



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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
MULTIRRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO DE
AGROTÓXICOS EM TRIGO POR LC-MS/MS E GC-MS/MS**

TESE DE DOUTORADO

Maria Tereza Friedrich

**Santa Maria, RS, Brasil.
2014**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
MULTIRRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO DE
AGROTÓXICOS EM TRIGO POR LC-MS/MS E GC-MS/MS**

Maria Tereza Friedrich

Tese apresentada ao 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
Doutor em Química

Orientador: Professor Dr. Renato Zanella

Santa Maria, RS, Brasil.
2014

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


A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO PARA
DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM TRIGO POR LC-MS/MS E GC-MS/MS**
elaborada por

Maria Tereza Friedrich

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

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Renato Zanella (Orientador, UFSM)



Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto (IQSC-USP)



Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves (FURG)



Prof. Dr. Roger Wagner (UFSM)



Prof. Dr. Osmar Damian Prestes (UFSM)

Santa Maria, 29 de outubro de 2014

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM TRIGO POR LC-MS/MS E GC-MS/MS

AUTOR: MARIA TEREZA FRIEDRICH
ORIENTADOR: Prof. Dr. RENATO ZANELLA
Santa Maria, 29 de outubro de 2014

No Brasil a produção de trigo oscila entre 5 e 6 milhões de toneladas por ano, sendo que 90% das lavouras se encontram na região sul do País. A fim de aumentar a produtividade, o uso de agrotóxicos tem sido prática constante, tornando o Brasil o maior consumidor de agrotóxicos no mundo. O crescente interesse por alimentos livres de resíduos de agrotóxicos tem impulsionado o desenvolvimento de métodos analíticos visando garantir a confiabilidade dos resultados. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método para determinação multirresíduo de agrotóxicos em trigo por LC-MS/MS e GC-MS/MS, incluindo o estudo sistemático dos parâmetros de extração e a avaliação estatística dos resultados da validação do método. O planejamento fatorial 2^4 foi utilizado para avaliar o mais adequado tipo de solvente e de agitação, diferentes processos de partição e de limpeza dos extratos. A linearidade foi avaliada para 10 níveis de concentração de soluções preparadas no solvente e no extrato branco da matriz. Para verificar a exatidão e precisão do método, efetuou-se a fortificação nos níveis 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ($n=8$). Os resultados foram avaliados quanto à presença de valores extremos, através do teste de Grubbs. A repetitividade foi avaliada através do teste de HorRat para 10, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A precisão intermediária foi avaliada em dias diferentes ($n=4$) e os resultados foram comparados utilizando o teste t. A estimativa da incerteza das medições foi determinada a 10 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A utilização de acetato de etila como solvente, de ultrassom como agitação, de ultracongelamento para a etapa de partição e de C18 para limpeza dos extratos forneceu as melhores recuperações com diferença significativa para a maioria dos compostos avaliados. As curvas analíticas apresentaram normalidade na distribuição, homocedasticidade, independência dos resíduos e linearidade adequada, com r^2 maior que 0,99 para todos os analitos. Foram obtidos valores de recuperação entre 70 e 120%, com RSD <20% para 99% dos analitos. Os valores de LOD e LOQ do método variaram entre 3,3 e 6,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e entre 10 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. A incerteza variou de 15 a 32% para o menor nível de menor concentração e de 5,1 a 21% para o maior nível de concentração. O emprego de planejamento experimental facilitou o desenvolvimento do método. Trigo se mostrou uma matriz complexa, requerendo o preparo de soluções analíticas em extratos de trigo isento dos analitos para compensar o efeito matriz. O método validado foi considerado adequado para análise multirresíduo de agrotóxicos em trigo por LC-MS/MS e GC-MS/MS atendendo os requisitos para monitorando dos limites máximos de resíduos vigentes.

Palavras Chave: Planejamento de Experimentos; Preparo de Amostra; Incerteza de medição; Cromatografia.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Graduate Program in Chemistry
Universidade Federal de Santa Maria

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A MULTIRESIDUE METHOD FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDES IN WHEAT BY LC-MS/MS AND GC-MS/MS

AUTHOR: MARIA TEREZA FRIEDRICH
ADVISOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA
Santa Maria, October 29th, 2014.

In Brazil the production of wheat ranges between 5 and 6 million tons per year, with 90% of the crops in the southern region of the country. To improve the productivity, pesticide use has been a constant practice, making Brazil the largest consumer of pesticides in the world. The growing interest in food free of pesticide residues has driven the development of analytical methods to ensure reliable results. The aim of this study was to develop a multiresidue method for the determination of pesticides in wheat by LC-MS/MS and GC-MS/MS, including the systematic study of the extraction parameters and statistical evaluation of the method validation results. A 2⁴ factorial design was employed to evaluate, the most adequate type of solvent and agitation, different partitioning processes and clean-up. The linearity was evaluated for 10 concentration levels prepared in solvent and in blank matrix extract. Method accuracy and precision were verified with samples spiked at 10, 20, 50 and 100 µg kg⁻¹ (n = 8). Results were evaluated for the presence of outliers, using the Grubbs test. The repeatability was evaluated using the HorRat test for the levels 10, 50 and 100 µg kg⁻¹. Intermediate precision was evaluated by analyses conducted on different days (n = 4) and the results were compared using the t-test. The estimated uncertainty of the measurements was determined at 10 and 100 µg kg⁻¹. The use of ethyl acetate as solvent, ultrasonic agitation, deep freezing in the partition step and clean-up with C18 gave the best recoveries with a significant difference for the majority of the evaluated compounds. The analytical curves presented normal distribution, homoscedasticity, independence of residues and adequate linearity, with r² greater than 0.99 for all analytes. Recoveries between 70 and 120% with RSD <20% were obtained for 99% of the analytes. The method LOD and LOQ ranged between 3.3 and 6.7 µg kg⁻¹ and between 10 and 20 µg kg⁻¹, respectively. Uncertainties ranged from 15 to 32% at the lowest level of concentration and from 5.1 to 21% at the highest level of concentration. The use of experimental design facilitated the development of the method. Wheat showed to be a complex matrix, requiring the preparation of analytical solutions in wheat extracts free of analytes to compensate for the matrix effect. The validated method was considered suitable for multiresidue analysis of pesticides in wheat by LC-MS/MS and GC-MS/MS meeting the requirements for monitoring the maximum residue limits established.

Keywords: Design of Experiments; Sample preparation; Measurement uncertainty; Chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da produção de trigo no Brasil.....	4
Figura 2 - Estrutura química dos triazóis	7
Figura 3 - Estrutura química dos ditiocarbamatos	7
Figura 4 – Estrutura química dos organoclorados	9
Figura 5 - Estrutura químicas geralmente associadas aos organofosforado.....	10
Figura 6 - Estruturas químicas dos piretróides.	10
Figura 7 - Estruturas químicas dos carbamatos.	11
Figura 8 - Estruturas químicas dos herbicidas do grupo das imidazolinonas	12
Figura 9 - Estrutura químicas dos triazinas	12
Figura 10 - Estrutura química das ureias. (a) estrutura química do diurom (b) estrutura química do tebutiron.....	13
Figura 11 - Porcentagem de agrotóxicos vendidos em 2013 de acordo com a classe.	14
Figura 12 - Quantidade de agrotóxicos comercializados de 2011 a 2013, por classe de agrotóxico para a cultura do trigo.	15
Figura 13 - Esquema de uma análise por MS após a separação cromatográfica ..	20
Figura 14 - Esquema de uma fonte de ionização por eletronebulização	23
Figura 15: Esquema de um analisador de massas tipo triploquadropolo.	24
Figura 16 - Etapas do procedimento analítico	27
Figura 17 – Fluxograma do procedimento de preparo de amostras utilizando método QuEChERS original.....	30
Figura 18 - Cavitação (a) e colapso (b) da bolha causado por ultrassom.	32
Figura 19 - Curva analítica com estimativa do erro residual do sinal analítico	38
Figura 20 - Esquema do efeito dos interentes na separação cromatográfica.....	42
Figura 21 - Curva relacionando coeficiente de variação e concentração do analito.	47
Figura 22 – Fluxograma dos fatores e níveis do planejamento fatorial do método estudado.....	66
Figura 23 – Fluxograma da avaliação dos parâmetros de validação.....	70
Figura 24 – Diagrama de Ishikawa contendo todas as fontes de incerteza do método	76

Figura 25 – Cromatograma obtido por LC-MS/MS da solução analítica de 250 µg L ⁻¹ (a) na matriz branco e (b) no solvente contendo os analitos estudados	82
Figura 26 – Cromatograma obtido por GC-MS/MS da solução analítica de 250 µg L ⁻¹ na matriz branco (a) e no solvente (b) contendo os analitos estudados	83
Figura 27 – Teste de significância para a recuperação media (%) de todos os compostos estudados (p=0,05).	86
Figura 28 – Gráficos de interações entre três fatores: solvente, agitação, partição e limpeza.	86
Figura 29 – Porcentagens de compostos recuperados nos procedimentos com melhor resposta.	89
Figura 30 - Representação do método utilizado para extração dos agrotóxicos nas amostras de trigo.	92
Figura 31 – Cromatograma obtido por LC-MS/MS (a) e por GC/MS/MS do branco da matriz (b)	93
Figura 32 - Percentual de agrotóxicos que apresentaram faixas de recuperação de 0 a 50%, entre 50 e 70%, entre 70 e 120% e >120%, após ensaios de recuperação.	102
Figura 33 – Limite de quantificação do método ± a estimativa da incerteza calculada para a faixa de 100 µg kg ⁻¹	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos agrotóxicos quanto ao grau de toxicidade.....	16
Tabela 2 – Valores principais para o teste de Horwitz	48
Tabela 3 – Valores aceitos para repetitividade em função da concentração.....	49
Tabela 4 – Valores aceitos de coeficiente de variação em função da concentração do analito.....	50
Tabela 5 - Divisores e distribuição de probabilidade.....	58
Tabela 6 - Gradiente da fase móvel utilizado para a eluição dos compostos.....	60
Tabela 7 – Agrotóxicos utilizados neste estudo.....	62
Tabela 8 - Variáveis reais e codificadas avaliadas através do planejamento fatorial 2^4 e os níveis de cada variável.....	67
Tabela 9 - Planejamento fatorial para as diferentes técnicas de extração.....	68
Tabela 10 - Compostos com seus respectivos tempos de retenção (t_R), íons precursores, íons produto e energia de colisão das transições monitoradas dos compostos analisados por LC-MS/MS.....	79
Tabela 11 - Compostos com seus respectivos tempos de retenção (t_R), faixas de retenção, íons precursores, íons produto e energia de colisão das transições monitoradas dos compostos analisados por GC-MS/MS.....	81
Tabela 12 - Planejamento fatorial completo, o plano experimental e os resultados experimentais.....	84
Tabela 13 – Principais efeitos e interações entre os fatores estudados.....	85
Tabela 14 – Princípios ativos na condição ótima e as recuperações entre 70 e 120% nos procedimentos com resultados satisfatórios.....	90
Tabela 15 – Resultados da análise da regressão dos analitos do padrão.....	95
Tabela 16 – Efeito matriz dos agrotóxicos estudados na matriz trigo determinados por LC-MS/MS.....	97
Tabela 17 – Efeito matriz dos agrotóxicos estudados na matriz trigo determinados por GC-MS/MS.....	98
Tabela 18 – Recuperação dos analitos nos níveis avaliados.....	99
Tabela 19 – Recuperação dos analitos utilizando extração QuEChERS	103
Tabela 20 – Resultados da avaliação da precisão do procedimento.....	104

Tabela 21 – Limites de detecção e quantificação dos instrumentos utilizados (em $\mu\text{g L}^{-1}$) e do método avaliado (em $\mu\text{g kg}^{-1}$).....	107
Tabela 22 – Estimativa da incerteza de medição do método avaliado para determinação multirresíduo de agrotóxicos em trigo por LC-MS/MS e GC-MS/MS ($\mu\text{g kg}^{-1}$).....	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AACC: Associação Americana de Químicos dos Cereais, do inglês, *American Association Of Cereal Chemists*
- ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas
- ACN: Acetonitrila
- ACET: Acetato de etila
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APCI: Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*
- API: Ionização a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*
- APPI: Fotoionização a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*
- C18: Octadecilsilano - sílica modificada com hidrocarboneto linear
- Cepa: Centro de Pesquisa em Alimentação
- CI: Ionização Química, do inglês *Chemical Ionization*
- Ciat: Centros de Informação e Assistência Toxicológica
- COPTEC: Cooperativa de Prestação de Serviços Técnicos
- CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento
- DDT: Diclorodifeniltricloroetano
- DL₅₀: Dose Letal para 50% dos organismos testes
- DQ: Departamento de Química
- EI: Ionização por Elétrons, do inglês *Electron Ionization*
- Emater: Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
- Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EMEA: *European Medicine Agency*
- EPA: Agência de proteção ambiental, do inglês *Environmental Protection Agency*
- ESI: Ionização por Eletronebulização, do inglês *Electrospray Ionization*
- ESI(+): Ionização por Eletronebulização no modo positivo, do inglês *Electrospray Ionization Positive Mode*
- 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*
- Fiocruz: Fundação Osvaldo Cruz

FUPF: Fundação Universidade de Passo Fundo.

