofós	1,1
Fenamifós	-10,1
Fenazaquina	39,3
Fenpiroximato	38,4
Fenpropimorfe	15,9
Fluasifop- <i>p</i> -butílico	7,0
Flusilazol	1,7
Flutolanil	1,2
Flutriafol	-0,9
Imazalil	-8,3
Linurom	-10,1
Linurom deuterado	0,5
Mecarbam	15,1
Mefosfolam	-0,9
Mepronil	-7,7
Metalaxil	2,6
Metiocarbe sulfona	89,8
Metobromurom	-0,5
Metolachlor	2,9
Mevinfós	3,4
Monocrotofós	5,1
Monolinurom	0,4
Ometoato	34,4
Paraoxon etil	1,4
Penconazole	-4,4
Picoxistrobin	-2,2
Piridafentiona	2,6
Pirifenox	4,9
Pirimifós-metil	3,1
Piriproxifen	43,9
Propanil	5,8
Propiconazole	-4,2
Rotenona	-1,0
Simazina	-11,3
Tebuconazol	-0,3
Tebufenozida	-0,5
Terbutilazina	6,0
Tetraconazol	0,4
Tiabendazol	3,7
Tiacloprido	-9,8
Tiobencarbe	2,9
Tiofanato metil	7,1
Triadimefom	1,1
Triazofós	4,3
Triflumizol	27,8
Triflumurom	-5,4
Vamidationa	4,1

Para a maioria dos compostos, o efeito matriz não foi considerado significativo, pois os valores possuem variação inferior a 20% (FERRER et al., 2011). Porém, para alguns agrotóxicos como, por exemplo, o carbofurano este efeito foi pronunciado e evidenciado na curva da matriz com uma intensidade maior do que a observada no solvente. Sendo assim, fica clara a importância do preparo de curva no extrato da matriz para quantificação. Na **Figura 17** estão representadas as curvas analíticas com os efeitos matriz para o composto (A) carbendazim e (B) carbofurano. Através desta percebe-se claramente que o efeito matriz para o composto carbendazim é praticamente nulo enquanto que para o carbofurano este efeito é pronunciado pelo aumento de sinal.



(A)



(B)

Figura 17. Curvas analíticas preparada no solvente e no extrato branco da matriz para os compostos (A) carbendazim e (B) carbofurano.

4.3.5 Limite de Detecção e quantificação

Os valores de limite de detecção e quantificação do método foram obtidos como descrito no item 2.9.4 e item 3.7 desta dissertação. Para o LOD foram feitas fortificações nos níveis 2,5 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para o LOQ 10,0 e 25,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, ressaltando-se que, os valores de 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (LOD) e 25,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (LOQ) foram utilizados somente para aqueles compostos que não apresentaram sinal e que não atenderam os requisitos para serem utilizados para quantificação, respectivamente.

O limite de detecção do instrumento foi verificado com uma solução analítica no solvente (acetonitrila) na concentração de 0,5 e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, ou seja, correspondente a 2,5 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para matriz.

Na **Tabela 9** estão apresentados os valores do LOD do instrumento e do método e LOQ de cada agrotóxico. Os LOD do instrumento e método variaram de 0,1 a 5,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (solvente) e de 0,1 a 14,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (matriz), respectivamente, e o LOQ variou de 4,9 a 26 $\mu\text{g L}^{-1}$ (matriz).

Os valores de LOQ encontrados são mais baixos que os estabelecidos pela legislação para os agrotóxicos que são permitidos na cultura de laranja. Sendo assim o método é satisfatório para quantificação dos mesmos.

Tabela 9. Valores dos Limites de Detecção e Quantificação.

Compostos	Limite de detecção (LOD)		Limite de quantificação (LOQ)
	LOD _i ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD _m ($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)
3-OH-Carbofuran	1,2	0,7	8,0
Acetamiprido	0,3	1,6	8,7
Ametrina	0,3	1,1	6,8
Atrazina	0,7	1,2	8,1
Azoxistrobina	0,6	1,3	7,8
Boscalida	0,4	4,1	8,3
Bromuconazol	0,8	3,1	5,9
Buprofezina	0,3	2,3	6,2
Carbaril	0,5	1,3	7,7
Carbendazim	0,3	0,7	7,9
Carbofurano	0,4	1,0	7,5
Carboxin	0,4	0,6	7,2
Cianazina	1,1	10,7	19,3
Clomazone	0,4	1,8	7,4
Demeton-S-metil-sulfona	0,2	0,3	5,7
Diazinona	0,3	1,4	6,7
Dicrotofós	0,4	3,2	5,8
Difenoconazol	1,2	0,3	6,2

Tabela 9. Valores dos Limites de Detecção e Quantificação (*continuação*).

Compostos	Limite de detecção (LOD)		Limite de quantificação (LOQ)
	LOD _i ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD _m ($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)
Dimetoato	0,5	1,4	8,6
Dimetomorfe	1,0	3,7	8,5
Dimoxistrobina	1,5	2,3	6,9
Diuron	0,8	1,1	7,7
Dodemorfe	0,5	2,9	9,3
Epoconazol	2,4	9,8	14,0
Espinosade A	2,4	9,3	16,2
Etiofencarbe sulfona	1,5	4,7	22,4
Etiofencarbe sulfóxido	2,6	9,2	16,0
Etoprofós	0,3	1,5	5,4
Femproximato	3,5	14,3	25,5
Fempropimorfe	0,3	1,7	7,5
Fenamifós	0,5	1,7	7,3
Fenazaquina	0,9	9,3	26,0
Fluasifop- <i>p</i> -butílico	0,3	1,7	7,1
Flusilazol	2,0	12,4	25,4
Flutolanil	0,6	3,7	6,5
Flutriafol	1,1	5,5	23,4
Imazalil	0,4	0,1	8,5
Linurom	1,6	2,1	6,0
Linurom deuterado	0,8	1,9	6,0
Mecarbam	1,7	6,1	15,9
Mefosfolam	0,1	0,9	10,0
Mepronil	0,5	1,0	7,4
Metalaxil	0,5	1,6	8,8
Metiocarbe sulfona	0,2	1,3	6,4
Metobromurom	0,8	1,6	7,3
Metolacloro	0,8	1,4	8,6
Mevinfós	0,4	1,2	8,2
Monocrotófós	0,5	8,4	18,5
Monolinurom	0,4	0,9	7,6
Ometoato	0,3	0,3	9,1
Paraoxon etil	0,3	1,7	7,4
Penconazole	0,7	3,3	7,0
Picoxistrobin	0,5	2,4	5,9
Piridafentiona	3,7	12,0	22,2
Pirifenox	1,5	8,4	21,8
Pirimifós-metil	0,3	2,1	7,9
Piriproxifen	2,7	10,9	17,2
Propanil	0,7	0,8	6,3
Propiconazole	1,1	3,7	8,3
Rotenona	2,0	4,2	7,6
Simazina	1,3	1,1	6,0
Tebuconazol	1,7	10,5	15,3
Tebufenozida	0,5	3,2	9,3
Terbutilazina	0,4	3,7	5,3

Tabela 9. Valores dos Limites de Detecção e Quantificação (*continuação*).

Compostos	Limite de detecção (LOD)		Limite de quantificação (LOQ)
	LOD _i ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD _m ($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)
Tetraconazol	0,9	1,6	6,9
Tiabendazol	0,3	1,2	7,3
Tiacloprido	1,4	4,5	22,1
Tiobencarbe	0,7	2,2	4,9
Tiofanato metil	1,5	5,4	13,1
Triadimefon	5,3	13,8	21,2
Triazofós	0,6	3,6	9,7
Triflumizol	0,9	3,4	7,1
Triflumurom	0,9	4,6	7,0
Vamidationa	0,9	1,9	6,1

4.3.6 Exatidão

Foram realizados ensaios de fortificação a fim de avaliar a exatidão do método. Para tal foram realizados experimentos em três níveis de fortificação 10, 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo que o nível correspondente a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi utilizado também para a determinação do limite de quantificação do método. Nos casos em que não se verificou confiabilidade suficiente para realização na quantificação, a concentração de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi empregada.

Foram preparadas curvas analíticas na amostra “branco”, que foram utilizadas para calcular a recuperação. Todos os compostos apresentaram recuperações na faixa de aceitação recomendada de 70-120% (SANCO, 2011). Os valores de recuperação podem ser vistos, assim como o RSD, para cada agrotóxico na **Tabela 10**.

O linurom deuterado, como PC, mostrou a eficácia da extração, pois foram recuperados os níveis de extração propostos, visto que os mesmos foram adicionados nas mesmas concentrações dos analitos tanto na fortificação, quanto nas curvas analíticas.

Tabela 10. Percentuais de recuperação e RSD para a repetibilidade do método.

Compostos	Níveis de fortificações ($\mu\text{g L}^{-1}$)							
	10		25		50		100	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
3-OH-Carbofuran	106,5	12,0	-	-	91,0	9,5	75,3	9,8
Acetamiprido	98,9	8,8	-	-	91,4	6,9	80,5	7,4
Ametrina	84,2	12,7	-	-	92,6	5,7	80,1	5,9
Atrazina	97,5	10,0	-	-	91,9	10,9	79,5	8,3
Azoxistrobina	93,7	10,9	-	-	86,3	7,3	76,0	9,1
Boscalida	107,3	13,5	-	-	88,6	10,8	79,8	13,6
Bromuconazol	88,6	16,1	-	-	76,9	13,4	81,1	10,6
Buprofezina	100,6	10,2	-	-	85,7	6,9	79,7	6,1
Carbaril	100,0	11,0	-	-	91,1	5,4	83,5	7,1
Carbendazim	98,9	10,5	-	-	83,9	4,6	77,5	2,6
Carbofurano	90,6	9,8	-	-	88,3	1,6	75,1	7,3
Carboxin	88,5	13,4	-	-	83,6	4,1	81,6	9,8
Cianazina	n.q.	n.q.	105,7	16,3	99,7	11,3	87,7	7,3
Clomazone	105,0	6,1	-	-	88,2	12,1	88,9	9,2
Demeton-S-metil-sulfona	79,1	10,8	-	-	83,7	8,8	77,1	4,1
Diazinona	93,4	7,8	-	-	73,4	14,7	83,2	2,9
Dicrotofós	87,3	16,5	-	-	88,0	14,0	74,4	8,4
Difenoconazol	111,2	12,3	-	-	74,6	16,5	102,5	8,8
Dimetoato	100,9	10,3	-	-	87,3	13,9	83,5	9,9
Dimetomorfe	103,8	9,0	-	-	86,1	11,5	72,4	3,3
Dimoxistrobina	112,2	18,7	-	-	97,0	11,2	81,6	8,3
Diuron	101,3	11,5	-	-	90,7	4,5	76,6	3,5
Dodemorfe	109,8	11,1	-	-	91,4	2,0	73,4	7,4
Epoxiconazol	n.q.	n.q.	90,4	18,5	82,3	12,5	88,9	8,0
Espinosade A	n.q.	n.q.	87,3	18,4	89,8	15,6	93,2	13,7
Etiofencarbe sulfona	n.q.	n.q.	99,2	6,8	92,7	6,9	78,6	5,6
Etiofencarbe sulfóxido	n.q.	n.q.	89,6	17,4	94,5	7,3	77,8	4,5
Etoprofós	82,0	17,4	-	-	73,2	12,2	83,3	9,8
Femproximato	n.q.	n.q.	116,5	6,1	75,5	12,5	96,7	17,5
Fempropimorfe	92,3	8,9	-	-	86,1	1,4	86,0	8,0
Fenamifós	87,1	8,0	-	-	83,5	7,1	83,2	7,8
Fenazaquina	n.q.	n.q.	118,4	5,9	74,7	6,6	90,6	2,5
Fluasifop- <i>p</i> -butílico	90,8	12,7	-	-	70,5	16,9	76,0	6,7
Flusilazol	n.q.	n.q.	110,1	3,8	103,2	7,7	92,2	9,9
Flutolanil	92,3	14,2	-	-	77,2	15,8	92,9	14,0
Flutriafol	n.q.	n.q.	111,0	11,2	92,6	16,2	81,6	10,2
Imazalil	102,8	13,1	-	-	77,1	6,3	78,8	7,6
Linurom	90,0	16,2	-	-	86,8	3,8	83,2	5,2
Linurom deuterado	88,0	15,7	-	-	88,1	6,8	87,3	4,9
Mecarbam	n.q.	n.q.	100,8	17,9	86,7	8,8	87,8	18,4
Mefosfolan	108,9	6,1	-	-	89,0	2,1	83,7	6,1
Mepronil	90,1	12,8	-	-	80,9	3,6	88,6	9,0

Tabela 10. Percentuais de recuperação e RSD para a repetibilidade do método (continuação).