GC: Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

GCB: carbono grafitizado, do inglês *Graphitized Carbon Black*

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*

HPLC: Cromatografia líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid
Chromatography*

HPLC-MS/MS: Cromatografia líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria
de massas em série, do inglês *High Performance Liquid
Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Ibama: Instituto Brasileiro do Meio ambiente e dos Recursos Renováveis

ICH: Conferência Internacional sobre Harmonização, do inglês *International
Conference on Harmonisation*

IDA: Ingestão Diária Aceitável

IEA: Instituto de Economia Agrícola

IEC: Comissão Eletrotécnica Internacional, do inglês *International Electrotechnical
Commission*

IDA: Ingestão Diária Aceitável

Inmetro: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

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

IUPAC: Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of
Pure and Applied Chemistry*

JECFA: Comitê Executivo Conjunto de Especialistas em Aditivos, do inglês *Joint
Expert Committee on Food Additives*

Larp: Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas

LMR: Limite Máximo de Resíduos

LC: Cromatografia líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em Série,
do inglês *Liquid Chromatography coupled to tandem Mass
Spectrometry*

LIT: Aprisionamento linear de íons, do inglês *Linear Ion Trap*

m/z: Razão massas carga

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MHLW: Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-Estar do Japão, do inglês *Ministry of Health, Labour and Welfare*

MS: Ministério da Saúde

MS: espectrometria de massas, do inglês *Mass Spectrometry*

MS/MS: espectrometria de massas em série, do inglês *Mass Spectrometry in tandem*

MMQO: Mínimos quadrados ordinários

NTEPIT: Normas Técnicas Específicas para a Produção Integrada de Trigo

ONU: Organização das Nações Unidas

OMS: Organização Mundial de Saúde

PARA: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PI: Padrão Interno

PNCRC: Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal

PS: Padrão de Substituição

PSA - Amina primária e secundária, do inglês *primary secondary amine*

PTFE: Politetrafluoretileno

QuEChERS: Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro, do inglês: *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe.*

R²: coeficiente de determinação

RS: Rio Grande do Sul.

RSD: Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation.*

SANCO: Saúde e Proteção do Consumidor, do francês *Santé et protection des consommateurs*

SIM: Monitoramento do Íon Selecionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*

Sindag: Sindicato Nacional da Indústria de Defensivos Agrícolas

Sinitox: Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas

SE-LTP: Extração com solvente e partição a baixa temperatura, do inglês *Solvent extraction with low temperature partitioning.*

SRM: Monitoramento seletivo de reações, do inglês *Selected Reaction Monitoring*

TPP: Trifenilfosfato

TQ: Triplo quadrupolo

t_R : tempo de retenção

UC: ultracongelamento

UHPLC-MS/MS: Cromatografia líquida de Ultra-alta Performance com Espectrometria de massas em série, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*

UPF: Universidade de Passo Fundo.

UPLC/MS-MS: Cromatografia líquida de Ultra Performance com Espectrometria de massas em série, do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*

UV: Ultravioleta

US: Ultrassom

v/v: Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Trigo	3
2.2 Definições e classificação dos agrotóxicos	4
2.2.1 Classes Químicas dos Agrotóxicos.....	6
2.2.2 Mercado dos agrotóxicos	13
2.2.3 Toxicidade dos agrotóxicos	15
2.2.4 Resíduos de agrotóxicos em trigo.....	18
2.3 A cromatografia na análise de resíduos de agrotóxicos	19
2.3.1 Fontes de Ionização utilizadas na cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas	20
2.3.2 Fontes de Ionização utilizadas na cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	21
2.3.3 Analisadores de massas	23
2.3.4 Aplicações das técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas na análise de agrotóxicos	24
2.4 Preparo de amostras para determinação de resíduos de agrotóxicos.....	26
2.4.1 Método QuEChERS	29
2.4.2 Ultrassom	32
2.5 Validação de Métodos Analíticos	34
2.5.1 Desenvolvimento de métodos e parâmetros de validação	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1 Instrumentação.....	59
3.2 Condições utilizadas nos sistemas cromatográficos.....	60
3.2.1 Condições utilizadas no sistema LC-MS/MS	60
3.2.2 Condições utilizadas no sistema GC-MS/MS.....	61
3.3 Materiais utilizados.....	61
3.4 Solventes, reagentes e gases.....	62
3.5 Agrotóxicos selecionados	62
3.6 Seleção do padrão interno e do padrão de controle.....	63
3.7 Preparo das soluções analíticas	64
3.8 Amostra de trigo.....	65
3.9 Estudo de diferentes procedimentos de extração	66
3.10 Validação do método para análise de agrotóxicos em grãos de trigo.....	69

3.10.1 Seletividade	71
3.10.2 Curva analítica e faixa linear	71
3.10.3 Efeito matriz.....	72
3.10.4 Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão	72
3.10.5 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)	74
3.10.6 Limite de detecção e limite de quantificação	74
3.10.7 Estimativa da Incerteza da medição	75
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.1 Condições cromatográficas empregadas para análise de resíduos de agrotóxicos em trigo por GC-MS/MS e LC-MS/MS.....	79
4.2 Avaliação dos procedimentos estudados através do planejamento fatorial	83
4.3 Validação do procedimento proposto.....	92
4.3.1 Seletividade	92
4.3.2 Curva analítica – Normalidade da distribuição dos valores, homocedasticidade, faixa linear e independência dos resíduos.	93
4.3.3 Efeito matriz.....	97
4.3.4 Exatidão (recuperação)	99
4.3.5 Precisão.....	103
4.3.6 Limite de detecção e limite de quantificação	107
4.3.7 Estimativa da incerteza das medições.....	109
5 CONCLUSÕES	112
6 REFERÊNCIAS.....	115
APÊNDICE A	129
APÊNDICE B	139
ANEXO 1.....	142
ANEXO 2.....	144

1 INTRODUÇÃO

A crescente necessidade de produção de alimentos, a fim de atender a expansão do consumo, baseia-se em técnicas intensivas de cultivo e na utilização de quantidades cada vez maiores de herbicidas, fungicidas e inseticidas nas lavouras. A ausência destes mecanismos de controle de pragas nas lavouras, segundo Silva & Costa (2012), mostram perdas na produtividade entre 30 e 40% nas plantações, sendo que o armazenamento, dentre outros fatores, contribui com estes números.

Uma consequência do aumento no uso de agrotóxicos é a possibilidade de que estes princípios ativos permaneçam nos alimentos causando prejuízos à população que os consome. O trigo é a principal cultura no período de outono-inverno-primavera no Rio Grande do Sul (JUNGESI, 2012), sendo que seus grãos são utilizados para produção de diferentes alimentos.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), através do documento Normas Técnicas Específicas para a Produção Integrada de Trigo – NTEPIT (EMBRAPA, 2013), estabelece que quando for necessário utilizar o controle químico na produção de trigo, devem ser utilizados agrotóxicos registrados para a cultura no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Entre os compostos utilizados devem ser priorizados os seletivos e com menor toxicidade para humanos, animais e recursos naturais, sendo que os fungicidas, os inseticidas e os herbicidas só poderão ser utilizados mediante receituário agrônomo. Entretanto se observa, pelos resultados dos monitoramentos realizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, (Anvisa), através do programa Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) e pelo MAPA, através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), um grande número de amostras classificadas como insatisfatórias, com a confirmação da presença de agrotóxicos acima do limite máximo de resíduos (LMR), amostras com agrotóxicos não autorizados para a cultura e resíduos acima do LMR e não autorizados na mesma amostra (BARIZON *et al.*, 2013).

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos requer a utilização de métodos analíticos confiáveis, de forma a garantir a identificação e a quantificação destes resíduos. Neste contexto, o desenvolvimento de métodos

analíticos tem sido fundamental. Segundo Vekey (2011), a cromatografia combinada com diferentes técnicas de detecção é um dos melhores e mais utilizados métodos analíticos, tendo em vista que combina as vantagens de alta seletividade e eficiência na separação cromatográfica, potencializada quando utilizada junto com a espectrometria de massas em série (MS/MS), sendo as técnicas analíticas mais importantes na determinação de resíduos de agrotóxicos.

O preparo das amostras, paralelamente aos métodos instrumentais, tem sido objeto de constantes estudos, com consequente grande desenvolvimento. Entretanto, estes estudos são complexos devido a ampla variedade de matrizes que possuem diferentes composições. A presença de interferentes que são extraídos junto aos analitos de interesse, tornam a detecção, identificação e quantificação de resíduos de agrotóxicos mais difícil, especialmente em matrizes de alimentos com menor teor de umidade, como arroz, trigo e milho (PAREJA *et al.*, 2011). Buscando atender aos organismos regulamentadores, que estabelecem os níveis de resíduos permitidos em alimentos, muitos métodos e técnicas tem sido utilizados no aperfeiçoamento do preparo de amostras para determinação de agrotóxicos.

Considerando a permanente e necessária expansão do desenvolvimento dos métodos de preparo de amostras para determinação de agrotóxicos em alimentos, este trabalho teve como objetivo: (i) utilizar o planejamento fatorial como ferramenta para estabelecer o melhor método de extração para os agrotóxicos estudados em amostras de trigo; (ii) validar, utilizando ferramentas estatísticas, o método que se mostrasse mais eficiente para o maior número de agrotóxicos estudados; (iii) avaliar a partir dos dados da validação a possibilidade de utilização do método desenvolvido utilizando cromatografia gasosa e líquida acoplada à espectrometria de massas em série (GC-MS/MS e LC-MS/MS) para determinação de setenta e oito agrotóxicos em trigo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Trigo

O trigo faz parte do seleto grupo de *commodities* agrícolas que domina tanto a produção quanto o comércio mundial de grãos. O Brasil, nesse contexto, tem suas peculiaridades, uma vez que faz parte tanto do clube de países importadores quanto exportadores de trigo. Há registros do cultivo de trigo no País desde os primórdios do descobrimento. Embora uma triticultura tecnologicamente embasada, no sem controvérsias, tenha sido efetivamente consolidada a partir da segunda metade do século 20 (PIRES, 2011).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, (IBGE), as estimativas de safras indicaram que a produção nacional de trigo oscilou entre 4 e 6 milhões de toneladas anuais, de 2008 a 2012. Nesses anos em média, a produção gaúcha foi de 1.520.000 t, equivalente a 37% da produção nacional. O rendimento de grãos tem oscilado entre 2.080 kg ha⁻¹ (2009) e 2.828 kg ha⁻¹ (2010) (IBGE, 2014). As variações de área e rendimento observadas na cultura do trigo, segundo Canziani & Guimarães (2009) são em função de variações das políticas de exportação e das condições meteorológicas.

Tendo por base a área cultivada, o trigo é a principal cultura produtora de grãos estabelecida no período de outono-inverno-primavera, sendo que a produção gaúcha concentra-se na metade norte do Estado. A área cultivada de trigo na soma das cinco regionais da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER), Caxias do Sul, Erechim, Passo Fundo, Ijuí e Santa Rosa, foi equivalente a 86% da área cultivada no Estado no período de 2000 a 2008, na média dos anos. Em todos os anos, a maior área cultivada de trigo ocorreu na regional Ijuí (entre 27 e 33% da área cultivada no Estado), seguida por Santa Rosa (entre 20 e 24%) e Passo Fundo (entre 19 e 23%) (Jungesi, 2012). Segundo EMATER, (2013) a produção total no estado em 2012 foi de 1.883.898 toneladas de trigo. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) a área plantada foi de 976,2 mil ha, o que representa 51,5% da área total plantada no Brasil (CONAB, 2013). A pauta exportadora gaúcha de 2008 a 2011 foi baseada no agronegócio, uma tendência já observada anteriormente. Considerando-se o valor

exportado, o trigo está entre os sete principais produtos transacionados no exterior (TERUCHKIN, 2012).