Compostos	Níveis de fortificações ($\mu\text{g L}^{-1}$)							
	10		25		50		100	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
Metalaxil	106,9	12,5	-	-	94,9	7,9	73,7	7,9
Metiocarbe sulfona	91,9	11,9	-	-	79,9	7,7	82,1	4,7
Metobromuron	96,0	14,3	-	-	89,6	6,3	75,5	2,9
Metolaclo	110,0	10,6	-	-	101,5	5,9	81,4	10,5
Mevinfós	99,3	12,4	-	-	85,5	5,3	84,4	6,3
Monocrotofós	n.q.	n.q.	97,3	14,5	83,0	8,8	73,2	6,5
Monolinurom	96,7	15,5	-	-	85,2	3,3	81,4	8,3
Ometoato	103,6	8,7	-	-	76,4	7,0	71,0	6,7
Paraoxon etil	88,8	11,6	-	-	79,2	6,0	82,1	12,3
Penconazole	94,3	16,0	-	-	78,2	11,7	91,9	8,9
Picoxistrobin	83,6	14,3	-	-	87,1	13,5	82,6	7,4
Piridafentiona	n.q.	n.q.	111,3	14,4	106,4	7,5	82,7	11,9
Pirifenox	n.q.	n.q.	117,0	15,4	105,4	7,9	92,5	9,7
Pirimifós-metil	103,7	16,7	-	-	76,2	17,4	80,4	5,0
Piriproxifen	n.q.	n.q.	86,7	14,8	76,5	10,4	83,1	7,5
Propanil	88,1	14,1	-	-	75,2	15,5	77,9	7,2
Propiconazole	93,2	6,4	-	-	78,0	7,9	88,0	5,4
Rotenona	96,8	13,3	-	-	70,1	18,2	77,7	16,1
Simazina	81,6	15,9	-	-	73,6	9,8	75,8	8,2
Tebuconazol	n.q.	n.q.	84,6	19,7	95,7	16,7	82,3	4,6
Tebufenozida	117,5	10,0	-	-	98,2	9,6	90,4	9,4
Terbutilazina	77,9	19,2	-	-	86,3	8,7	85,2	13,0
Tetraconazol	99,7	18,9	-	-	77,7	14,1	79,6	18,0
Tiabendazol	86,4	11,1	-	-	82,6	7,2	80,0	3,1
Tiacloprido	n.q.	n.q.	101,5	9,1	96,0	12,2	85,0	10,4
Tiobencarbe	81,4	19,2	-	-	86,0	11,9	84,2	5,4
Tiofanato metil	n.q.	n.q.	77,0	15,5	81,0	6,0	85,1	5,0
Triadimefom	n.q.	n.q.	98,5	6,7	90,8	11,4	91,1	6,5
Triazofós	112,6	8,7	-	-	88,3	7,4	92,5	9,1
Triflumizol	88,8	12,1	-	-	96,8	5,1	81,4	7,5
Triflumurom	94,3	18,6	-	-	78,5	7,02	78,7	9,9
Vamidationa	98,2	18,3	-	-	98,7	13,4	89,6	8,9

* n= 7 (7 extrações x 1 injeção de cada extrato)

* n.q.= não quantificado com confiança no nível de fortificação avaliado.

4.3.7 Precisão

A repetibilidade foi avaliada por sete extrações, sendo realizada uma injeção de cada extrato nos três níveis avaliados para cada composto. Como visto na **Tabela 10** os valores encontrados para todos os compostos foram satisfatórios, visto que todos apresentaram RSD inferiores a 20%, conforme recomendação da literatura (RIBANI et al., 2004; SANCO, 2011).

A repetibilidade do instrumento foi verificada através da solução analítica 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ preparada no extrato da matriz. Os dados obtidos na **Tabela 11** percebe-se que todos os valores apresentam RSD inferior a 20% comprovando assim a repetibilidade das injeções.

Tabela 11. Percentuais RSD para a repetibilidade do instrumento para solução analítica de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ preparada no extrato da matriz.

Compostos	Solução analítica – 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ RSD %
3-OH-Carbofuran	19,8
Acetamiprido	10,3
Ametrina	6,3
Atrazina	16,0
Azoxistrobina	14,6
Boscalida	10,4
Bromuconazol	11,0
Buprofezin	13,5
Carbaril	10,0
Carbendazim	5,6
Carbofurano	8,4
Carboxin	7,5
Cianazina	18,3
Clomazone	8,7
Demeton-S-metil-sulfona	16,1
Diazinona	4,9
Dicrotofós	18,7
Difenoconazol	14,8
Dimetoato	9,0
Dimetomorfe	14,8
Dimoxistrobina	9,6
Diuron	8,2
Dodemorfe	7,4
Epoxiconazol	11,8
Espinosade A	9,8
Etiofencarbe sulfona	10,6
Etiofencarbe sulfóxido	10,0
Etoprofós	6,4
Femproximato	15,8
Fempropimorfe	9,4
Fenamifós	12,9
Fenazaquina	13,2
Fluasifop- <i>p</i> -butílico	11,6
Flusilazol	14,1
Flutolanil	6,6
Flutriafol	11,7
Imazalil	13,3
Linurom	13,1
Linurom deuterado	11,0
Mecarbam	16,8
Mefosfolan	7,3

Tabela 11. Percentuais RSD para a repetibilidade do instrumento para solução analítica de 20 µg L⁻¹ preparada no extrato da matriz (*continuação*).

Compostos	Solução analítica – 20 µg L ⁻¹ RSD %
Mepronil	16,8
Metalaxil	6,5
Metiocarbe sulfona	8,8
Metobromurom	9,1
Metolaclo	12,2
Mevinfós	9,7
Monocrotofós	11,2
Monolinurom	8,0
Ometoato	8,7
Paraoxon etil	7,4
Penconazole	4,6
Picoxistrobina	8,1
Piridafentiona	16,4
Pirifenox	14,7
Pirimifós-metil	7,7
Piriproxifen	19,6
Propanil	11,9
Propiconazole	5,0
Rotenona	16,7
Simazina	11,0
Tebuconazol	15,5
Tebufenozida	10,1
Terbutilazina	8,0
Tetraconazol	8,2
Tiabendazol	11,2
Tiacloprido	8,8
Tiobencarbe	15,0
Tiofanato metil	10,6
Triadimefom	18,0
Triazofós	13,1
Triflumizol	12,3
Triflumurom	9,7
Vamidationa	6,2

A precisão intermediária do método foi realizada em dias diferentes e na fortificação do nível 50 µg L⁻¹. Os valores de recuperação e RSD para a precisão intermediária estão apresentados na **Tabela 12**. Nesta tabela, verifica-se que todos os resultados obtidos estão dentro dos limites estabelecidos de recuperação e RSD.

Tabela 12. Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método QuEChERS, no nível de fortificação de 50 µg L⁻¹.

Compostos	Nível de fortificação 50 µg L ⁻¹	
	Rec (%)	RSD (%)
3-OH-Carbofuran	86,6	15,4
Acetamiprido	88,2	9,5
Ametrina	99,4	1,3
Atrazina	93,5	1,9
Azoxistrobina	86,2	7,6
Boscalida	92,6	12,3
Bromuconazol	85,5	16,1
Buprofezin	98,5	6,9
Carbaril	87,7	9,8
Carbendazim	88,3	4,8
Carbofurano	90,6	4,3
Carboxin	85,6	9,6
Cianazina	99,5	5,0
Clomazone	94,8	10,4
Demeton-S-metil-sulfona	80,8	6,0
Diazinona	87,0	9,9
Dicrotofós	86,0	14,5
Difenoconazol	97,0	18,6
Dimetoato	87,2	12,4
Dimetomorfe	84,5	5,8
Dimoxistrobina	95,2	10,5
Diuron	87,5	9,2
Dodemorfe	91,0	8,1
Epoxiconazol	109,7	5,8
Espinosade A	86,0	17,0
Etiofencarbe sulfona	95,8	6,6
Etiofencarbe sulfóxido	95,1	5,4
Etoprofós	85,2	9,1
Femproximato	107,6	9,9
Fempropimorfe	81,3	6,7
Fenamifós	86,4	4,5
Fenazaquina	115,3	5,0
Fluasifop- <i>p</i> -butílico	89,4	9,1
Flusilazol	99,0	12,9
Flutolanil	75,6	11,7
Flutriafol	104,4	14,9
Imazalil	75,7	5,4
Linurom	86,9	6,9
Linurom deuterado	84,0	10,0
Mecarbam	102,6	16,5
Mefosfolam	88,6	4,3
Mepronil	89,3	10,5
Metalaxil	91,9	7,4
Metiocarbe sulfona	83,7	10,2
Metobromurom	90,4	4,3
Metolacloro	101,1	9,1

Tabela 12. Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método QuEChERS, no nível de fortificação de 50 µg L⁻¹(*continuação*).

Compostos	Nível de fortificação 50 µg L ⁻¹	
	Rec (%)	RSD (%)
Mevinfós	85,9	10,3
Monocrotofós	82,7	12,7
Monolinurom	88,9	2,9
Ometoato	75,6	4,3
Paraoxon etil	89,4	8,1
Penconazole	94,0	7,6
Picoxistrobina	90,1	9,6
Piridafentiona	105,5	10,8
Pirifenox	112,7	11,6
Pirimifós-metil	88,6	7,8
Piriproxifem	101,7	8,8
Propanil	82,5	9,9
Propiconazole	75,9	14,0
Rotenona	97,1	16,3
Simazina	80,2	9,3
Tebuconazol	95,5	14,5
Tebufenozida	95,5	7,9
Terbutilazina	99,4	7,1
Tetraconazol	70,8	11,6
Tiabendazol	83,4	7,0
Tiacloprido	90,9	11,5
Tiobencarbe	95,9	12,0
Tiofanato metil	82,1	14,6
Triadimefom	92,8	13,1
Triazofós	82,3	7,8
Triflumizol	99,3	7,8
Triflumurom	84,6	16,5
Vamidationa	85,6	11,1

4.3.8 Aplicação do método em amostras reais

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em 14 amostras de suco de laranja integral, conforme descrito no item 3.8.

Foram encontrados resíduos dos agrotóxicos paraoxon etílico, simazina e triazofós abaixo do LOQ (< LOQ). No entanto, os compostos buprofezina, carbendazim e pirimifós metílico foram encontrados em concentrações acima do LOQ, porém abaixo do LMR estabelecido pela legislação brasileira. Na **Tabela 13** estão apresentados os resultados das análises.

Tabela 13. Resultados das amostras de suco de laranja integral analisadas.

Amostras	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$						
	Compostos						
	Buprofezina	Carbendazim	Pirimifós metílico	Triazofós	Paraoxon	Simazina	Demais compostos
A1	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	<LOQ	n.d.
A2	n.d.	9,4	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
A3	n.d.	10,0	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.
A4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ	n.d.
A5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ	n.d.
A6	n.d.	28,1	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ	n.d.
A7	n.d.	9,6	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.
A8	20,4	16,0	16,1	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.
A9	n.d.	9,8	n.d.	<LOQ	<LOQ	n.d.	n.d.
A10	n.d.	26,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A11	n.d.	9,3	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.
A12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ	n.d.
A13	n.d.	9,2	15,4	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
A14	n.d.	10,1	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.

De acordo com os resultados observados das análises das amostras avaliadas, não há indícios de riscos significantes para a saúde, em relação aos compostos estudados, associado ao consumo de suco de laranja integral na cidade de Santa Maria.

5 CONCLUSÕES

O método de extração QuEChERS empregando acetonitrila acidificada e tampão acetato de sódio mostrou-se ser eficaz para a extração de 74 agrotóxicos na matriz suco de laranja integral. A etapa de limpeza foi realizada utilizando como sorvente somente o PSA que foi suficiente para limpeza do extrato.