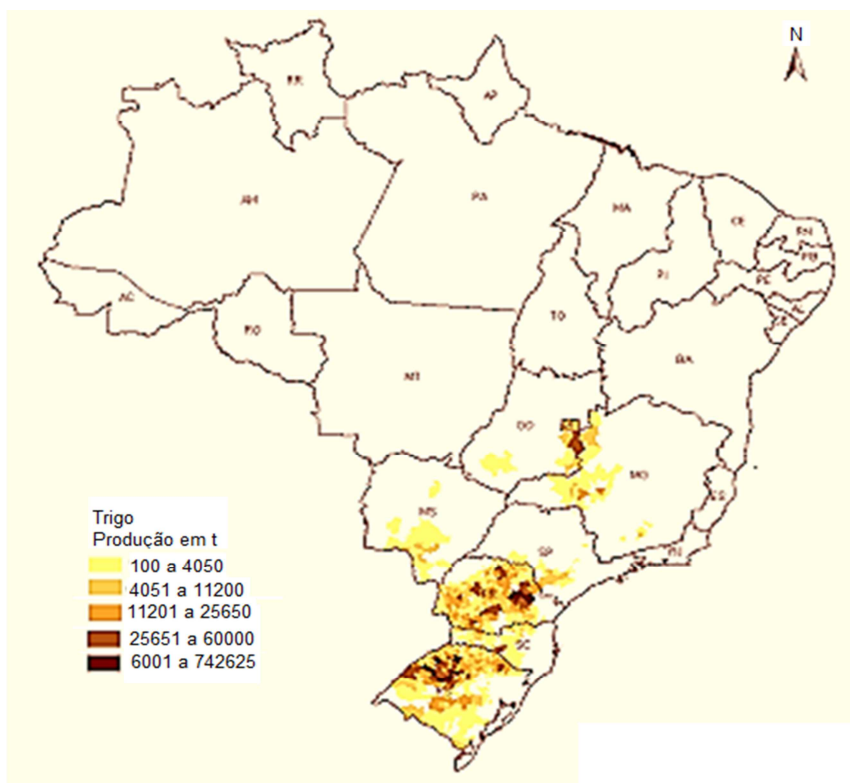


Figura 1 - Mapa da produção de trigo no Brasil
Fonte: Conab, 2013

2.2 Definições e classificação dos agrotóxicos

Agrotóxicos, defensivos agrícolas, praguicidas, pesticidas e biocidas são denominações dadas a substâncias químicas que são utilizadas para prevenir, destruir ou controlar alguma peste, incluindo vetores de doenças humanas ou de animais; espécies não desejadas de plantas ou animais que causam danos ou interferem com a produção, estocagem, transporte ou comercialização de alimentos. Estão incluídos também neste conceito os reguladores de crescimento de plantas, desfolhantes, dessecantes ou agentes para prevenção da queda prematura dos frutos ou ainda, substâncias utilizadas antes e após a colheita, para prevenir a deterioração durante a estocagem ou transporte (WHO, 2009a).

No Brasil, a Lei Federal nº 7.802 de 11/07/89, define toda atividade relacionada aos agrotóxicos e estabelece sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a

comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final das embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização. Esta lei define o termo agrotóxico da seguinte forma:

"Os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; e substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento" (BRASIL, 1989).

O capítulo II do Decreto lei 4074 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei Federal nº 7.802 de 11/07/89 estabelece os órgãos oficiais e suas competências. O MAPA tem a competência de avaliar a eficácia agrônômica dos agrotóxicos (produtos formulados) ao Ministério da Saúde (MS) cabe executar a avaliação e classificação toxicológica, ao Ministério do Meio Ambiente, por meio do Instituto Brasileiro do Meio ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) avaliar e classificar o potencial de periculosidade ambiental (BRASIL, 2002).

Segundo Melo *et al.* (2002), o termo agrotóxico é muito amplo, aplicando-se a substâncias químicas que apresentam ação fisiológica sobre organismos vivos e normalmente são utilizados para impedir a ação ou destruir, direta ou indiretamente, formas de vida animal ou vegetal prejudiciais, como ervas daninhas, roedores, fungos, ácaros e insetos.

Os agrotóxicos podem ser classificados segundo a sua função (praga que controlam), segunda a estrutura química de suas substâncias ativas (grupo químico) e segundo os efeitos à saúde humana e ao ambiente (YAMASHITA, 2008).

De acordo com sua função os agrotóxicos podem ser classificados em:

- a) inseticidas: controlam insetos;
- b) fungicidas: destroem ou inibem fungos;
- c) herbicidas: combatem plantas invasoras;
- d) desfolhantes: eliminam folhas indesejadas;
- e) fumigantes: combatem bactérias do solo;
- f) raticidas: combatem ratos e outros roedores;
- g) moluscocidas: combatem moluscos;
- h) nematicidas: combatem nematóides;

i) acaricidas: utilizados no combate de ácaros.

Cada um desses grupos citados ainda pode ser subdividido quanto ao grupo químico ao qual pertencem.

2.2.1 Classes Químicas dos Agrotóxicos

2.2.1.1 Fungicidas

A palavra fungicida é originada de duas palavras latinas "caedo" que significa matar e "fungus", fungo. Apesar da especificidade, a definição, com o tempo, se tornou mais abrangente. Desse modo podemos definir a palavra fungicida, atualmente, como compostos químicos empregados no controle de doenças de plantas, causadas por fungos, bactérias e algas. O uso de produtos biocidas iniciou em 1000 a.c. quando da utilização do enxofre utilizado para o controle do que denominavam pragas (SANTOS, 2014).

Os fungicidas são importantes ferramentas para o controle das principais doenças das plantas em sistemas intensivos de produção de culturas sendo que sua função principal de assegurar a produção rentável de culturas de alimentos (FRAC, 2014).

2.2.1.1.1 Principais classes de fungicidas

a) Azóis ou triazóis

Os avanços na triticultura brasileira, nos últimos 20 a 30 anos, estão associados ao uso de triazóis, atuando no incremento nos níveis de rendimento da cultura do trigo. A partir do ano 2000 a utilização de mistura de princípios ativos passou a fazer parte da atividade agropecuária a fim de potencializar a eficiência desse tipo de produto comercial disponibilizado no mercado. Em muitos casos os triazóis eram misturados com estrobilurinas, a fim de se obter maior estabilidade sob ação do sol e a ocorrência do chamado "movimento de vapor", onde a fase gasosa do fungicida que permite a sua redistribuição nas plantas. Estas misturas garantem uma eficiência que, normalmente, é superior à de fungicida do grupo dos triazóis usado isoladamente (SOUZA, 2009).

Os triazóis foram descobertos na década de 60 e sua ação fungicida que inibe os processos bioquímicos atuando em um ou em um número limitado de

sítios ativos. Alguns compostos desta classe apresentam ação cancerígena para os seres humanos (MACIEL & CHAVES, 2013).

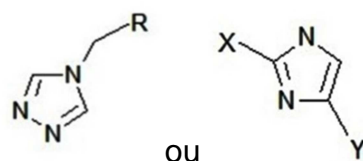


Figura 2 - Estrutura química dos triazóis

Fonte: PAN, 2013

b) Ditiocarbamatos

Tipicamente fungicidas com uma estrutura de carbamato possuem enxofres substituindo ambos os oxigênios do grupo funcional amida. Os fungicidas destes grupos estão entre os mais usados na agricultura brasileira, nas mais diversas culturas. São derivados do ácido carbâmico e podem ser divididos em dois grupos os DTC (ditiocarbamatos), representados pelo fenvam, metam, tiram e ziram e os EBDC (etilicoenobisditiocarbato), representados pelo maneb, mancozeb, metiram e zineb. Os EBDC apresentam riscos associados aos seus produtos de degradação e metabólitos, a etílicoenotiouréia (ETU) e a propilenotiureia, respectivamente e podem formar quelatos poliméricos, sendo insolúveis tanto em água como em solventes orgânicos (SOUZA, 2009).

O tiram introduzido na década de trinta é utilizado até hoje, sendo um dos principais fungicidas deste grupo.

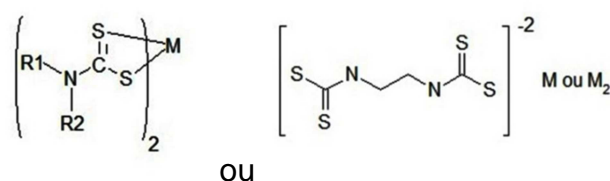


Figura 3 - Estrutura química dos ditiocarbamatos

Fonte: PAN, 2013

2.2.1.2 Inseticidas

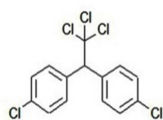
No ano de 1932 foi desenvolvido o primeiro inseticida por síntese orgânica, chamado Lethane 384. Com o desenvolvimento da indústria, a partir da segunda

guerra mundial, se difundiu o uso de biocidas sintéticos. Na década de 60 surgiram os inseticidas chamados de terceira geração, produtos com menor toxicidade ambiental e para saúde humana, do qual fazem parte os piretróides (ALVES FILHO, 2002).

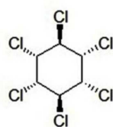
2.2.1.2.1 Os inseticidas pertencem a cinco grupos químicos principais:

a) Organoclorados

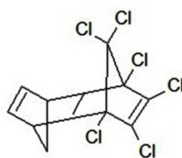
Os compostos organoclorados são lipofílicos e altamente resistentes aos mecanismos de decomposição dos sistemas biológicos, sendo os agrotóxicos mais persistentes já fabricados. São compostos com estruturas cíclicas onde um ou mais átomos de hidrogênio são substituídos por cloro. Foram amplamente utilizados na agricultura e em programas de controle a malária e outras doenças provenientes de insetos fazendo com que muitos seres vivos estejam contaminados com estes compostos, sendo que em humanos a principal rota de contaminação é através da alimentação. Apresentam alta capacidade de se bioconcentrar, agem sobre o sistema nervoso, alterando a entrada e saída de íons da membrana dos neurônios, prejudicando a transmissão de impulsos nervosos. Os organoclorados pertencem a três classes distintas de químicos, incluindo: Diclorodifeniletano; ciclodieno clorado; e estruturas relacionadas ao benzeno clorado e ciclohexano clorado. Dentre os principais inseticidas organoclorados pode-se citar: hexaclorocicloexano e isômeros; DDT e análogos; ciclodienos (aldrin, dieldrin, endrin, heptacloro, clordano e endosulfan); dodecacloro e clordecone; e outros compostos como toxafeno (SILVA, 2009; FUNASA, 2001).



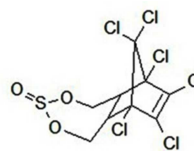
DDT



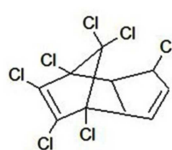
Lindane



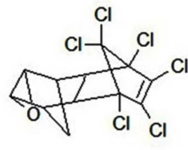
Aldrin



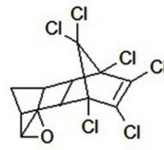
Endosulfan



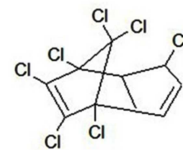
Clordane



Dieldrin



Endrin



Heptacloro

Figura 4 – Estrutura química dos organoclorados

Fonte: PAN, 2013

b) Cloro-fosforados

São compostos que em sua estrutura tem dois princípios ativos básicos, um organoclorado e um fosforado. Possuem dois tipos de mecanismos de ação: ação de choque, decorrente do radical organofosforado e uma residual lenta oriunda do componente clorado. Possuem toxidez aguda atuando na enzima colinesterase, a qual é fundamental ao sistema nervoso central e nas transmissões de impulsos nervosos, podendo provocar a morte imediata em humanos. Exemplos de alguns agentes deste grupo são os bromofós, carbofenotion, clorpirifós, e triclorfon (SILVA, 2009).

c) Organofosforados

Foram introduzidos como biocidas na década de 70, sendo utilizados como substitutos dos compostos organoclorados, apesar de possuírem alta toxicidade. São compostos formados por ésteres fosfóricos, com um átomo de fósforo pentavalente, derivado do ácido fosfórico, do ácido tiofosfórico ou do ácido ditiofosfórico. Apresentam toxicidade maior que os carbamatos e aos agrotóxicos clorados em relação à toxicidade aguda, entretanto degradam rapidamente e não se acumulam nos tecidos gordurosos. Fazem parte deste grupo metamidofós, malationa, fosmete, paration etílico, paration metílico, monocrotofós, rodival, acefato, forato, entre outros (ANVISA, 2013; SILVA, 2009).

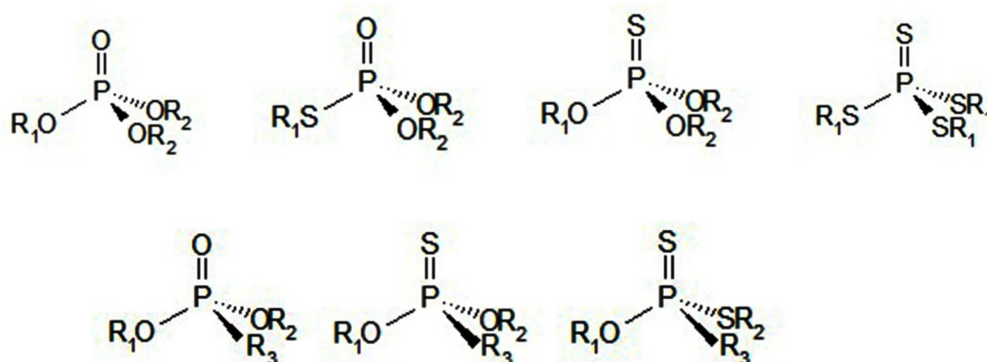


Figura 5 - Estrutura químicas geralmente associadas aos organofosforado.

Fonte: PAN, 2013

d) Piretróides

A síntese dos piretróides, a partir da molécula natural aletrina, possibilitou o surgimento de inseticidas com características de eficácia, estabilidade química e segurança, o que os distingue dos demais grupos de inseticidas. É um inseticida bastante empregado devido a sua alta eficiência utilizando pequenas quantidades de produto com menor contaminação do ambiente (FUNASA, 2001). Os piretróides apresentam baixa e média toxicidade em humanos e em animais domésticos, são pouco tóxicos via inalação, podendo ter algum risco se ingerido. São rapidamente metabolizados e excretados pela urina, podem causar alergias em contato com a pele (COSTA & ROHLFS, 2013).

A utilização de piretróides na agricultura foi muito difundida em função de suas características de segurança, baixa toxicidade em mamíferos, baixo impacto ambiental e sua eficiência, entretanto a presença destes compostos nos alimentos pode ser um risco à população devido aos efeitos adversos que podem causar em longo prazo (SANTOS, 2007).

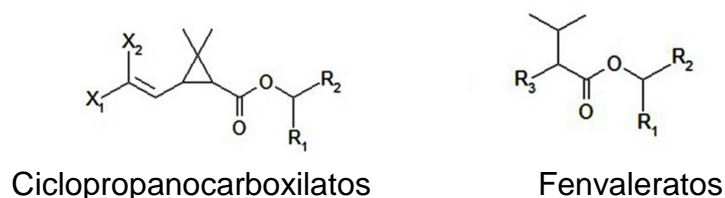


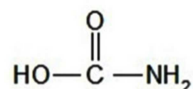
Figura 6 - Estruturas químicas dos piretróides.

Fonte: PAN, 2013

e) Carbamatos

São compostos derivados do ácido carbâmico e possuem ação inseticida semelhante à dos fosforados e são frequentemente empregados no controle de insetos resistentes aos organofosforados, possuem efeito residual moderado e não se acumulam no ambiente. Estes compostos se decompõem através de um processo de hidrólise lento a pH neutro a levemente ácido, entretanto acima de pH

7 a hidrólise é rápida. Nos seres humanos são altamente cancerígenos e por esta razão são proibidos em diversos países. Exemplos de carbamatos: Carbofurano, carbosulfano, mexocarbato e aldicarbe (FUNASA, 2001).



Carbamatos: ROOCN $\begin{array}{l} \text{--- CH}_3 \\ \text{--- R}' \end{array}$ R = grupo aril (fenil, naftil ou heterocíclico)
R' = H (nos metil carbamatos) ou metil (nos dimetilcarbamatos)

Figura 7 - Estruturas químicas dos carbamatos.

Fonte: PAN, 2013

2.2.1.3 Herbicidas

A obtenção de altos rendimentos na exploração agrícola está diretamente ligada a utilização de herbicidas no controle de plantas infestantes (SOUZA *et al.*, 2012).

Os herbicidas são classificados de acordo com seu mecanismo de ação nas plantas e sua estrutura química básica. Herbicidas com o mesmo mecanismo de ação tem alta probabilidade de apresentar suscetibilidade às plantas (Oliveira Jr, 2011).

2.2.1.3.1 As principais classes de herbicidas utilizadas

a) Imidazolinona

Herbicidas que contém na sua molécula uma estrutura comum a todos as substâncias desta classe, o imidazol. De acordo com a presença de uma segunda estrutura de anel, podem ser divididos em três grupos: os que contém um grupo quinolina, os que possuem um anel benzênico e os que possuem um anel piridina. A imidazolinona piridina é classificada segundo o radical (R) em imazapir: R = H; imazapic: R = CH₃; imazetapir: R = CH₃—CH₂; e imazamox: R = CH₃—O—CH₂. São exemplos de compostos herbicidas deste grupo: imazapir, imazapic,

imazetapir, imazamox, imazametabenz e imazaquin. É uma classe relativamente nova de compostos herbicidas, com baixa toxicidade aguda para animais. A Figura 8 apresenta as estruturas químicas dos compostos: a) imidazolinona piridina, b) imidazolinona benzeno (imazamethabenz) e c) imidazolinona quinolina (imazaquin).

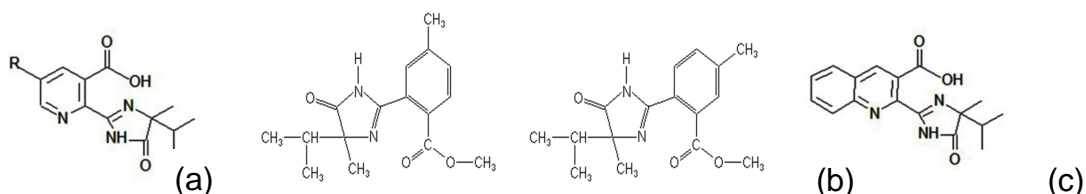


Figura 8 - Estruturas químicas dos herbicidas do grupo das imidazolinonas
Fonte: Kraemer *et al.*, 2009

b) Triazinas

Foram registrados em 1955 e são utilizados como herbicida pela sua capacidade de controlar ervas daninhas através da inibição da fotossíntese. São compostos derivados nitrogenados heterocíclicos contendo um anel de triazina. Frequentemente encontrados em águas subterrâneas, juntamente com seus produtos de transformação.

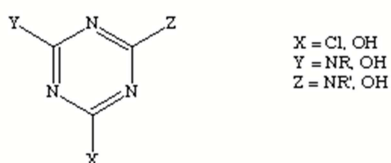


Figura 9 - Estrutura químicas dos triazinas
Fonte: PAN, 2013

g) Ureia

Compostos herbicidas com um grupo funcional ureia. Frequentemente encontrados como contaminantes da água subterrânea. Diurom e linurom são exemplos. Alguns destes compostos são cancerígenos.

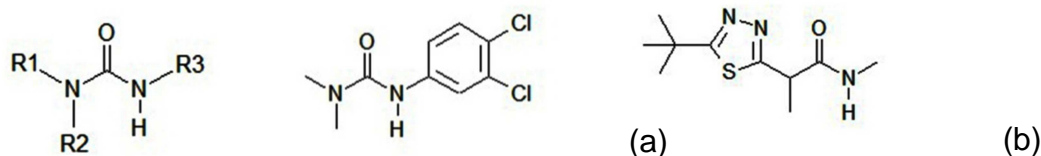


Figura 10 - Estrutura química das ureias. (a) estrutura química do diurom (b) estrutura química do tebutiron

Fonte: PAN, 2013

2.2.2 Mercado dos agrotóxicos

A evolução da agricultura é caracterizada por constantes desafios: expansão de terras, aumento na produtividade e atendimento à crescente demanda de consumo. Estudos mostram perdas entre 30 a 40% em plantações em razão de pestes na ausência de mecanismos de controle, sendo que algumas variáveis que contribuem para isso são métodos de armazenagem, mudanças genéticas em plantas, que se tornam mais sensíveis a algumas pragas, redução no processo de rotação de culturas, desequilíbrios ecológicos entre outros (SILVA & COSTA, 2012).

A utilização de agrotóxicos é desde épocas remotas (2500 a.c.) para o controle de pragas. Existem relatos do emprego de produtos químicos para controle de algumas pestes principalmente insetos (MELO *et al.*, 2002).

Segundo Embrapa (2013), anualmente são usados no mundo aproximadamente 2,5 milhões de toneladas de agrotóxicos. O consumo anual de agrotóxicos no Brasil tem sido superior a 300 mil toneladas de produtos comerciais. Expresso em quantidade de ingrediente-ativo são consumidas anualmente cerca de 130 mil toneladas no país representando um aumento no consumo de agrotóxicos de 700% nos últimos quarenta anos, enquanto a área agrícola aumentou 78% nesse período.

O uso de agrotóxicos no Brasil começou a se intensificar a partir da década de 1960, devido em grande parte ao PND (Plano Nacional de Desenvolvimento), que obrigava todo agricultor que buscasse financiamento a comprar, com o crédito rural, determinada cota de agrotóxico. Isso, aliado à propaganda e ao discurso da indústria química, fez do Brasil um dos maiores consumidores mundiais de agrotóxicos (YAMASHITA, 2008).

De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal, (Sindiveg), o Brasil é o maior mercado consumidor de agrotóxicos no mundo, sendo que essa posição é resultado da possibilidade que o País tem de produzir mais de uma safra por ano. No ano de 2013 foram consumidos 902,4 milhões de toneladas de agrotóxicos (SINDIGEV, 2014).

Os inseticidas foram a classe de agrotóxicos que teve o maior aumento nas vendas no Brasil, em 2013 aumentou 20,3% em relação a 2012, correspondendo a 26% das vendas. Cresceram, também, as vendas de fungicidas em 5,4% e os herbicidas em 16% no mesmo período. Em termos de produto comercializado, no Brasil, os inseticidas foram responsáveis por 37% da quantidade total, totalizando 235.133 t de produto, como mostra a Figura 11.

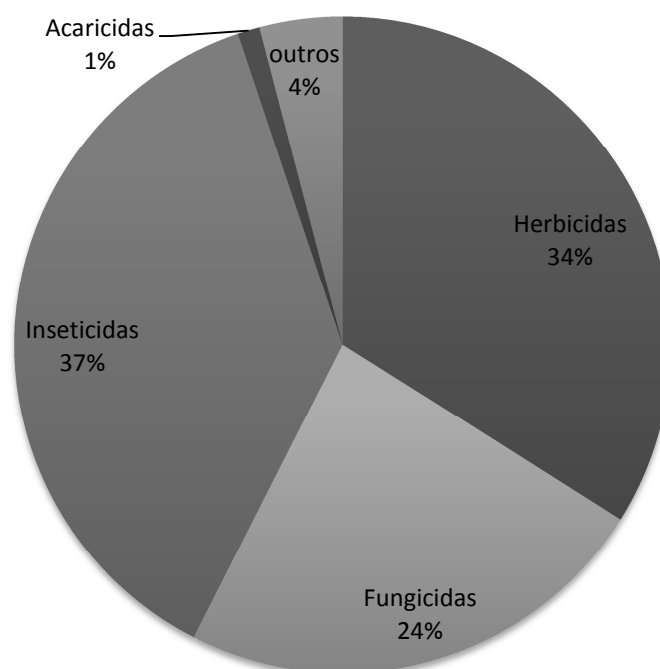


Figura 11 - Porcentagem de agrotóxicos vendidos em 2013, de acordo com a classe.

Fonte: Sindiveg 2014.

O Rio Grande do Sul, em termos de valores de vendas, representa 10,7% do total comercializado no Brasil. Os herbicidas representam o maior valor em vendas (34%) e o principal agrotóxico comercializado (54%), mas o maior crescimento em vendas foram os inseticidas, com 23% de aumento.

A Figura 12 apresenta a quantidade de agrotóxicos comercializados no período de 2011 a 2013, por classe de agrotóxico, para a cultura do trigo.

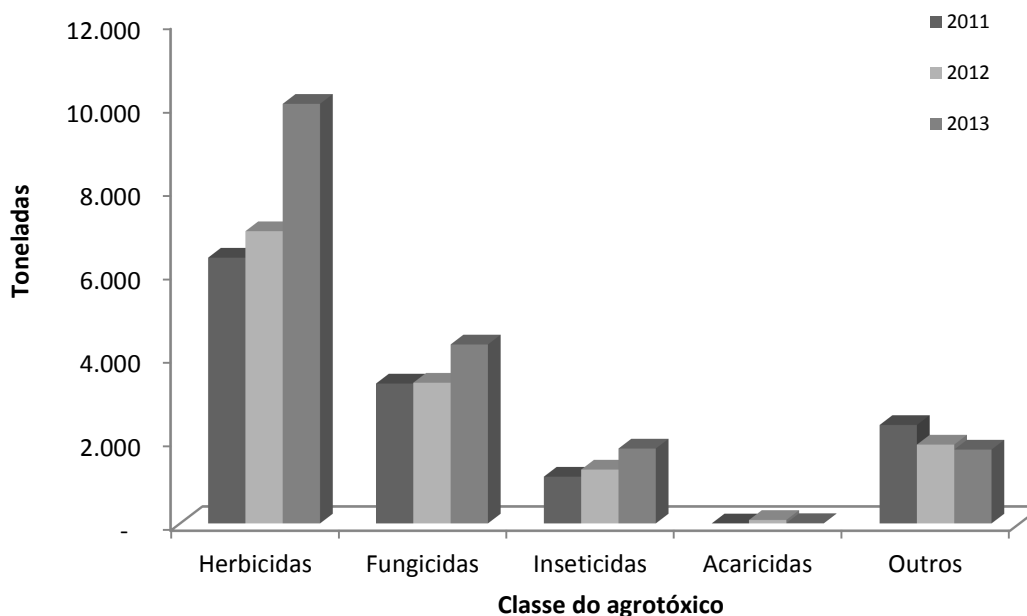


Figura 12 - Quantidade de agrotóxicos comercializados de 2011 a 2013, por classe de agrotóxico para a cultura do trigo.

Fonte: Sindiveg, 2014

2.2.3 Toxicidade dos agrotóxicos

As intoxicações agudas por agrotóxicos são da ordem de três milhões de indivíduos anuais, com 2,1 milhões de casos só nos países em desenvolvimento, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo que para cada caso notificado cinquenta ficam sem notificação. As intoxicações subcrônicas, são causadas por exposição moderada ou pequena a produtos de alta toxicidade e intoxicações crônicas, que requerem meses ou anos de exposição, em longo prazo revelam danos irreversíveis ainda não possuem estatísticas reais (OLIVEIRA 2011).

Um grande número de novas substâncias químicas tem sido desenvolvido para utilização como agrotóxicos em substituição a moléculas de uso corrente na agricultura e pecuária. A proposta destes novos agrotóxicos é apresentar menor toxicidade a organismos não alvo, menor persistência no ambiente e significativa redução da presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Pode-se citar o caso dos inseticidas organofosforados e carbamatos que, em função da legislação moderna têm apresentado significativa redução na utilização em medicina veterinária. Em substituição a estes compostos, inseticidas menos tóxicos, tais

como piretrinas e piretróides, os neonicotinóides e os reguladores de crescimento de insetos têm sido desenvolvidos (KRIEGER, 2010).