A utilização do planejamento fatorial de quatro variáveis proporcionou encontrar as melhores condições para o procedimento de extração e limpeza, bem como, a realização dos testes em um período de tempo inferior aquele em que não se usa planejamento. Isto acarreta também na diminuição no consumo dos reagentes. Através dessa ferramenta, verificou-se que, das variáveis analisadas, apenas o uso de acetato de sódio e PSA seriam suficientes para extração e limpeza. Etapas desnecessárias como adição de hidróxido de sódio, o qual tornaria o processo de extração mais demorado e passível a erros analíticos, puderam ser evitadas.

O preparo das soluções analíticas no solvente e no extrato da matriz “branco” permitiu a avaliação do efeito matriz, que foi pronunciado em alguns casos demonstrando o aumento de intensidade do sinal quando preparados no extrato “branco”. Assim, é visível a importância da quantificação das amostras serem realizadas em curvas preparadas no extrato “branco” da matriz.

Dos 76 agrotóxicos propostos, 74 foram passíveis de quantificação sendo que o composto benomil não apresentou faixa linear, porém se sabe que esse composto se degrada facilmente em carbendazim e assim o benomil é expresso na forma de carbendazim. Somente os compostos acefato e deltametrina não foram quantificados neste estudo. Os compostos apresentaram LOQ entre 4,9 a 26 $\mu\text{g L}^{-1}$, o que permitem a utilização do mesmo para verificação dos limites legais de resíduos permitidos em suco de laranja integral. Todos compostos quantificados obtiveram valores de coeficiente de correlação superiores a 0,99 tanto para curvas analíticas no solvente como na matriz, sendo que as faixas de trabalho variaram para cada composto, variando de 4,9 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 26 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

O método de extração QuEChERS, otimizado neste trabalho, tem como vantagem ser um procedimento dinâmico, simples, rápido, com poucas etapas

analíticas, o que diminui a probabilidade de erros, barato e ambientalmente correto, devido a utilização de somente 10 mL de acetonitrila.

O emprego de UHPLC-MS/MS com ionização por eletronebulização, no modo positivo, operando no modo MRM proporcionou detectabilidade, assim como seletividade satisfatória e alta sensibilidade. As condições cromatográficas otimizadas para a determinação por UHPLC-MS/MS permitiram a confirmação e quantificação dos compostos em estudo de forma adequada.

O método de determinação de resíduos de agrotóxicos proposto por este trabalho mostrou eficiência na aplicação em amostras reais, sendo que foram encontrados resíduos de agrotóxicos nas amostras analisadas. Como resultado, os compostos paraoxon etílico, simazina e triazofós foram detectados abaixo do LOQ e os compostos buprofezina, carbendazim e pirimifós metílico foram encontrados em concentrações acima do LOQ, porém abaixo dos LMRs estabelecidos pela legislação brasileira.

Por fim, conclui-se que o método QuEChERS aliado ao UHPLC-MS/MS é uma importante ferramenta para análise de resíduos de agrotóxicos em suco de laranja integral e pode ser utilizado em análises de rotina, visto que foram atendidos todos os parâmetros analíticos e exigências dos limites máximos estabelecidos, bem como eficácia na aplicação em amostras reais.

DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos gerados no desenvolvimento deste trabalho, tanto líquidos como sólidos, foram encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da UFSM para posterior tratamento e descarte.

Os resíduos sólidos foram colocados em sacos plásticos. Já os resíduos líquidos foram acondicionados em frascos e separados nas seguintes classes: halogenados, não halogenados, e resíduos de álcool e acetona, utilizados para limpeza do material de laboratório. Todos foram devidamente identificados e encaminhados ao almoxarifado.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Aumentar o escopo dos agrotóxicos;
- ✓ Otimizar os parâmetros cromatográficos para os compostos para os quais não foi possível determinar uma faixa linear de trabalho;
- ✓ Avaliar a possibilidade de aplicação do método para matriz laranja, sucos concentrados e néctares; bem como para diferentes frutas cítricas, por exemplo, para o limão e a tangerina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAN WOOD, 2012. Disponível em <<http://www.alanwood.net/>> Acesso em: 02/12/2012.

ANASTASSIADES, M.; SCHWACK, W. Analysis of carbendazim, benomyl, thiophanate methyl and 2,4- dichlorophenoxyacetic acid in fruits and vegetables after supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, v. 825, p. 45–54, 1998.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J.; Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticides in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003.

ANVISA (AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA); **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**, RE no 899, de 29/05/2003.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Início / **Agrotóxicos e Toxicologia / Assuntos de Interesse / Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos**. 2012a. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos>. Acesso em: 10/10/2012.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Qualidade e segurança dos alimentos e bebidas/resíduos e contaminantes. 2012b. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/qualidade-seguranca-alimentos-bebidas/alimentos/residuos-e-contaminantes>> Acesso em: 10/11/2012

BIGGI, E. **Os citros**. Campinas, SP: 1ª ed. Editora Prol, p. 15, 1986.

BOONCHIANGMA, S.; NGEONTAE, W.; SRIJARANAI, S. Determination of six pyrethroid insecticides in fruit juice samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 88, p. 209– 215, 2012.

BLASCO, C.; FONT, G.; PICÓ, Y; 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. 37-45, 2005.

BRASIL, 2009. Decreto Nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-010/2009/Decreto/D6871.htm> Acesso em: 26/01/2012.

BRASIL, 2012. MAPA. Instrução Normativa nº 21 de 27 de agosto de 2012. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Fixa a quantidade mínima de cinquenta por cento de suco de laranja no Néctar de Laranja. **Diário Oficial União**, nº 167, Seção 1, pág. 2.

BRASIL, 2002. Decreto no 4.074, de 4 de janeiro de 2002. 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 das outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 jan 2002. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm>. Acesso em: 26/01/2012.

BRASIL, 2013. MAPA/PNCRC. Instrução Normativa nº 1 de 4 de janeiro de 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Publicação dos resultados dos Programas Nacionais de Controle de Resíduos e Contaminantes nas culturas. **Diário Oficial União**. p. 10. Seção 1 de 07 de janeiro de 2013.

BRASIL, J. L.; VAGHETTI, J. C. P.; SANTOS JR, B. R. A.; SIMON, N. M.; PAVAN, F. A.; DIAS, S. L. P.; LIMA, E. C. Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de biossorção de Cu(II) em batelada utilizando-se casca de nozes pecã como biossorvente. **Química Nova**, v.30, n.3, p.548-553, 2007.

BROADINSTITUTE. Mass Spectrometry. Disponível em: <http://www.broadinstitute.org>. Acesso em: 21/02/2013.

CABRERA, L.C.; MARTINS, M.L.; PRIMEL, E.G.; PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4(3), p. 227-240, 2012.

CARNEIRO, F F; PIGNATI, W; RIGOTTO, R M; AUGUSTO, L G S. RIZZOLO, A; FARIA, NMX; ALEXANDRE, V P.; FRIEDRICH, K; MELLO, M S C. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1- Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. Rio de Janeiro: **ABRASCO**, 2012.

CitrusBR.(Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos). A Indústria Brasileira de suco de laranja. Catálogo, Publicação institucional. Presidente Executivo Christian Lohbauer. Coordenação editorial Ibiapaba Netto. Tradução BTS, Catálogo. 2011.

CODEX ALIMENTARIUS. Method Validation, Joint Fao/Who Food Standards Programme, Codex on Methods of Analysis and Sampling, Budapeste, 2001.

CODEX ALIMENTARIUS. **Pesticides Residues in Food and Feed-Glossary of terms.** 2010. Disponível em:<<http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/reference/glossary.html>>. Acesso em: 26/02/2013.

COSTA, L.M.; GRAÇAS, M.; KORN, A.; CASTRO, J.T. Planejamento fatorial aplicado à digestão de amostras de feijão assistida por radiação microondas. **Quim. Nova**, v. 29, p. 149-152, 2006.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, v.9, n.1,p. 23-31, 2008.

CHIARADIA, M.C. Desenvolvimento, validação e aplicação de métodos para análise multirresidual de agrotóxicos em suco de laranja e tangerina utilizando CLAE-DAD, CL-EM-EM E CLUE-DAD. **Tese de doutorado**, UNICAMP, Campinas, 2009.

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.

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.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2013. Disponível em: http://faostat3.fao.org/home/index_es.html?locale=es#VISUALIZE>. Acesso em 02/01/2013.

FERNANDES, V.C.; DOMINGUES, V.F.; MATEUS, N.; MATOS, C.D. Determination of Pesticides in Fruit and Fruit Juices by Chromatographic Methods. An Overview. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, p.715-730, 2011.

FENOLL, J.; HELLÍN, P.; CARMEN M. MARTÍNEZ, C.M.; FLORES, P. Multiresidue Analysis of Pesticides in Vegetables and Citrus Fruits by LC–MS–MS. **Chromatographia**, v. 72, p. 857-866, 2010.

FERRER, C.; LOZANO, A.; AGÜERA, A.; GIRÓN, A.J.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p. 7634– 7639, 2011.

FUNDECITRUS (Fundo de defesa da citricultura). Grade de Ingredientes Ativos de Inseticidas, Acaricidas, Fungicidas e Herbicidas para o uso na Produção Integrada dos Citros (PIC). Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/Pagina/canrocitrico,108>>. Acesso em 01/10/2012.

FRENICH, A. G; VIDAL, J.L.M. PASTOR-MONTORO, E.; ROMERO-GONZÁLEZ, R. High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem.** v. 390, p. 947–959, 2008.

GOSETTI, F.; MAZZUCCO, E.; ZAMPIERI, D.; GENNARO M. C. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3929, 2010.

GONÇALVES, A.C. Especial citricultura - Como definir o suco de laranja. **Revista Agroanalysis**. 2009. Disponível em <http://www.agroanalysis.com.br/especiais_detalle.php?idEspecial=49&ordem=3>. Acessado em: 12/12/2012.

GLOBO. Exportação de suco concentrado aos EUA é suspensa temporariamente. 15/02/2012 Disponível em: <http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2012/02/industria-suspende-exportacao-de-suco-concentrado-aos-eua.html> Acesso em: 16/02/2012.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry: a textbook**. Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 2004. 518 p.

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

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, revisão 04, 2011.

JIN, B.; XIE, L.; GUO, Y.; PANG, G. Multi-residue detection of pesticides in juice and fruit wine: A review of extraction and detection methods. **Food Research International**, v. 46, p. 399–409, 2012.

KITTLAUS, S.; SCHIMANKE, J.; KEMPE, G.; SPEER, K. Assessment of sample cleanup and matrix effects in the pesticide residue analysis of foods using postcolumn infusion in liquid chromatography–tandem mass Spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 8399–8410, 2012.

KOLLER, O.C. **Citricultura laranja, limão e tangerina**. Porto Alegre, RS: editora Rígel, p.11-25, 1994.

LACINA, O.; URBANOVA, J.; POUSTKA, J.; HAJŠLOVA, J. Identification/quantification of multiple pesticide residues in food plants by ultra-high-performance liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 648–659, 2010.

LANCAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: São Paulo, 2009, p.319-346.

LEHOTAY, S.; MASTOVSKA, A. R.; LIGHTFIELD, J. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of AOAC International*, v. 88, n. 2, p. 615-629, 2005.

MAIA, M.L. **Citricultura Paulista: evolução, estrutura e acordos de preços**. São Paulo, SP: editora IEA (instituto de economia agrícola), coleção estudos agrícolas, p. 157.1996.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. UHPLC – Uma Abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4(3), p.197-207, 2012.

MAPA. (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus>. MAPA, 2013a. Acesso em: 07/02/2013.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/agrotoxico>. MAPA, 2013b. Acesso em: 02/02/2013.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/internacional/negociacoes/multilaterais/codex-alimentarius>. MAPA, 2013c. Acesso em: 02/01/2013.

MOREIRA, R. A. ; CRUZ, M. C. M. Fruticultura : O grupo cítrico das laranjas. **Jornal Democrata**, São José do Rio Pardo - SP, v. 1145, p. 6 - segundo caderno, 30 de abril de 2011. Disponível em: <http://fruticultura.webnode.com.br/news/o-grupo-citrico-das-laranjas/> Acessado em : 06/12/12.