A classificação dos agrotóxicos quanto ao grau de toxicidade está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação dos agrotóxicos quanto ao grau de toxicidade

Classe		LD ₅₀ para ratos (mg kg ⁻¹ de massas corporal)	
		Via Oral	Via Dérmica
Ia	Extremamente tóxico	< 5	< 50
Ib	Altamente tóxico	5 – 50	50 - 200
II	Moderadamente tóxico	50 – 200	200 - 2000
III	Levemente tóxico	> 2000	> 2000
U	Pouco provável que presente toxicidade aguda	5000 ou superior	

Fonte: WHO 2009b

As informações toxico-farmacológicas em âmbito nacional são de responsabilidade do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox), vinculado a Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz). O Sinitox foi constituído pelo Ministério da Saúde, em 1980, a fim de criar um sistema abrangente de informação e documentação em toxicologia e farmacologia de alcance nacional. O Sinitox divulga anualmente dados de notificações de intoxicações em humanos e animais, disponibilizados pelos 37 Centros de Informação e Assistência Toxicológica (CIAT) existentes no país. Em 2011, segundo esta fonte, foram registrados 5075 casos de intoxicação por agrotóxico de uso agrícola, sendo que 129 vieram a óbito.

Os riscos do envenenamento agudo são bem conhecidos, entretanto os efeitos da exposição em longo prazo destes princípios ativos são bem menos, pois é difícil estabelecer os possíveis efeitos em função de que as consequências aparecem após anos de exposição de baixa intensidade repetidos ao longo de muitos anos (MULTIGNER, 2005).

Nougadère (2011) cita em seu trabalho que há três dificuldades principais na avaliação da exposição alimentar crônica de resíduos de agrotóxicos: a diversidade de hábitos de consumo, a multiplicidade de substâncias ativas e sua onipresença em alimentos, ou seja, um agrotóxico pode ser encontrado em diferentes alimentos além da água.

Segundo Spadotto & Gomes (2013) os processos bioquímicos são comuns a todos os seres vivos, assim os agrotóxicos que são moléculas sintetizadas para afetar determinadas reações bioquímicas de insetos, microrganismos, animais e plantas que se quer controlar ou eliminar, podem atingir não só o organismo alvo, como também outros seres do ambiente. Tendo em vista que as comunidades têm interações recíprocas de dependência ou cooperação, os efeitos de resíduos de agrotóxicos nem sempre são isolados, e a ação sobre uma determinada população pode afetar todo o funcionamento de um ecossistema.

O conhecimento das características físicas, químicas, biológicas e dos grupos funcionais presente nos agrotóxicos é importante para o conhecimento dos mecanismos de contaminação, reatividade, toxicidade, mobilidade, sendo estas informações importantes para tomadas de decisões no caso de contaminações (JARDIN, 2009). Os processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos determinam o comportamento de um agrotóxico após sua aplicação no ambiente sendo governado por processos de retenção (sorção), de transformação (degradação biológica e decomposição química) e de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial), e por interações desses processos (SPADOTTO & GOMES, 2013).

De uma maneira geral a avaliação do risco crônico da ingestão de agrotóxicos é realizada durante o seu registro, o que pode influenciar na determinação do limite máximo de resíduos permitido. A avaliação da dose diária de um produto químico que, administrada por toda vida, aparenta não causar risco apreciável com base em toda a informação conhecida até este momento é definido no estudo da Ingestão Diária Aceitável (IDA). Os limites estabelecidos na IDA são definidos de modo que a ingestão de um produto químico não cause risco apreciável e que não se produza lesões mesmo após uma exposição por toda a vida. A ingestão diária aceitável se expressa em miligramas de produto químico, por quilograma de peso corporal (mg/kg/dia). O cálculo da IDA considera a Ingestão Diária Teórica Máxima (IDTM) que é o somatório do limite máximo de resíduos (LMR), em mg kg^{-1} , multiplicado pelo consumo do alimento, em kg por dia (CALDAS & SOUZA, 2000).

2.2.4 Resíduos de agrotóxicos em trigo

O documento Normas Técnicas Específicas para a Produção Integrada de Trigo – NTEPIT publicado pela Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Trigo em 2013 estabelece que quando for necessário utilizar o controle químico na produção de trigo, devem ser utilizados agrotóxicos registrados para trigo no MAPA, sendo que devem ser priorizados os seletivos e com menor toxicidade para humanos, animais e recursos naturais, sendo que fungicidas, os inseticidas e os herbicidas só poderão ser utilizados mediante receituário agrônomo (EMBRAPA, 2013).

A FAO define o termo resíduo como sendo 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, 2010).

Já o termo contaminante é definido como qualquer substância que não seja intencionalmente adicionada aos alimentos. Os contaminantes podem estar presentes nos alimentos como resultado das etapas de produção, transformação, acondicionamento, embalagem, transporte e armazenagem do alimento (CODEX ALIMENTARIUS, 2010).

As deficiências nas boas práticas para a utilização de agrotóxicos e medicamentos de uso veterinário resultam no aparecimento de resíduos que, em níveis acima dos valores de LMR, podem representar risco à saúde humana. Estes riscos estão estreitamente relacionados com o desrespeito às instruções de uso do fabricante contidas na bula dos agrotóxicos e dos medicamentos veterinários, tais como: indicação de uso para a espécie alvo, dosagem, via de administração e período de carência (PRESTES, 2011).

O LMR é a quantidade legalmente permitida, ou reconhecida, como aceitável no alimento e é estabelecido para cada composto aprovado para uso em um determinado alimento. O LMR sempre está correlacionado à Ingestão Diária Aceitável (IDA).

O Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), órgão da FAO, e o FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) dos EUA, que são as organizações internacionais envolvidas com a saúde pública, estabelecem as diretrizes para os LMR (DENOBI, 2004). No Brasil a competência para estabelecer estes limites, seja de medicamentos veterinários ou de agrotóxicos, é do Ministério da Saúde

através da Anvisa ou MAPA. A Instrução Normativa nº 18, de 25 de junho de 2013 estabelece os limites máximos de agrotóxicos para a cultura do trigo para o ano safra 2013/2014. Os resultados do PNCRC-vegetal do ano-safra 2012-2013 foram publicados através da portaria SDA nº 115 de 30 de agosto de 2013 onde foi constatado para a cultura do trigo que 25% das amostras analisadas estavam em desconformidade com a legislação. Foram encontrados os agrotóxicos triclorfom, diclorvós e cipermetrina, que não são permitidos para a cultura e carbendazin, benomil, tiofanato metílico e fipronil acima do limite máximo tolerado.

2.3 A cromatografia na análise de resíduos de agrotóxicos

A cromatografia a gás foi uma das primeiras técnicas a serem empregadas na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos, devido à alta especificidade e variedade de detectores utilizados na técnica. Entretanto o desenvolvimento de agrotóxicos com maior polaridade, menor persistência e toxicidade alavancou o desenvolvimento das técnicas cromatográficas a fim de acompanhar as necessidades analíticas para determinações rápidas, seletivas e sensíveis em matrizes de diferentes complexidades (JARDIM *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de novos recheios para as colunas cromatográficas impulsionou o crescimento e a evolução da cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*), propiciando a execução de análises mais rápidas sem comprometer o desempenho da separação cromatográfica. A utilização de partículas com diâmetro menor que 2 µm e altas pressões, 100 MPa, estabeleceu o avanço da Cromatografia líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) para a técnica de UHPLC (do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography*). Esta técnica tem permitido realizar análises cromatográficas com elevada eficiência, resolução, detectabilidade em um menor tempo, com um menor volume de solvente (MALDANER & JARDIM, 2009).

À espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) acoplada à técnica cromatográfica potencializa a qualidade dos resultados tendo em vista a possibilidade de informação estrutural e massa molar, com aumento de seletividade. O acoplamento do espectrômetro de massas ao cromatógrafo a gás foi um processo relativamente simples, tendo em vista que o analito eluído da coluna apresenta compatibilidade para análise, podendo ser conectado diretamente

à fonte do espectrômetro, sendo compatível com a sua necessidade de alto vácuo. O acoplamento do espectrômetro de massas ao cromatógrafo a líquido requereu um processo de adequação, tendo em vista as incompatibilidades relacionadas à vazão do eluente do sistema cromatográfico, a pouca volatilidade dos compostos analisados ou a sensibilidade com a temperatura, impedindo a ionização das moléculas através das técnicas de ionização mais comumente aplicadas na espectrometria de massas (CHIARADIA, 2008; DONATO *et al.*, 2012).

Na espectrometria de massas os átomos ou moléculas de uma amostra são ionizados na fonte, e a razão massas-carga (m/z) de cada íon é determinada pelo analisador de massas. Os íons atingem o detector gerando sinais elétricos que são registrados na forma de um espectro de massas. O esquema da espectrometria de massas, a partir da separação cromatográfica está apresentado na Figura 143. A partir do valor de m/z de um íon consegue-se estimar ou obter o valor exato da massa nominal da molécula correspondente. Quase todas as substâncias podem ser analisadas por MS, já que existem diversos tipos de fontes de ionização, analisadores de massas e detectores (DE HOFFMANN, 2007; EKMAN *et al.*, 2009).

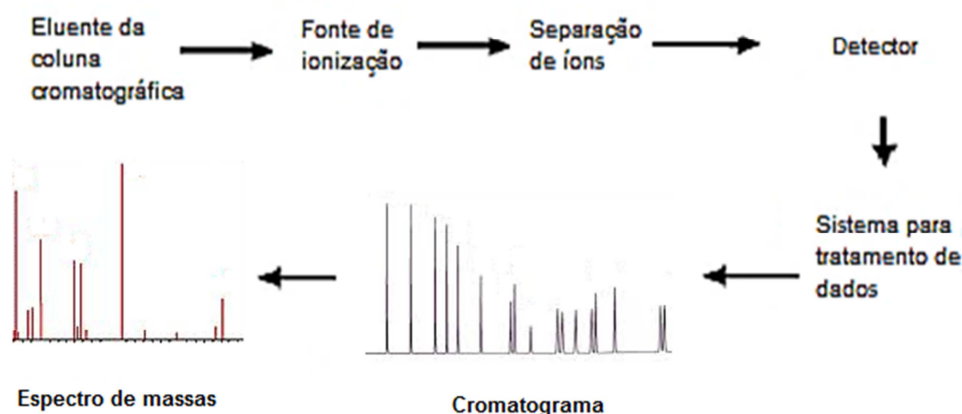


Figura 13 - Esquema de uma análise por MS após a separação cromatográfica

2.3.1 Fontes de Ionização utilizadas na cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas

2.3.1.1 Ionização por elétrons, EI

A ionização por elétrons, EI (do inglês *electron impact*) é a mais utilizada na cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas, GC-MS (do inglês *gas chromatography mass spectrometry*). Nesta forma de ionização o analito é bombardeado com elétrons de alta energia, geralmente 70 eV. O processo ioniza o analito pela remoção de um único elétron ($M^+ \bullet$), como este processo requer tipicamente 10 eV, o restante da energia gera a fragmentação do analito (CHIARADIA, 2008).

2.3.1.2 Ionização Química, CI

A outra forma de ionizar ao analito é através da ionização química, CI (do inglês *chemical ionization*), que foi desenvolvida para aumentar a produção do íon molecular e reduzir as fragmentações. O processo de ionização se dá pela introdução do analito em fase gasosa, na câmara de ionização, a qual contém um gás reagente. Esta mistura (moléculas do analito + gás reagente) é bombardeada com elétrons, assim como na EI. Neste processo o gás reagente está em excesso em relação ao analito, sendo quase que exclusivamente ionizado, dando origem aos íons pseudomoleculares. Como este processo tem relativa baixa energia, quase não é observada fragmentação o que é interessante para a determinação analítica (CHIARADIA, 2008)

2.3.2 Fontes de Ionização utilizadas na cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é uma técnica que tem se tornado uma tendência mundial. A vantagem principal é o aumento expressivo na eficiência de separação dos analitos, mesmo com vazões elevadas da fase móvel. Como resultado, há o aumento da eficiência e também se obtém uma melhor resolução, um menor tempo de análise e uma melhor detectabilidade (QUEIROZ, 2012).

O acoplamento da espectrometria de massas à cromatografia líquida exigiu desenvolvimento de interfaces e de formas de ionização alternativas.

As fontes de ionização mais utilizadas em cromatografia líquida são ionização por eletronebulização ESI (do inglês *electrospray ionization*) ionização química à pressão atmosférica, APCI (do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*) e mais recentemente, a fotoionização à pressão atmosférica, APPI (do inglês *atmospheric pressure photoionization*).

2.3.2.1 Ionização por Eletronebulização, ESI

Na ESI a fase móvel contendo o analito passa através de um capilar, que está na pressão atmosférica e mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar é formado um *spray*, que são pequenas gotas altamente carregadas, que se deslocam em sentido contrário ao ponto onde se encontra o capilar, em uma região com maior ou menor potencial, dependendo do modo de ionização: positivo ou negativo. A dessolvatação é assistida por um fluxo de gás seco, geralmente nitrogênio na região do *spray*. Na medida em que ocorre a dessolvatação, as gotículas vão tendo seu tamanho reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida ocorrendo a “explosão coulômbica” que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais se originaram. Uma série de explosões passa então a ocorrer até que são produzidos íons do analito os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (CHIARADIA *et al.*, 2008). A evaporação do solvente também faz com que a repulsão eletrostática entre as espécies carregadas se torne altíssima, sendo assim, a tensão superficial da gota é incapaz de sustentar tantas cargas (limite de Rayleigh), induzindo a transferência (expulsão) dos íons para a fase gasosa (SOMOGYI, 2008).

Três tipos de íons podem ser gerados durante a ionização por ESI: íons moleculares, moléculas protonadas/desprotonadas (íons quasi-moleculares) e moléculas cationizadas ou anionizadas. Os processos que ocorrem no interior do capilar definem como cada íon é formado: reações de oxirredução, que produzem íons moleculares (M^{+}) ou (M^{-}); reações ácido-base, que resultam na formação de moléculas protonadas $[M+H]^{+}$ ou desprotonadas $[M-H]^{-}$ e, coordenação com cátions (geralmente os da família 1A) ou ânions (principalmente cloretos), que leva

à formação de moléculas cationizadas $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, ou anionizadas $[M+Cl]^-$ (CROTTI *et al.*, 2006).

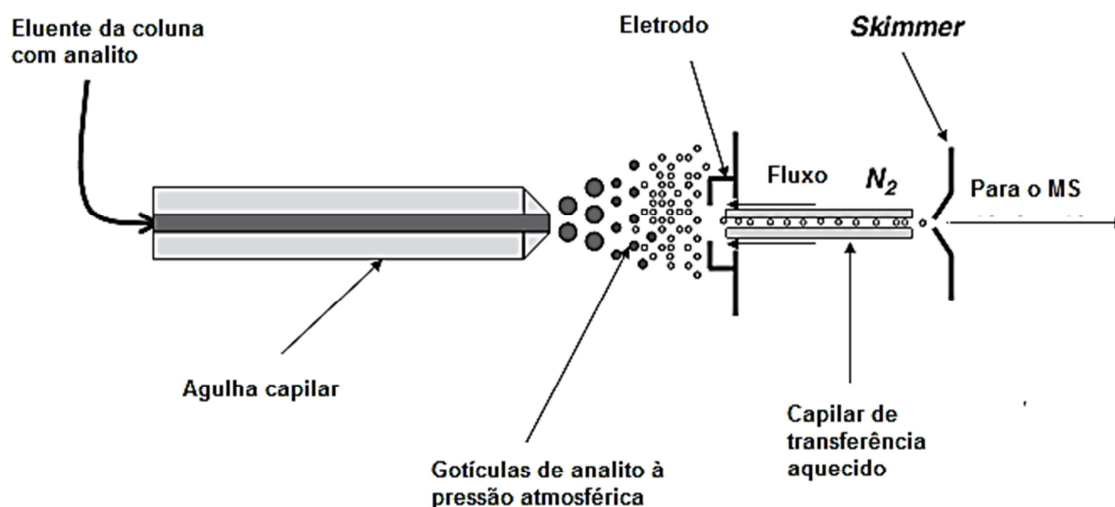


Figura 14 - Esquema de uma fonte de ionização por eletronebulização
Fonte: SOMOGYI, 2008

A ESI é uma técnica de ionização “suave”, ou seja, pequena quantidade de energia é transmitida para as moléculas que são ionizadas. A eficiência do ESI depende em parte da capacidade da molécula se associar e levar uma carga. Assim, são formados íons pseudo-moleculares intactos, do tipo $[M+H]^+$ no modo positivo e $[M-H]^-$ no modo negativo. Estas espécies são complexos não covalentes formados entre um analito de interesse e quaisquer outros componentes, como fase móvel, aditivos e impurezas (DANIEL *et al.*, 2002)

2.3.3 Analisadores de massas

Os analisadores de massas separam os íons de acordo com a relação existente entre suas massas e cargas, ou seja, a razão m/z . As características de construção e operação diferem de um para outro, assim como seus benefícios e limitações. A escolha do mais apropriado deve ser efetuada considerando-se a aplicação (exemplo, faixa de massas desejada), desempenho (resolução) bem como o custo (LANÇAS, 2009).

O quadrupolo é constituído de dois pares de hastes conectados eletricamente e colocados paralelamente entre si, sobre as quais são aplicados

potenciais combinados de corrente contínua (CC) e radio frequência (RF), que variam em magnitude durante a passagem dos íons pelo quadrupolo.

Em um valor específico de voltagem e frequência associada, íons de uma determinada razão m/z atravessam o quadrupolo descrevendo uma trajetória estável. Conforme o campo elétrico gerado, consegue-se que, somente íons com a relação massas/carga específica atinjam o detector, enquanto os não selecionados são desviados, levando-os a colidir com as hastes, para a sua neutralização (EKMAN *et al.*, 2009; CHARARDIA, 2008).

O analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (TQ) é constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo, que pode ser também um hexapolo ou octapolo, não é utilizado para separar íons de mesma razão m/z , mas sim como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo. A fragmentação ocorre geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (CID, do inglês *collision-induced dissociation*) A cela de colisão também é empregada como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo. Os quadrupolos Q1 e Q3 são controlados para transmitir íons de uma única razão m/z ou de um intervalo de razões m/z para gerar informação analítica mais exata (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). A Figura 15 apresenta o esquema de um analisador de massa tipo triplo quadrupolo.

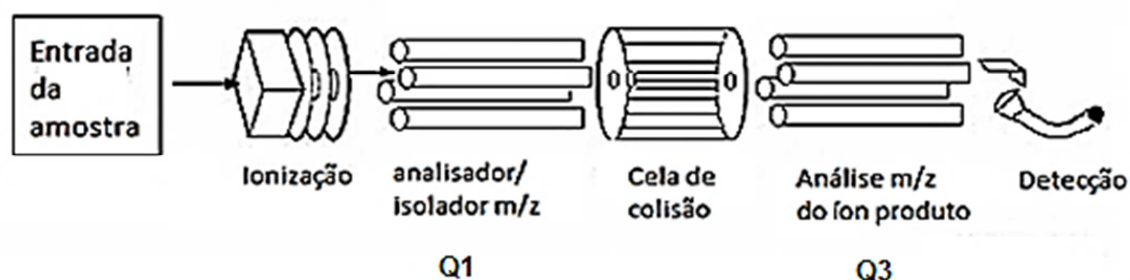


Figura 15: Esquema de um analisador de massas tipo triploquadrupolo.

Fonte: Adaptado de <http://www.espectrometriademassas.com.br>

2.3.4 Aplicações das técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas na análise de agrotóxicos

A cromatografia combinada com várias técnicas de detecção é um dos melhores e mais utilizados métodos analíticos. Os métodos cromatográficos

acoplados à espectrometria de massas combina as vantagens da cromatografia, de alta seletividade e eficiência na separação, com a informação estrutural e aumento na seletividade e detectabilidade, em especial no modo SRM, da espectrometria de massas (VÉKEY, 2001). Segundo Alder *et al.*, (2006), a cromatografia gasosa acoplada ao EI-MS e cromatografia líquida combinada com a espectrometria de massas em série são as técnicas de detecção mais importantes na análise de resíduos de agrotóxicos. Ambas as técnicas são necessárias e serão também no futuro, entretanto os benefícios da LC-MS/MS em termos de escopo, detectabilidade e melhor seletividade são óbvias. Estas características, juntamente com a capacidade de executar a maioria das determinações sem derivatização, fazem da cromatografia líquida a técnica preferida atualmente para a determinação de resíduos de agrotóxico.

A determinação de compostos pirazólicos em trigo e arroz, vegetais e frutas foi relatada por Dong *et al.*, (2012). No método desenvolvido pelos autores foi utilizado QuEChERS e limpeza (*clean-up*) do extrato com C18 e GCB, (carbono grafitizado do inglês Graphitized Carbon Black) e determinação analítica utilizando UHPLC-ESI-MS/MS com varredura SRM por monitoramento seletivo de reações, (do inglês *Selected Reaction Monitoring*)

Balinova *et al.*, (2007) determinaram 25 agrotóxicos multiclasse em trigo utilizando GC-MS. A extração dos analitos foi realizada utilizando acetona e água e o sorvente para SPE foi Bond Elut SAX (250 mg) e PSA (250 mg). A recuperação dos analitos ficou entre 38 e 126% e o limite de quantificação entre 0,005 e 0,05 mg kg⁻¹.

No trabalho de Mastovska *et al.*, (2010) 199 agrotóxicos multiclasse foram analisados utilizando GC-MS/MS e LC-MS/MS. O trabalho utilizou 5 g de trigo e os analitos foram extraídos utilizando método QuEChERS. O limite de detecção foi < 10 µg kg⁻¹ para a maioria dos agrotóxicos e a faixa de recuperação ficou entre 51 e 131% para 197 agrotóxicos.

Zhang *et al.*, (2011) publicaram o seu trabalho onde foram determinados 209 agrotóxicos em 24 amostras de *commodities* agrícolas por LC-MS/MS. A extração foi realizada utilizando método QuEChERS. No estudo a recuperação ficou entre 100 ± 20% para mais de 75% dos analitos, na concentração de 10 µg kg⁻¹. O método validado se mostrou adequado para ser utilizado na faixa de concentração de 2,5 a > 1000 µg kg⁻¹.

Hiemstra & de Kok (2007) propuseram um método multirresíduo para detecção de 171 agrotóxicos e seus metabólitos em frutas, vegetais e cereais utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS). As recuperações ficaram entre 70-110% e o RSD < 15% para todos os compostos estudados. A seletividade e robustez do método por LC-MS/MS foram demonstrada, durante o período de um ano, pela comparação de resultados com métodos convencionais GC e LC já validados, aplicados em mais de 3500 amostras.

2.4 Preparo de amostras para determinação de resíduos de agrotóxicos

A determinação de agrotóxicos em matrizes secas, tais como os cereais e alimentos para animais é considerada uma tarefa difícil, devido ao grande complexidade e diversidade das matrizes, os componentes da matriz e baixas concentrações em que esses compostos estão normalmente presentes. A dificuldade na aplicação de métodos multirresíduos é atribuída a presença de coprodutos extraíveis que tornam a detecção, identificação e quantificação de resíduos de agrotóxicos em cereais e alimentos mais complicada, se comparada com as matrizes de elevado teor de água, tais como frutas e legumes (Pareja *et al.*, 2011)

A Figura 16 apresenta a adaptação da representação das etapas do procedimento analítico para o preparo de amostras conforme BEYER & BIZIUK (2008).

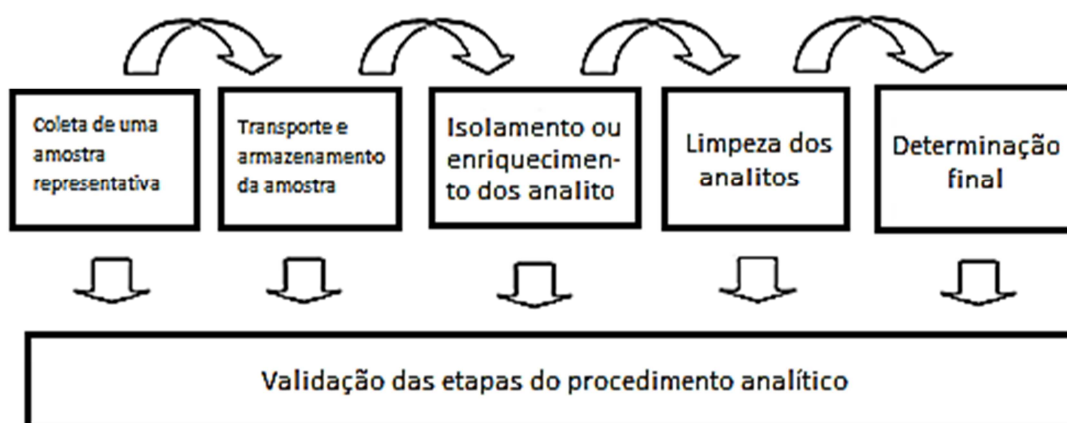


Figura 16 - Etapas do procedimento analítico

Fonte: Adaptado de BEYER & BIZIUK (2008)

O desenvolvimento de procedimentos para preparo de amostras tem utilizado várias técnicas e sendo constantemente estudado devido a grande variedade de agrotóxicos utilizados na agricultura e as diferentes complexidades das matrizes.

Nos últimos anos o método QuEChERS tem sido proposto como uma opção eficaz para a determinação de agrotóxicos em diferentes matrizes. No entanto, outros métodos, como extração assistida por ultrassom, extração com fluido supercrítico, extração com líquido pressurizado ou procedimentos baseados absorventes, como a extração em fase sólida, dispersão da matriz em fase sólida, extração por barra sortiva ou em micro extração em fase sólida, com as suas vantagens e desvantagens inerentes, têm também sido propostos (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2012).