Nestlé. “Alimentos: Laranja”. Disponível em <<http://www.nestle.pt/SaboreiaaVida/Alimentacao/alimentos/Pages/Laranja.aspx>> Acessado em 05/08/2012.

NEVES, M.F. (Coord.) **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia, 2010.

NETO, B. de B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos. 4aed., Bookman, 2010, cap: 3 e 6.

NIESSEN, W.M.A.; MANINI, P.; ANDREOLI, R. Matrix Effects In Quantitative Pesticide Analysis Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, p. 881– 899, 2006.

PAN Pesticide Database. Disponível em: <<http://www.pesticideinfo.org>> Acesso em: 20/12/2012.

PARA (Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos). Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2002-2008. **Brasília, 15 de abril de 2009**. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>>.Pdf, 2009.

PARA (Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos). Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2009. **Brasília -DF, 24 de junho de 2010** Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>>. Pdf, 2010.

PARA (Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos). Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2010. **Brasília, 05 de dezembro de 2011.** Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>>. Pdf, 2011.

PÉREZ, L. M.R. ; BORGES, J. H.; DELGADO, M.A.R. Multi-walled carbon nanotubes as efficient solid-phase extraction materials of organophosphorus pesticides from apple, grape, orange and pineapple fruit juices. **Journal of Chromatography A**, v. 1211, p. 33–42, 2008.

PICÓ, Y.; KOZMUTZA, C. Evaluation of pesticide residue in grape juices and the effect of natural antioxidants on their degradation rate. **Anal Bioanal Chem**, v. 89, p. 1805–1814, 2007.

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

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados a espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.

QUEIROZ, S.C.N.; FERRACINI, V.L.; ROSA, M.A. Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando QuEChERS e UPLC-MS/MS. **Quim. Nova**, v. 35, p. 185-192, 2012.

QUEIROZ, S.S.; TORRES, M.A.A. Anemia ferropriva na infância. *J Pediatr. V. 76(Supl.3):s298-s304, 2000. Disponível em: <http://www.jpmed.com.br/conteudo/00-76-s298/port.asp>. Acesso em: 04/12/12*

USDA (United States Department of Agriculture). “*National Nutrient Database for Standard Reference*”,. Disponível em <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>. Acessado em 22/11/2012.

USDA (United States Department of Agriculture). International Maximum Residue Level Database. Disponível em: <http://www.mrl-database.com>. Acesso em: 03/01/2013.

RAINA, R. Chemical Analysis of Pesticides Using GC/MS, GC/MS/MS, and LC/MS/MS, Pesticides - Strategies for Pesticides Analysis. Ed. Prof. Margarita Stoytcheva, 2011. Capítulo 5.

RAVELO-PÉREZA, L.M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M.A. Multi-walled carbon nanotubes as efficient solid-phase extraction materials of organophosphorus pesticides from apple, grape, orange and pineapple fruit juices. **Journal of Chromatography A**, v.1211, p. 33–42, 2008.

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

RIDGWAY K.; LALLJIE S. P. D.; SMITH R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v.1153, p. 36–53, 2007.

ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J.L.M. 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.

SANCO. **Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. Document No. 12495/2011.

SOLER, C.; MAÑES, J.; PICÓ, Y. Routine application using single quadrupole liquid chromatography–mass spectrometry to pesticides analysis in citrus fruits. **Journal of Chromatography A**, v. 1088, p. 224, 2005.

Tetra Pak Magazine. Jörgen Haglind e Berit Schannong. Tradução: Sueli Monteiro, Oficina de Textos. Adaptação em português: Cleusa Carvalho, **Tema: Sucos, Néctares e bebidas não carbonatada**, 2009.

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

WANG, J.; CHOW, W.; LEUNG, D. Applications of LC/ESI-MS/MS and UHPLC QqTOF MS for the determination of 148 pesticides in fruit and vegetables. **Anal Bioanal Chem**, v.396, p. 1513–1538, 2010.

ANEXO 1

Superfícies de Resposta obtidas pelo planejamento fatorial 2⁴

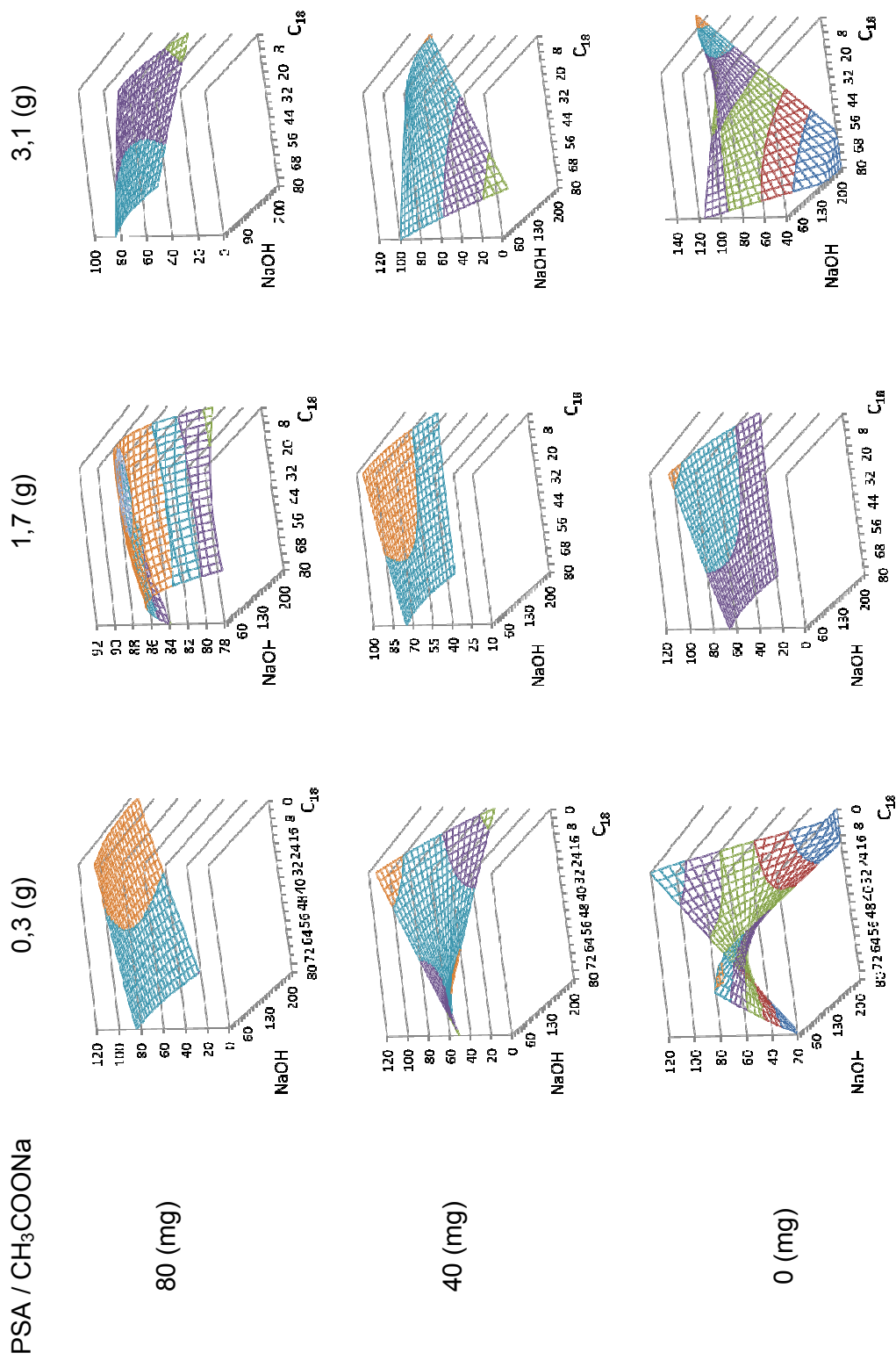
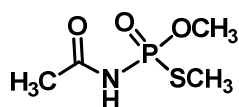


Figura 15. Superfícies de Respostas em função da percentagem de compostos obtidos.

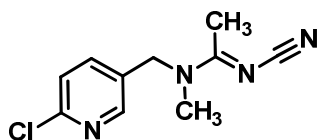
ANEXO 2

Fórmulas estruturais dos compostos estudados nesta Dissertação

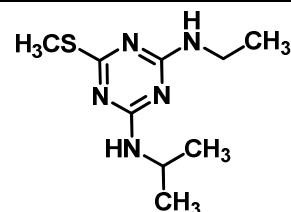
Tabela 14. Fórmulas estruturais dos compostos estudados.



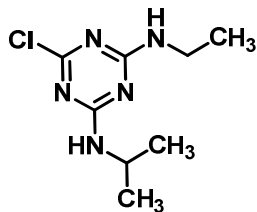
Acefato



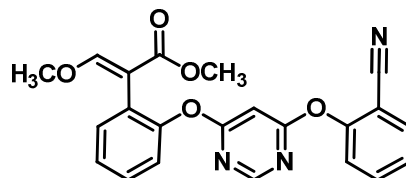
Acetamiprido



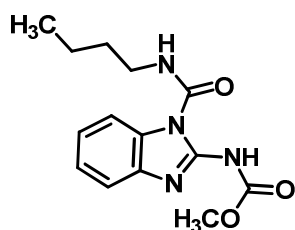
Ametrina



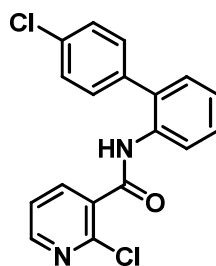
Atrazina



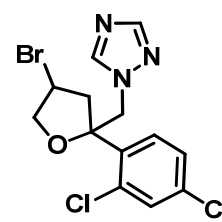
Azoxistrobina



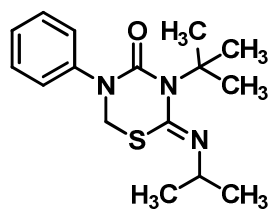
Benomil



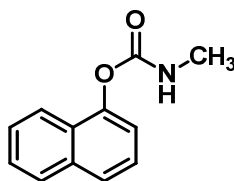
Boscalida



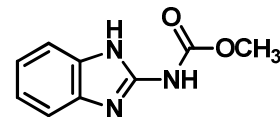
Bromuconazole



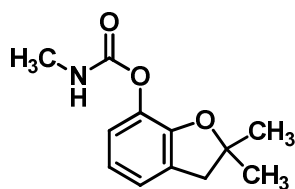
Buprofezina



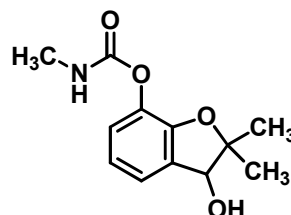
Carbaril



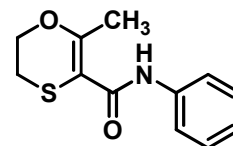
Carbendazim



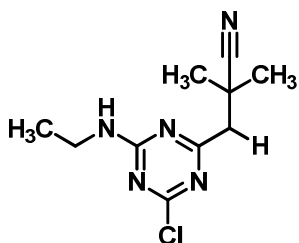
Carbofurano



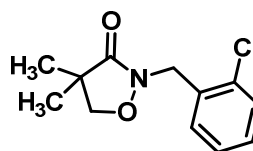
3-OH-carbofurano



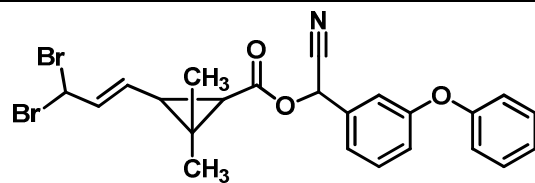
Carboxim



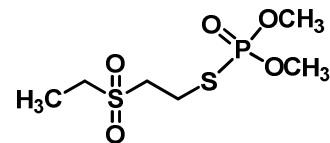
Cianazina



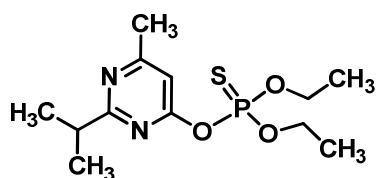
Clomazona

Tabela 14. Fórmulas estruturais dos compostos estudados (*continuação*).

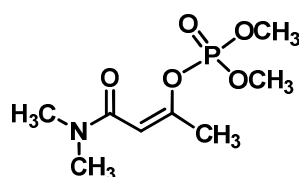
Deltametrina



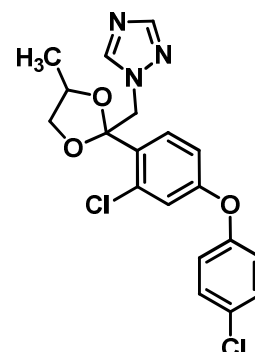
Demeton-S-metil sulfona



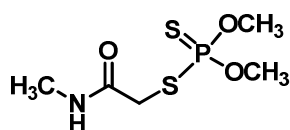
Diazinona



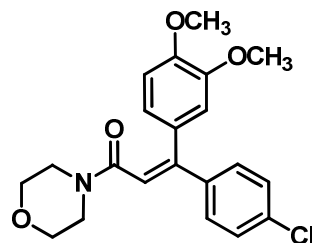
Dicrotofós



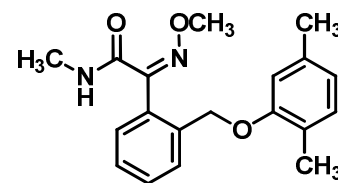
Difenoconazol



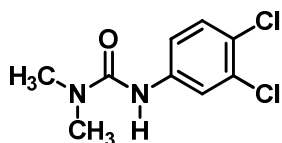
Dimetoato



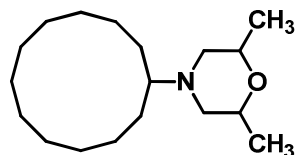
Dimetomorfe



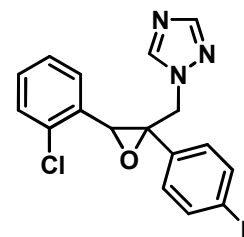
Dimoxistrobina



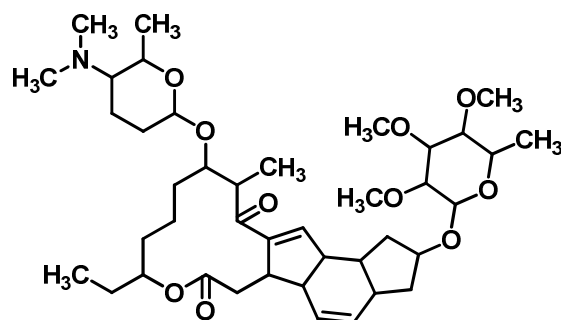
Diuron



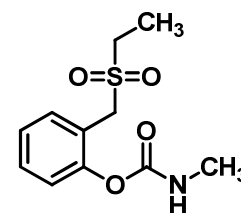
Dodemorfe



Epoxiconazol

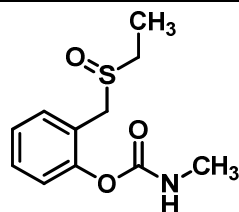


Espinosade A

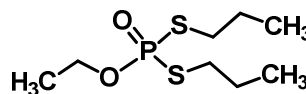


Etiofencarbe sulfona

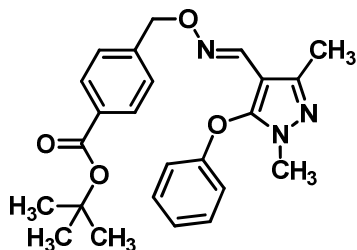
Tabela 14. Fórmulas estruturais dos compostos estudados (*continuação*).



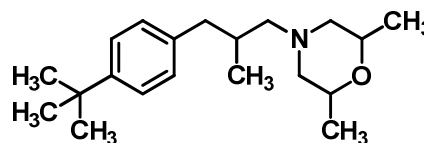
Etiofencarbe sulfóxido



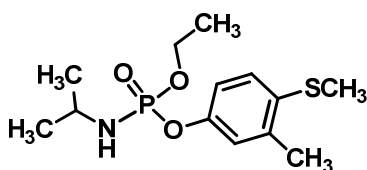
Etoprofós



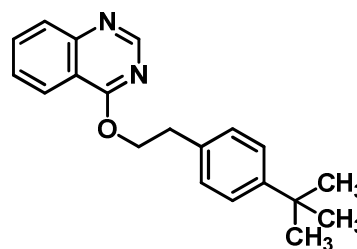
Femproximato



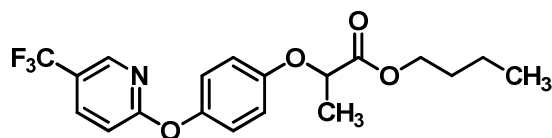
Fempropimorfe



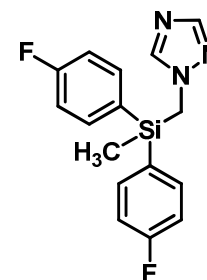
Fenamifós



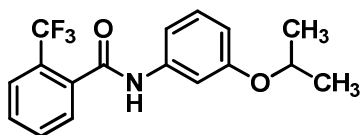
Fenazaquina



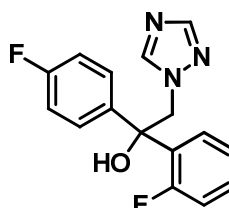
Fluasifop-p-butil



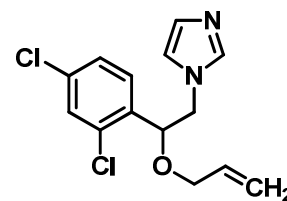
Flusilazol



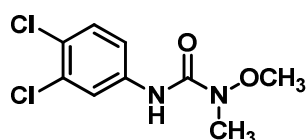
Flutolanil



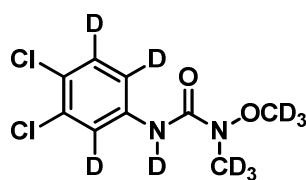
Flutriafol



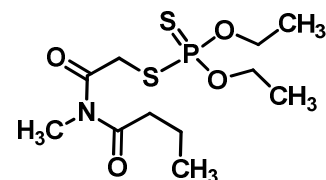
Imazalil



Linurom



Linurom deuterado (PC)



Mecarbam

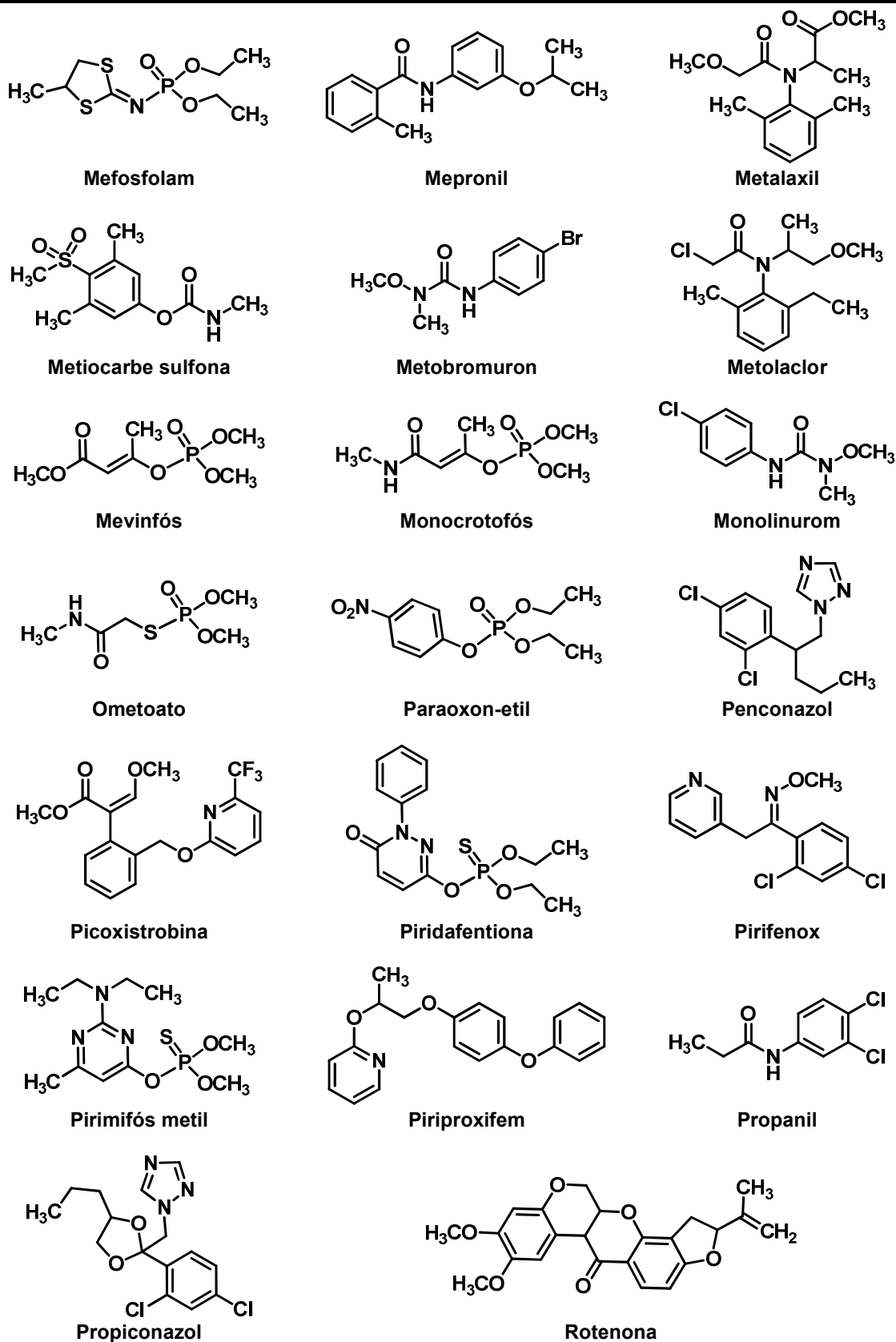
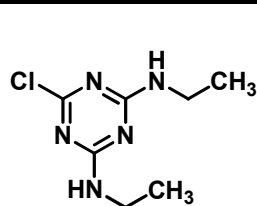
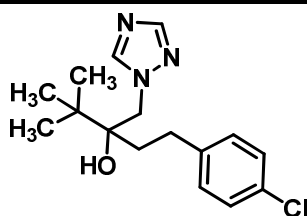
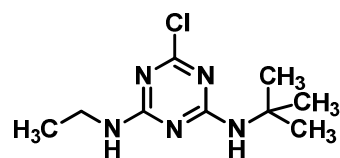
Tabela 14. Fórmulas estruturais dos compostos estudados (*continuação*).

Tabela 14. Fórmulas estruturais dos compostos estudados (*continuação*).

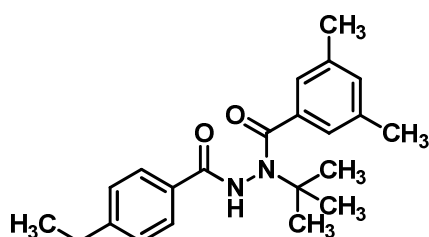
Simazina



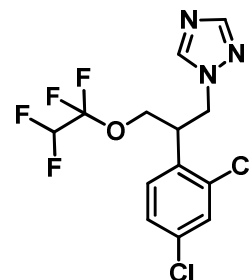
Tebuconazol



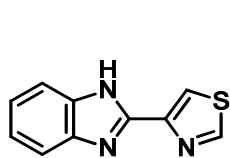
Terbutilazina



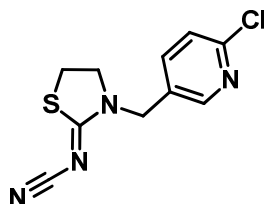
Tebufenozida



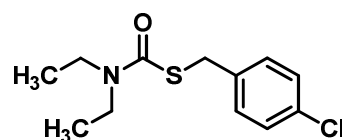
Tetraconazol



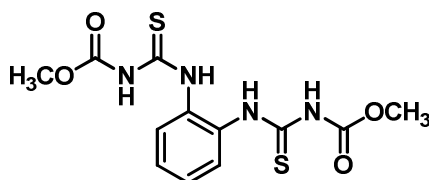
Tiabendazol



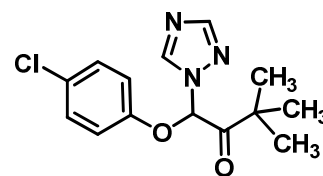
Tiacloprido



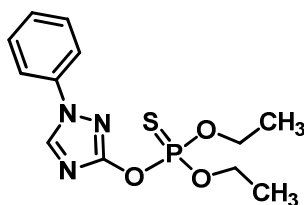
Tiobencarbe



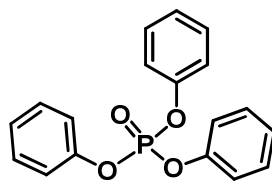
Tiofanato-metil



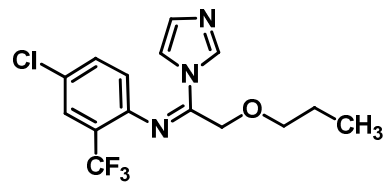
Triadimefom



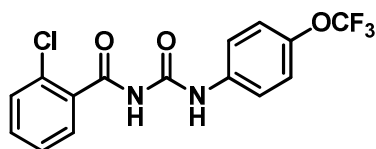
Triazofós



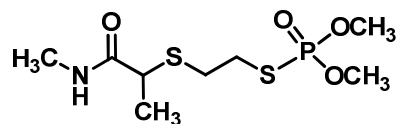
Trifenilfosfato (PI)



Triflumizol



Triflumurom



Vamidação

ANEXO 3

**Transições relativas ao modo MRM dos compostos estudados nesta
dissertação**

Tabela 15. Transições relativas ao modo MRM dos compostos estudados nesta dissertação.