Silvério *et al.*, (2012) citam a extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura tem sido relatado como uma alternativa para extração de agrotóxicos em diversas matrizes. O método é baseado na partição dos analitos entre as fases aquosa e orgânica, obtida com o abaixamento da temperatura (-20 °C). A vantagem deste método é que os componentes da amostra são congelados com a fase aquosa, enquanto que os agrotóxicos são extraídos pela fase orgânica (PINHO *et al.*, 2010)

A utilização de baixa temperatura no preparo de amostras para análise de agrotóxicos tem sido relatada na literatura. No trabalho de Silvério *et al.*, (2012) quatro agrotóxicos foram determinados em água utilizando extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura. O solvente extrator foi acetonitrila e as amostras foram congeladas a - 18 °C por 30 minutos. A técnica tem a vantagem de que a esta temperatura a fase aquosa congela e o solvente, que possui menor temperatura de congelamento, permanece líquido sendo facilmente recolhido do recipiente.

Um método multirresíduo simples foi desenvolvido por Cho *et al.*, (2013) para a determinação simultânea de carbendazim, tiabendazol e aminopurina 6-benzil em brotos de feijão. As amostras foram extraídas com acetonitrila seguido de particionamento a - 80 °C, durante 5 a 10 min. A recuperação média ficou entre 80,4 e 96,3% na faixa de concentração de 0,01 a 1,0 mg kg⁻¹ e limite de

quantificação entre 0,005 a 0,01 mg kg⁻¹. O método foi aplicado com sucesso em 90 amostras.

O trabalho de Pinho *et al.*, (2010) teve como objetivo otimizar e validar um método de extração utilizando extração líquido-líquido e partição com baixa temperatura em mel por cromatografia gasosa. O método foi aplicado para a determinação de clorpirifós, cialotrina, cipermetrina e deltametrina. As recuperações foram superiores a 84%, com desvio-padrão abaixo de 10%.

No trabalho de Payá *et al.*, (2007) foi validada a extração de 80 agrotóxicos de várias classes químicas com baixo teor de lipídios. Uma mistura de 38 agrotóxicos foi determinada por GC-MS/MS e 42 foram determinados utilizando LC-MS/MS. O preparo da amostra foi realizado através do método QuEChERS utilizando 5 g de amostra, para farinha de trigo, sendo que a limpeza do extrato foi realizada utilizando PSA e sulfato de magnésio. O extrato de farinha de trigo foi submetido a congelamento por 2 h na temperatura de - 25 °C, antes do processo de limpeza. O precipitado foi separado por decantação. As recuperações ficaram na faixa entre 70 e 110% (98% na média) e o desvio padrão relativo foi em geral abaixo de 10% (4,3% em média). Os resultados mostraram que o método é altamente eficiente e robusto e, portanto, adequado para acompanhar o cumprimento LMR de uma grande gama de combinação de *commodities/agrotóxicos*.

Walorczyk & Drozdzyński (2012) propuseram um procedimento de preparo de amostras para determinação de multiresíduos de agrotóxicos para determinação em amostras de cereais como trigo. O novo método abrangeu a determinação de 167 analitos simultaneamente e se mostrou eficiente e sensível. A etapa de extração iniciou com a adição de água e acetonitrila simultaneamente na proporção de 2:3 (v/v), o que evita a degradação de compostos que são sensíveis a ficarem muito tempo em contato com a água, como o malationa, além de facilitar o manuseio da amostra. Na etapa de *clean-up*, os autores utilizaram congelamento das amostras a - 26 °C, antes da utilização de d-SPE, onde verificaram a redução de co-extrativos, quando comparado apenas com a utilização do SPE-dispersivo. Este resultado foi mais pronunciado quando foram utilizadas massas acima de 50 mg mL⁻¹ de extrato em acetonitrila, sendo otimizado 75 mg de PSA por cada 1 mL de extrato. A grande maioria dos compostos cumpriu os critérios de validação com recuperações na faixa de 70-120% e RSD igual ou inferior a 20%. O método foi aplicado em cerca de 900 amostras reais com resultados satisfatórios.

2.4.1 Método QuEChERS

Em 2003, Anastassiades e colaboradores desenvolveram um método analítico que combina a extração, isolamento e limpeza de extrato para determinação de agrotóxicos em matrizes de alimentos. Foi denominada pelo acrônimo QuEChERS, que significa, rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro. Esta técnica envolve a extração com acetonitrila, seguida da partição, através da adição de sais (ex. sulfato de magnésio, $MgSO_4$, e cloreto de sódio, $NaCl$). Junto com o novo método foi proposta uma etapa de limpeza denominada Extração em Fase Sólida Dispersiva, d-SPE (do inglês, *Dispersive Solid Phase Extraction*). A escolha do solvente acetonitrila para a etapa de extração possibilitou a minimização de co-extrativos lipofílicos, além de ser adequado para uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades e, quando acidificada, permite recuperações satisfatórias de agrotóxicos que geralmente apresentam problemas de estabilidade, além de ser adequada para LC-MS/MS e GC-MS/MS. O fato de adicionar ácido acético à acetonitrila aumenta a estabilidade dos compostos, pois poucos agrotóxicos se degradam em meio ácido. A adição de água na amostra antes do início da extração foi necessária para amostras contendo um teor em água reduzido, tendo em vista que este método foi concebido inicialmente para amostras contendo um teor em água superior a 75% (LEHOTAY *et al.*, 2005). É o método de escolha para análise de alimentos, porque combina várias etapas e amplia a gama de agrotóxicos recuperados. O método passou por várias modificações e melhorias ao longo dos anos desde a sua primeira apresentação. Estes foram concebidos para melhorar a recuperação para tipos específicos de agrotóxicos ou tipos de alimentos (PRESTES, 2011; WILKOWSKA & BIZIUK, 2011; NÚÑEZ, 2012). As modificações são com relação a adição de reagentes para formar um tampão, a fim de garantir a extração em pH 4 e 5, uma vez a extração nesta faixa de pH que proporciona recuperações acima de 70%. O pH é importante tanto para compostos sensíveis à degradação em meio alcalino, como para aqueles sensíveis em meio ácido. A etapa de limpeza dos extratos também foi modificada através da utilização de outros sorbentes, como C18 para amostras contendo teores de gordura $\geq 2\%$ ou uma mistura de sorbentes (PSA e C18), que

tem se mostrado muito eficiente na recuperação de analitos em matrizes com alto teor de gordura, como abacate e leite (PRESTES *et. al.*, 2009).

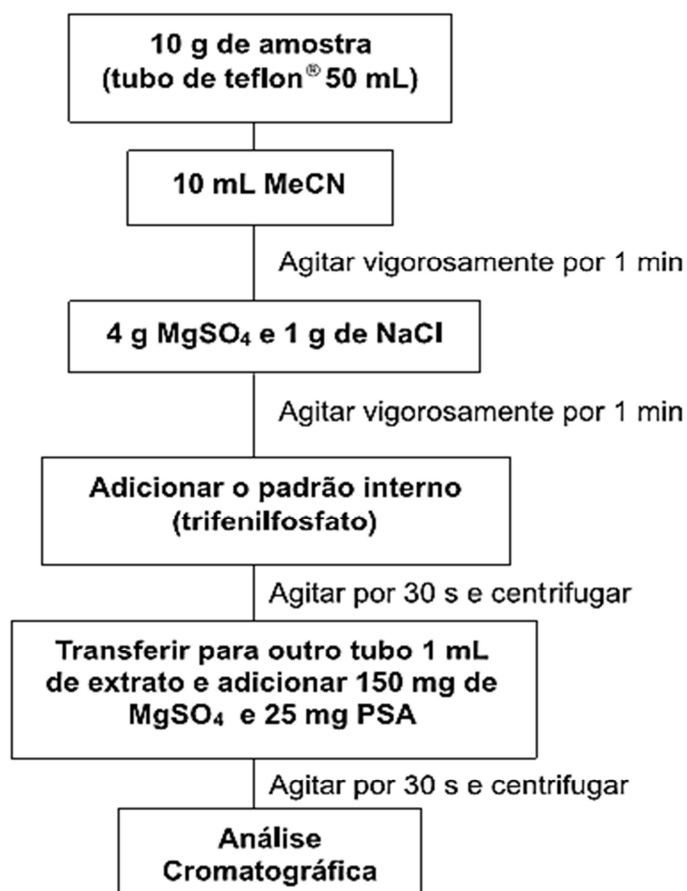


Figura 17 – Fluxograma do procedimento de preparo de amostras utilizando método QuEChERS original

Fonte: Prestes, 2011.

No trabalho de Kolberg *et al.*, (2011) inicialmente 500 g de trigo, farinha de trigo e farelo de trigo foram misturadas em Ultraturrax com 1500 mL de água até a formação de uma pasta homogênea. Então em 10 gramas deste preparo foi adicionado 10 mL de acetonitrila contendo 1% de ácido acético (v/v) e homogeneizada por 1 min. Após, 3 g de sulfato de magnésio foi adicionado e imediatamente misturado por 20 s. Após 1,7 g de acetato de sódio foi adicionado e novamente agitado por 1 min. A amostra foi então centrifugada por 8 min a 4000 rpm. A limpeza do extrato foi realizada utilizando 0,6 g de sulfato de magnésio e 0,5 g de C18. Os extratos foram injetados no GC-MS. O procedimento se mostrou rápido e eficiente para determinação de 24 agrotóxicos nas matrizes estudadas.

No trabalho de Walorczyk (2007), 5 g de amostra foi colocada num tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL. Foram adicionados 10 mL de água e 15 ml de

acetonitrila, a mistura foi agitada vigorosamente durante 5 min. Para o processo de partição foi utilizado 0,5 g de citrato dissódico sesquihidrato, 1 g citrato trissódico di-hidratado, 4 g de sulfato de magnésio anidro e 1 g de cloreto de sódio a mistura foi imediatamente agitada manualmente durante 1 min e depois centrifugada a 2500 rpm durante 5 min. Em seguida, uma alíquota de 7,5 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de centrífuga de polipropileno contendo 0,75 g de sulfato de magnésio anidro, 0,5 g de C18 e 0,125 g de PSA. O tubo foi agitado em vórtex durante 0,5 minutos e centrifugado a 2500 rpm durante 5 min. Uma alíquota de 3 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio de vidro, aos quais foram adicionados 50 µL de 5% de ácido fórmico em acetonitrila (v/v). O extrato foi evaporado até à secura sob uma corrente de nitrogênio e o resíduo foi redissolvido em 1,5 mL de tolueno, antes da sua injeção no sistema GC-MS/MS. As recuperações do método variaram entre 73 e 129%, com desvios padrão relativos entre 1 e 29% para a maioria dos agrotóxicos e os limites de detecção foram menor ou igual a 0,01 mg kg⁻¹ para cerca de 68% dos agrotóxicos. O método proposto foi utilizado na análise de 136 amostras reais sendo o novo método favoravelmente comparado com um método de referência.

Li *et al.*, 2013 em seu trabalho determinaram 19 triazinas em amostras de cereais. Para isso, mediu-se a massa de 5,0 g de amostra em um tubo de centrífuga de 50 mL e adicionaram 20 µL da solução padrão, 2 g de cloreto de sódio, 4 g de sulfato de sódio, 20 ml de éter de petróleo saturado com acetonitrila e 10 mL de acetonitrila saturada com éter de petróleo. A solução foi agitada vigorosamente e vórtex durante 30 s e depois centrifugada a 8000 rpm durante 10 min. A fase de acetonitrila foi separado da fase de éter de petróleo e transferido para um balão de fundo redondo. Depois, mais 10 mL de acetonitrila saturada com éter de petróleo foram adicionados para o tubo e o processo foi repetido. A fase acetonitrila foi recolhida e reunida com a anterior. O extrato foi, em seguida, concentrado em um rotaevaporador a 40 °C até 1-2 mL. No extrato foi realizado clean-up com OASIS MCX. Os cartuchos foram pré-condicionados com 5 mL metanol e 5 mL de água deionizada. Os cartuchos contendo analitos foram lavados com 3 mL de água deionizada contendo 2% de ácido fórmico, 3 mL de acetona e 3 mL metanol sucessivamente, e em seguida secou-se sob vácuo durante 2 min. Os resíduos de compostos foram eluídos com 5 mL de uma mistura contendo 95% (v/v) de metanol e 5% (v/v) de amônia aquosa. O eluato recolhido foi seco sob uma corrente de nitrogênio gasoso a 30 °C. Finalmente, os analitos foram dissolvidos

em 100 μL de metanol e 5 μL foi injetado para análise por HPLC-LIT-MS³. O método proposto pode fornecer uma orientação geral para a determinação de triazinas e os seus produtos de degradação em outros compostos em alimentos.

2.4.2 Ultrassom

Ultrassons (US) são ondas mecânicas que necessitam de um meio elástico para se espalhar. As ondas de ultrassom têm uma frequência de 20 kHz a 10 MHz, sendo maior que a da audição humana (de 16 Hz a 16-20 kHz). Estas ondas sonoras quando atravessam um meio elástico produzem um deslocamento longitudinal das partículas, agindo como um pistão na superfície do meio. Estas ondas resultam em uma série de sucessões de compressão e rarefação. Quando o pistão está na sua posição aberta induz uma compressão para o meio e quando o êmbolo está na sua posição contraída cria-se uma fase de esgotamento. Cada meio tem uma distância molecular crítica, que abaixo deste valor crítico, o líquido permanece intacto, mas acima desta distância, o líquido poderia quebrar e espaços vazios podem ser gerados para dentro do líquido. No caso dos ultrassons, se o ciclo de rarefação for suficientemente forte, a distância entre as moléculas contíguas podem atingir ou mesmo exceder a distância molecular crítico do líquido. Os vazios criados para no meio são as bolhas de cavitação que respondem ao efeito ultrassônico. Quando os tamanhos destas bolhas chegam a um ponto crítico entram em colapso liberam grandes quantidades de energia. A temperatura e a pressão no momento do colapso foram estimadas em até 5000 K e 2000 atmosferas. Isto propicia acelerar dramaticamente a reação química do meio. (CHEMAT, 2011).