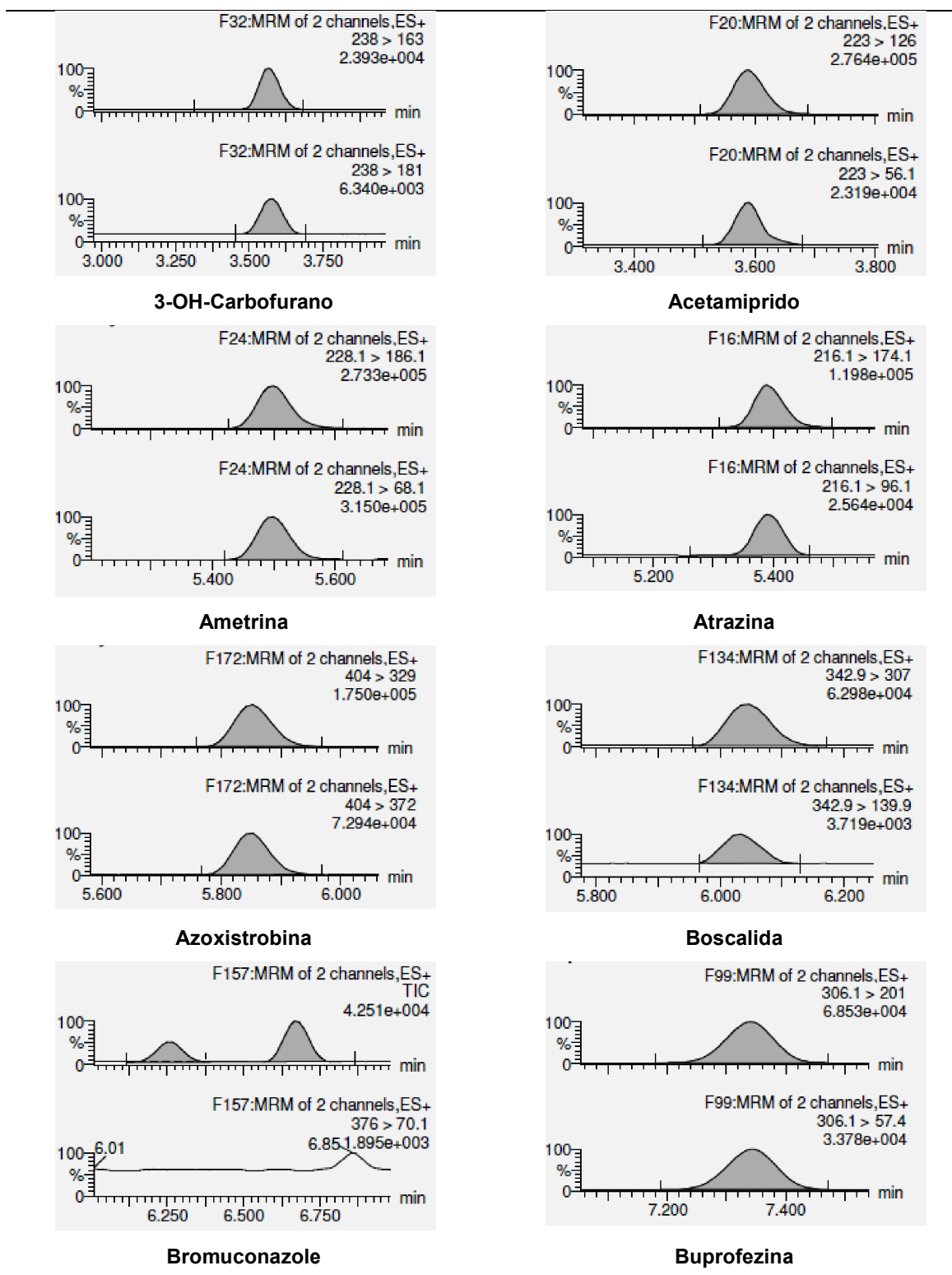


Tabela 15. Transições relativas ao modo MRM dos compostos estudados nesta dissertação (*continuação*).

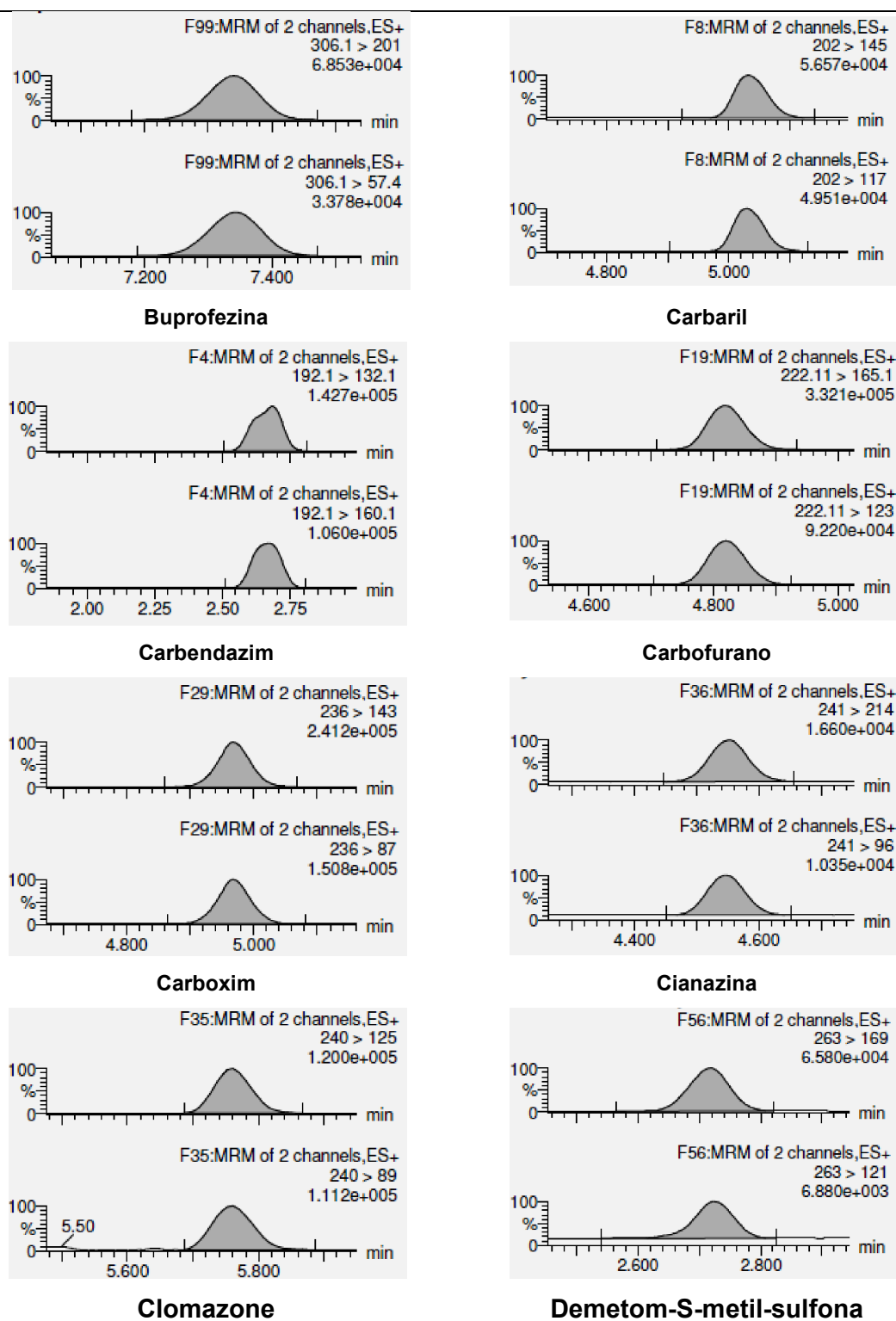


Tabela 15. Transições relativas ao modo MRM dos compostos estudados nesta dissertação (*continuação*).

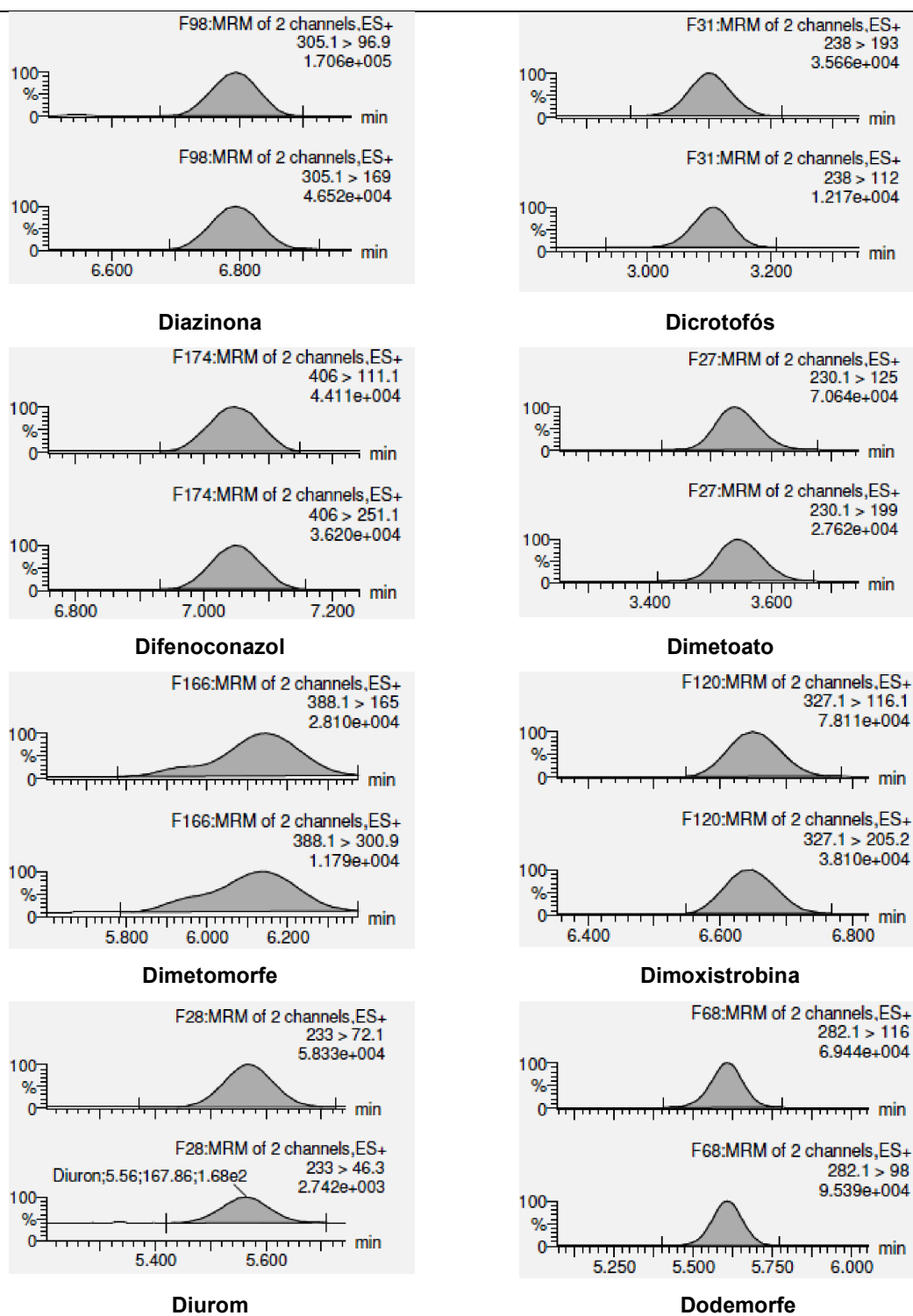


Tabela 15. Transições relativas ao modo MRM dos compostos estudados nesta dissertação (*continuação*).

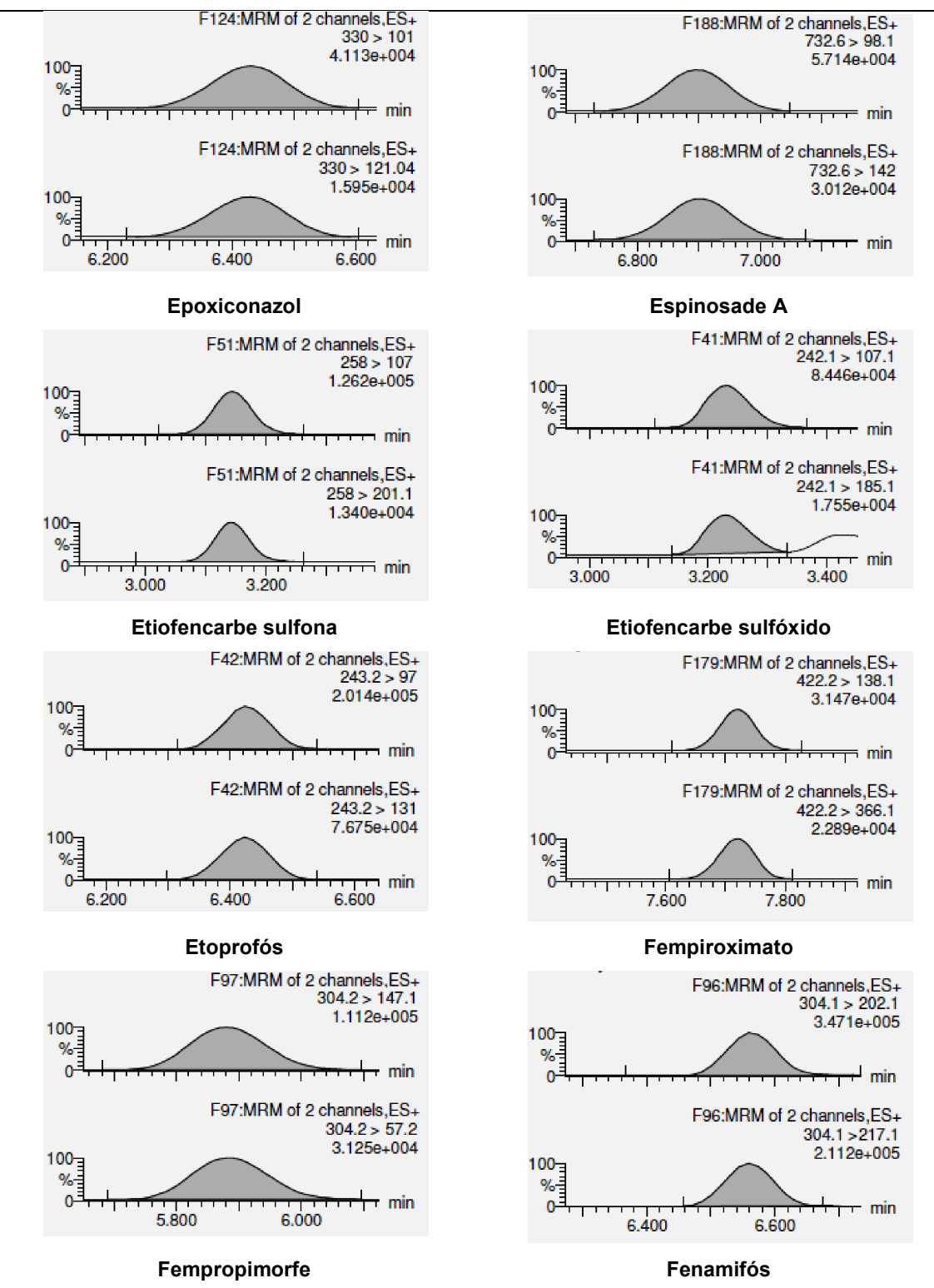


Tabela 15. Transições relativas ao modo MRM dos compostos estudados nesta dissertação (*continuação*).

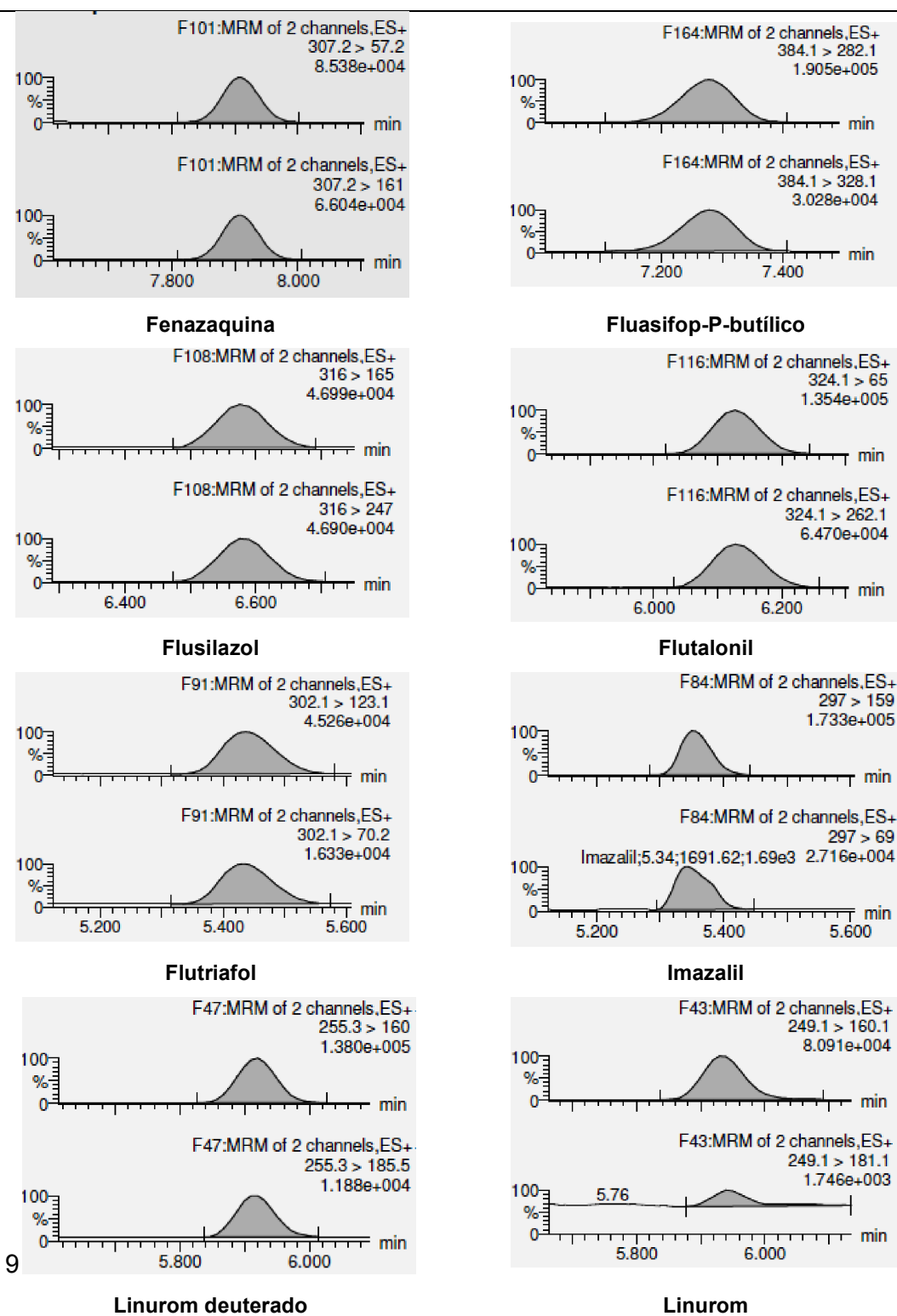


Tabela 15. Transições relativas ao modo MRM dos compostos estudados nesta dissertação (*continuação*).

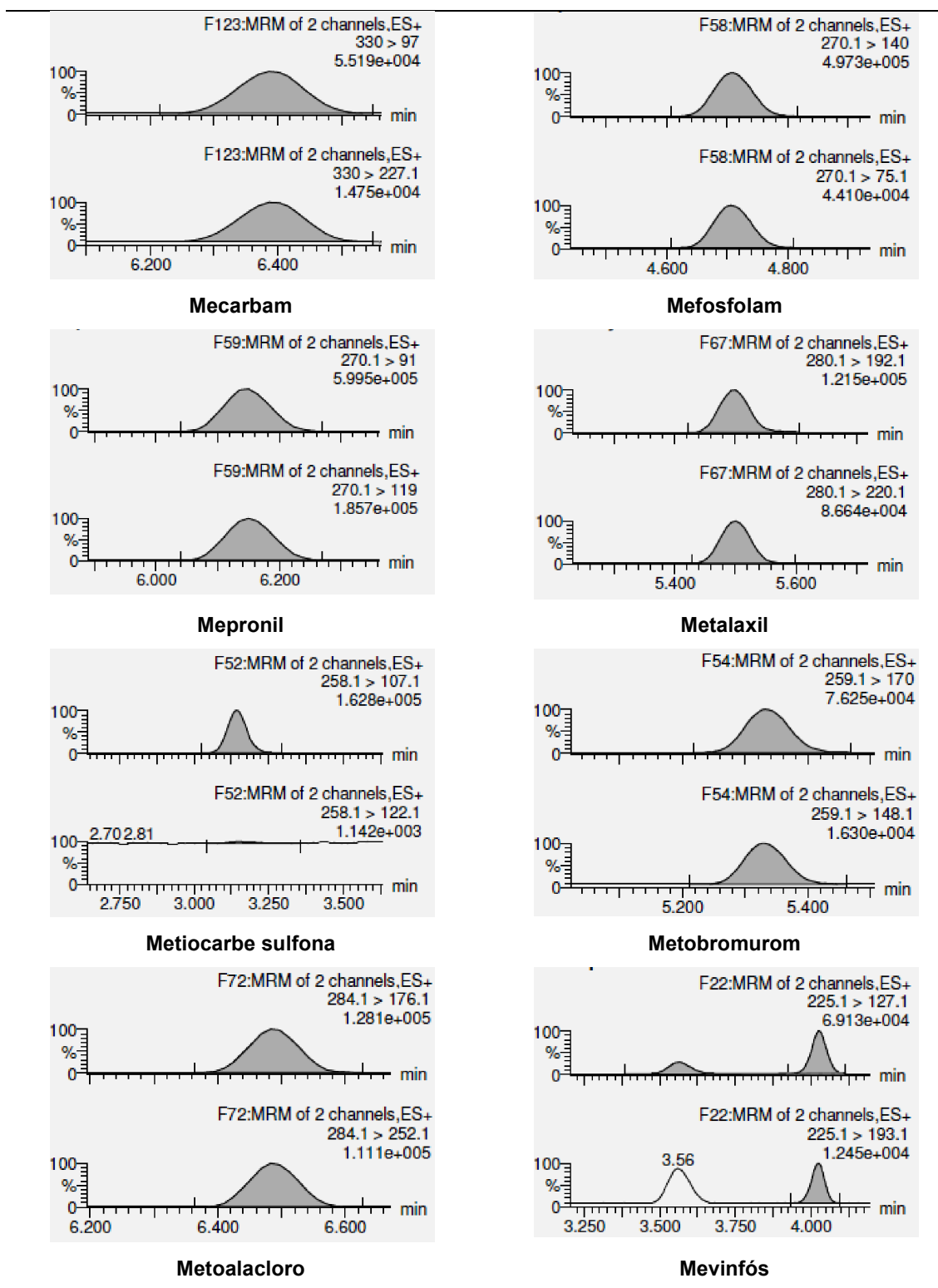


Tabela 15. Transições relativas ao modo MRM dos compostos estudados nesta dissertação (*continuação*).

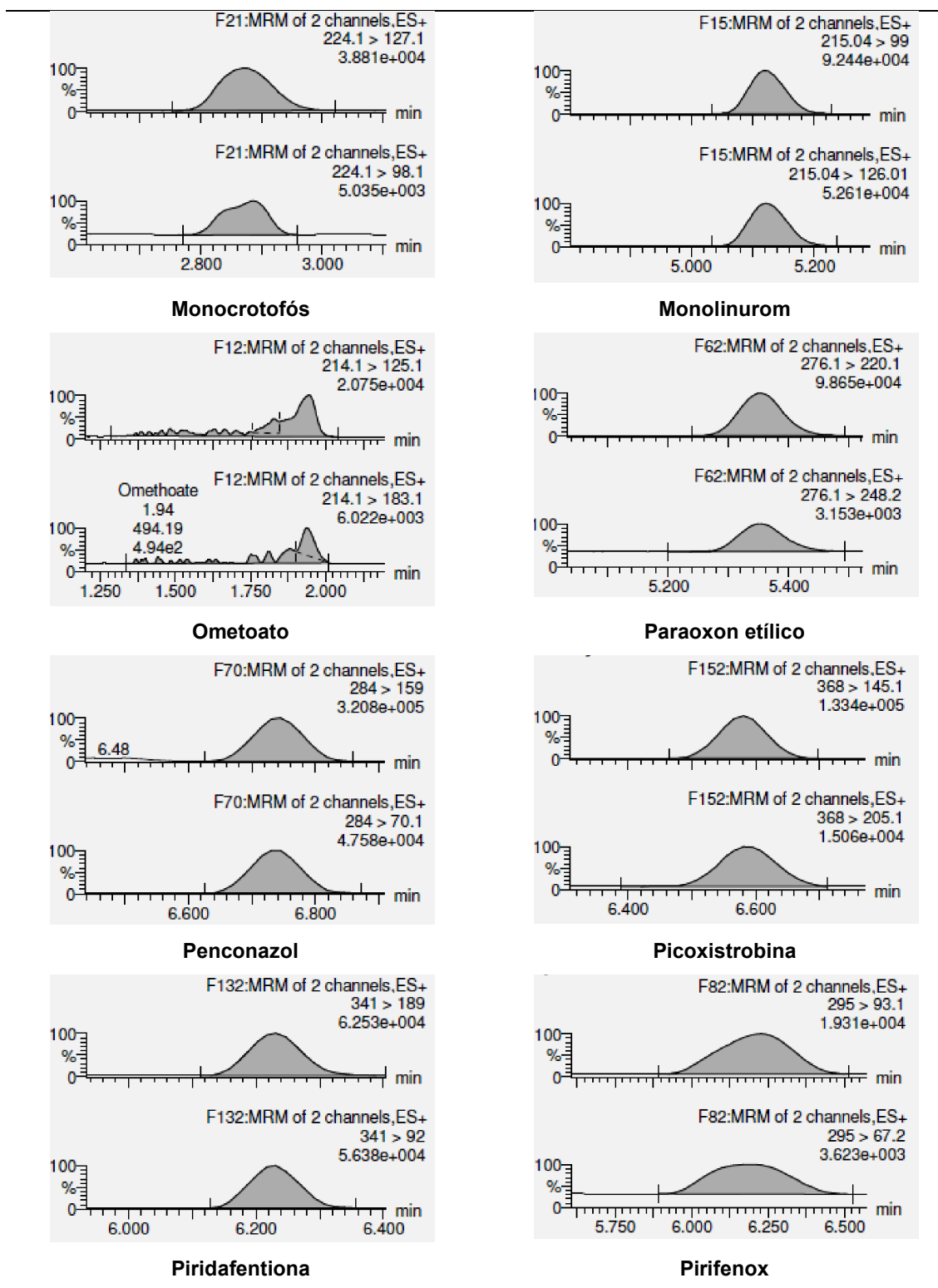


Tabela 15. Transições relativas ao modo MRM dos compostos estudados nesta dissertação (*continuação*).

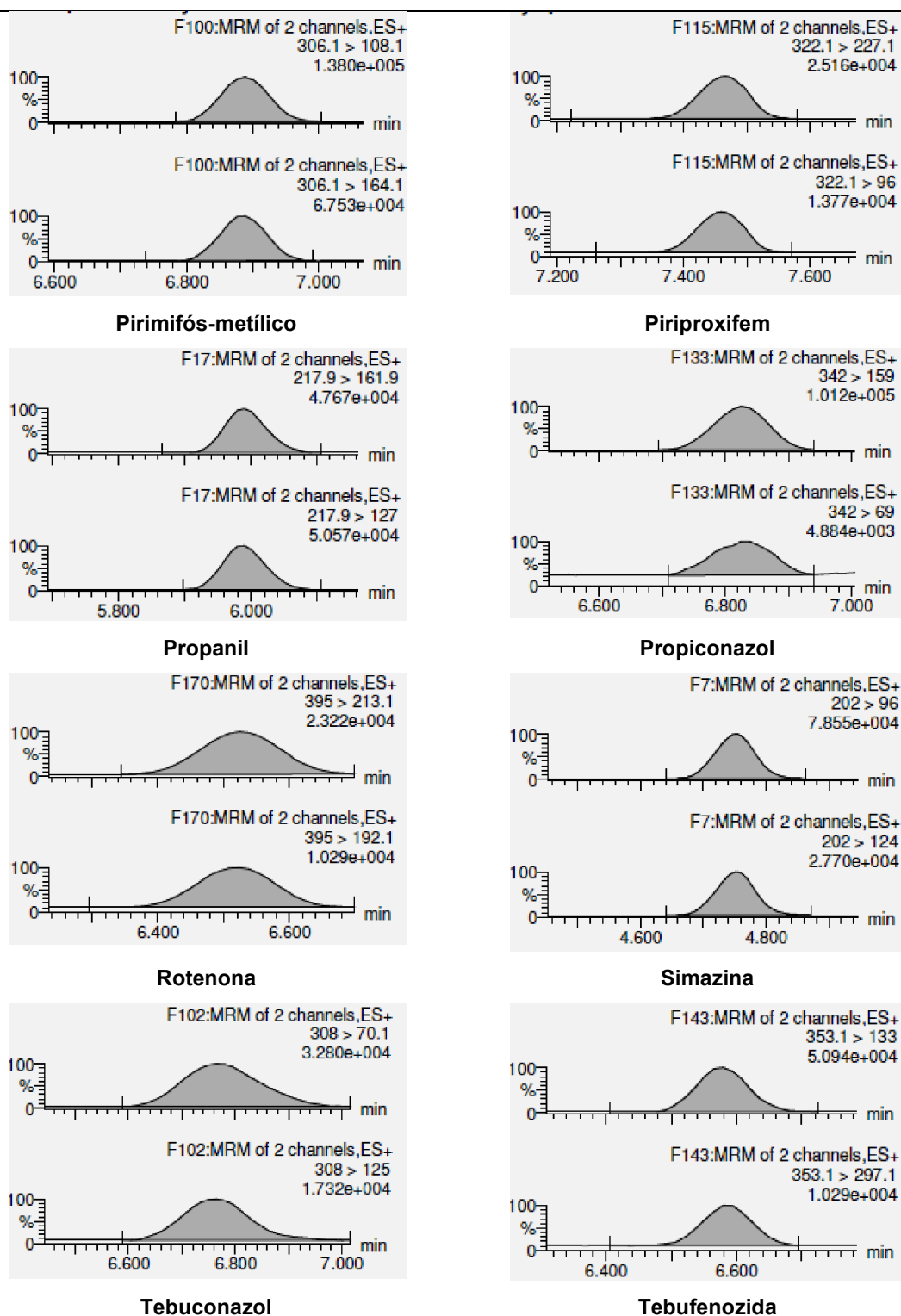


Tabela 15. Transições relativas ao modo MRM dos compostos estudados nesta dissertação (*continuação*).

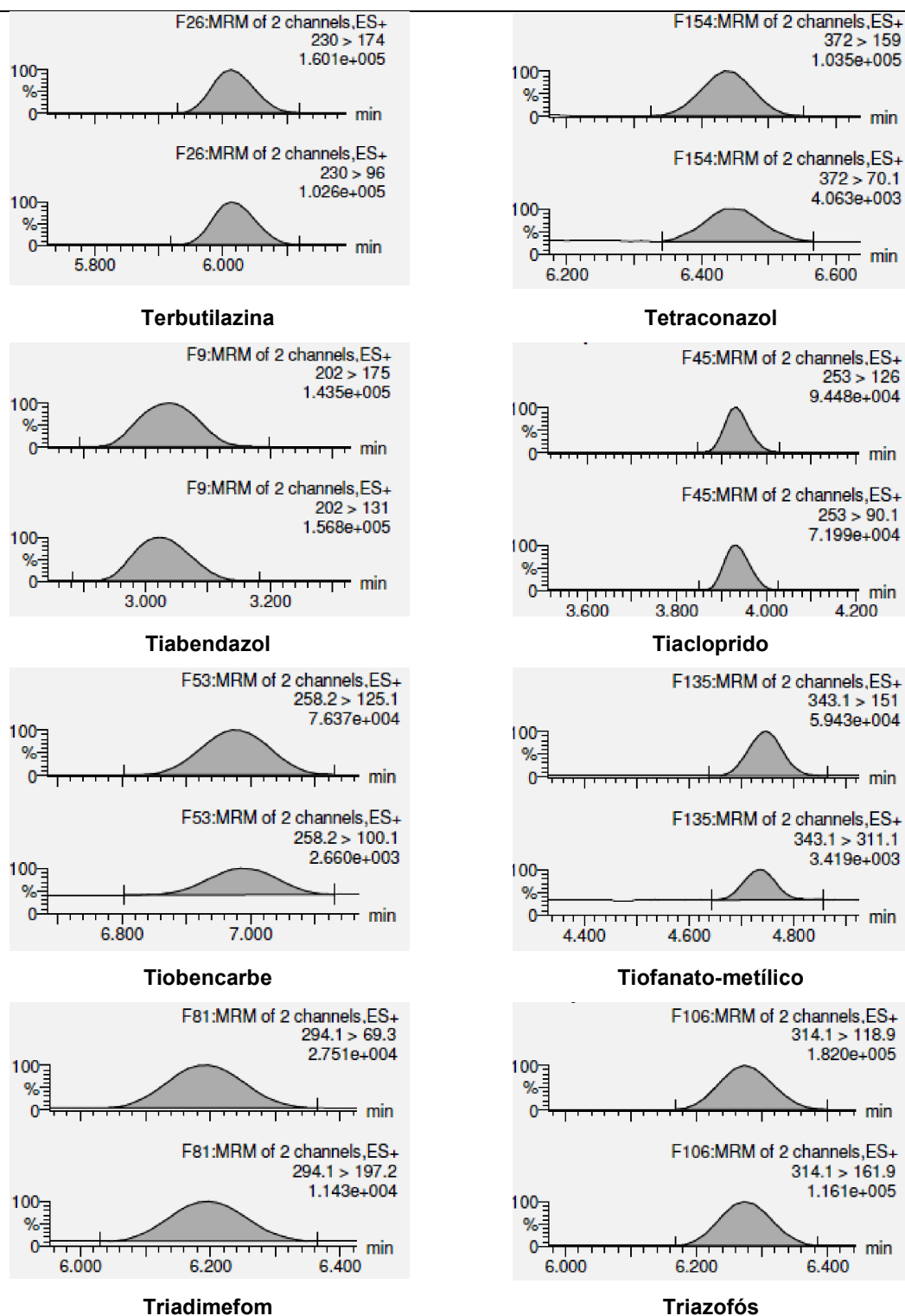


Tabela 15. Transições relativas ao modo MRM dos compostos estudados nesta dissertação (*continuação*).