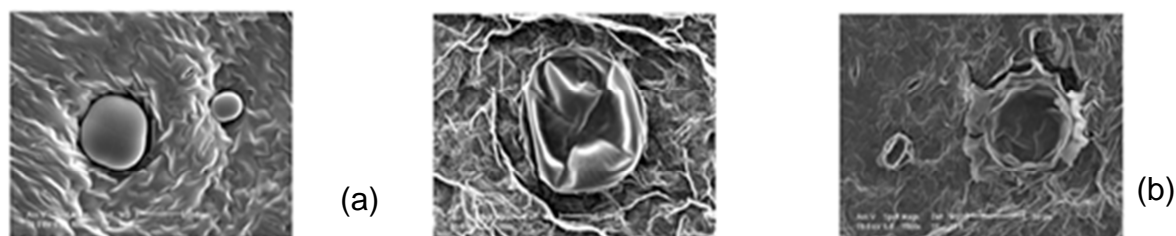


Figura 18 - Cavitação (a) e colapso (b) da bolha causado por ultrassom.

Fonte: CHEMAT, 2011

A utilização do US permite uma maior rapidez na extração de compostos orgânicos quando comparado a outras técnicas como Soxhlet, apresentando alta reprodutibilidade, reduzido consumo de solvente, o que simplifica a manipulação e o processo de limpeza do extrato (CHEMAT, 2011).

No trabalho de Granby *et al.*, (2004) foram utilizadas 3 g de amostra de cereal, 40 mL de acetato de amônio: ácido acético 20 mmol L⁻¹ em água (95:5) e 30 min em banho de ultrassom. Após as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 10 min. A validação do procedimento realizada pelos autores, mostrou resultados satisfatórios para os 19 agrotóxicos estudados em amostras de trigo.

Gonzalez-Curbelo *et al.*, (2013) avaliaram a utilização da técnica de ultrassom no preparo de amostras de cereais. Uma massa de 1,5 g de amostra com 20 mL de acetonitrila contendo 1,25% (v/v) de ácido fórmico foi agitada vigorosamente por 2 min e após submetida a sonicação por 5 min a 100 W. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 8 min a 4000 rpm. Os resultados da validação do procedimento mostraram valores satisfatórios para os 19 compostos estudados.

Hercegova *et al.*, (2005) na determinação de agrotóxicos em alimento infantil utilizaram 25 g de amostra e 50 mL de acetonitrila. A amostra foi colocada em sonda de ultrassom na frequência de 20 kHz, pulsada a 80% da sua amplitude em ciclos de pulso de 3 s no período de 1 a 5 min. O estudo comparou o procedimento com a utilização de um banho de ultrassom trabalhando a 45 W, na frequência de 38 kHz, com o tempo de extração de 5–120 min. Quando se utilizou banho de ultrassom as recuperações ficaram próximas a 100% nas amostras fortificadas na concentração de 100 µg kg⁻¹ no tempo de 5 min. A utilização de sonda pulsada permitiu a realização da extração no tempo de 2 min. O procedimento apresentou recuperação satisfatória acima de 90%, apenas para captana e dimetoato que as recuperações ficaram em 46,1% e 77,7% respectivamente.

Liu *et al.*, (2010) utilizaram 1 g de amostra contendo 50 µg kg⁻¹ de imidacloprid-d4 a qual ficou em repouso por 1 h. Após foi adicionado 20 mL de acetonitrila e homogeneizado por 30 s com vórtex. As amostras de cereal foram extraídas com banho de ultrassom por 15 min. Após as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 min a 4 °C. Os extratos foram evaporados através de um fluxo de nitrogênio a 40 °C e posteriormente redissolvidas em 5 mL de água sendo então submetidas a SPE e analisadas por UPLC-MS/MS. A

recuperação ficou entre 65-120% e o RSD foi de 1,3-16% para os compostos estudados.

2.5 Validação de Métodos Analíticos

A demonstração da capacidade técnica de realizar ensaios pode ser evidenciada através da validação do método utilizado.

O objetivo da validação é demonstrar que determinado procedimento analítico é adequado aos objetivos propostos, ou seja, que atende a parâmetros de desempenho e a critérios de aceitação preconizados. Deve ser um estudo experimental e integralmente documentado. A validação consiste em confirmar que um método proposto para um determinado fim possui confiabilidade, rastreabilidade, comparabilidade, que gere informações confiáveis e interpretáveis e que está adequado para o uso pretendido e para tomada de decisões (BRASIL, 2011).

A ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 estabelece que métodos normalizados utilizados fora dos escopos para os quais foram concebidos, ampliados ou modificados; métodos não normalizados; e métodos criados ou desenvolvidos pelos laboratórios devem ser validados. Esta norma define também que os laboratórios devem confirmar que têm condições de operar adequadamente os métodos normalizados antes da implantação dos ensaios (ABNT, 2005).

2.5.1 Desenvolvimento de métodos e parâmetros de validação

No desenvolvimento de métodos analíticos são feitas adaptações de um método existente por meio de pequenas modificações ou delineando experimentalmente para criação de um método totalmente novo. Neste último, o processo de desenvolvimento exige muito trabalho e sempre existirá uma dúvida inicial acerca da eficiência do método desenvolvido (EURACHEM, 1998).

No processo de validação, devem-se levar em consideração todas as incertezas do processo analítico, incluindo àquelas atribuídas aos equipamentos, padrões, calibrações, analista e ambiente. A validação faz parte da documentação submetida às agências governamentais de regulamentação quando se pretende o

registro de métodos usados para a quantificação de produtos como fármacos em fluidos biológicos e determinação de resíduos de agrotóxicos em vários tipos de matrizes (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2013).

Os parâmetros de validação variam de acordo com a técnica analítica ou com o que preconiza o órgão regulamentador. Buscando padronizar o procedimento de validação organizações como a IUPAC (do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*) publicou um guia para calibração em Química Analítica na década de 90. As agências regulatórias dos Estados Unidos FDA, do Japão MHLW (do inglês, *Ministry of Health, Labour and Welfare*) e da União Europeia EMEA (do inglês, *European Medicine Agency*) organizaram a Conferência Internacional sobre Harmonização, ICH (do inglês *International Conference on Harmonisation*), que elaborou um guia sobre validação de métodos utilizado na área de fármacos dentre outras.

As técnicas cromatográficas devem considerar todas as diferentes etapas do procedimento analítico para a validação. Em geral, a validação do método envolve a execução e a interpretação de uma série de experimentos planejados a fim de avaliar as características do método. Desta forma, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, tais como: procedimento de amostragem, preparo da amostra, análise cromatográfica, detecção e avaliação estatística dos dados (RIBANI *et al.*, 2004; DE SOUZA, 2007; SANCO, 2013).

No planejamento e execução da validação devem ser consideradas as seguintes informações (Codex Alimentarius, 2003; INMETRO, 2011):

- Identificação adequada do objetivo e escopo do método.
- Descrição do item a ser ensaiado.
- Definir os parâmetros de desempenho e critérios de aceitação.
- Definir os experimentos de validação.
- Definir o aparato e equipamentos, incluindo os requisitos de desempenho técnico condições, padrões de referência e materiais de referências requeridos, condições ambientais requeridas e qualquer período de estabilização necessário.
- Ajustes parâmetros do método e/ou critérios de aceitação, se necessário;
- Executar experimentos completos de validação.

- Definir critérios de revalidação (por exemplo, mudanças de pessoal, condições ambientais, equipamentos, periodicidade, etc.)

Na validação de métodos cromatográficos para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos devem ser avaliados os parâmetros: faixa linear, seletividade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (RIBANI, 2004).

2.5.1.1 Seletividade (ou especificidade)

Seletividade é a habilidade de um método para determinar especificamente os analitos de interesse na presença de componentes de matriz sob as condições iniciais do ensaio (EURACHEM, 1998).

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração.

Experimentos para avaliação da seletividade descritos na literatura sobre validação de métodos analíticos envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes. Quando não há disponibilidade de interferentes, alguns autores sugerem a avaliação da habilidade de medição do analito por diferentes métodos, técnicas ou por meio de variações nas condições instrumentais. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas (DE SOUZA, 2007; INMETRO, 2011).

A seletividade pode ser conseguida utilizando as técnicas GC-MS/MS e LC-MS/MS, pois a análise é realizada a partir de fragmentos de massas característicos de cada analito (DONATO, 2012).

2.5.1.2 Curva analítica, linearidade e faixa de trabalho

Linearidade é a capacidade de o método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2011).

Podem ser utilizados três tipos possíveis de curva de calibração para avaliação e aceitação dos valores (BRASIL, 2011):

1. Curva de Calibração do Analito em Solução: construída a partir dos padrões de calibração do analito puro em solvente. Este tipo de curva de calibração somente poderá ser utilizado se comprovada a inexistência do efeito de matriz.
2. Curva de Calibração da Matriz Branca Fortificada: construída a partir da matriz branca fortificada com os padrões de calibração do analito puro.
3. Curva de Calibração do Extrato da Matriz Branca Fortificado: construída a partir do extrato da matriz branca fortificado com os padrões de calibração do analito puro.

A IUPAC no documento elaborado a partir das discussões no *Symposium on Harmonization of Quality Assurance Systems for Analytical Laboratories* (Thompson *et al.*, 2002) recomenda que os níveis de concentração da curva analítica devem ser igualmente espaçados entre si, estar sobre a faixa de concentração de interesse, e abranger a faixa de 0 a 150% do valor esperado. Os padrões analíticos devem ser analisados no mínimo em duplicata, e em ordem aleatória. O Inmetro no documento DOC-CGCRE 008 rev 04 de 2011 (INMETRO, 2011) recomenda que a curva analítica com no mínimo sete níveis de concentração. A União Européia (DIRECTIVE 657, 2002) recomenda no mínimo cinco níveis de concentração sejam empregados na construção da curva analítica.

No processo de validação é necessário conhecer até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear a fim de assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto indesejável na resposta analítica. Toda quantificação requer dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. Pode-se obter a linearidade através da padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra em análise. A equação (1) relaciona as duas variáveis (INMETRO, 2011).

$$y = a + bx \quad (1)$$

O coeficiente de correlação apresenta uma faixa entre $-1 \leq r \leq 1$, sendo que quanto mais próximo de 1 ou -1, menor será o erro em y e, portanto, melhor será o ajuste da função matemática escolhida à curva de calibração (RIBEIRO *et al.* 2008). Segundo BRASIL, 2003 o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r^2) deve ser = 0,99.

No entanto, apenas o valor do coeficiente de correlação não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva, deve-se avaliar a possibilidade da presença de resíduos ou pontos mal distribuídos ao longo da faixa de linear. O ajuste da equação matemática é feito pelo método dos quadrados mínimos, no qual a melhor curva será aquela que fornecerá o menor valor para a soma quadrática dos resíduos (Q) obtidos entre o sinal analítico medido (y_i) e o sinal analítico predito (\hat{y}_i), para um conjunto de N pontos experimentais, conforme Equação 2 (RIBEIRO *et al.*, 2008).

$$Q = \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (2)$$

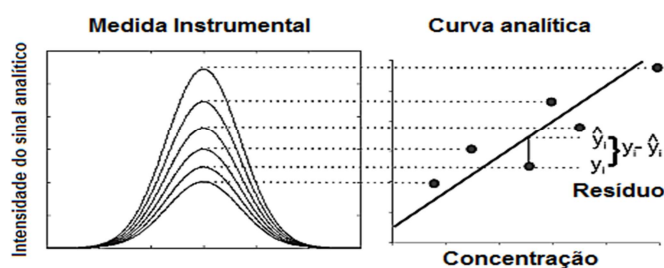


Figura 19 - Curva analítica com estimativa do erro residual do sinal analítico
Fonte: (RIBEIRO *et al.*, 2008)

2.5.1.2.1 Avaliação da normalidade

A maioria dos testes estatísticos requererem a distribuição normal dos dados. A estatística paramétrica é um dos melhores exemplos da importância de se assegurar a premissa de normalidade, que consiste usualmente na distribuição normal dos dados. Se a premissa de normalidade é violada a interpretação dos dados não é válida (RAZALI & WAH, 2011). Segundo Souza (2005) o tipo de distribuição é crucial para validade das interferências produzidas por estatísticas paramétricas em amostras finitas, considerando que o tamanho das amostras é controlado. A não normalidade é impeditiva para avaliação das interferências baseadas em testes estatísticos paramétricos.

A avaliação da normalidade da distribuição dos resíduos pode ser determinada utilizando vários testes, como Kolmogorov-Smirnov, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk (RAZALI & WAH, 2011; WILEY, 1977; PETTITT, 1977).

O teste de Anderson-Darlin é um teste amplo de função de distribuição empírica para a hipótese nula de normalidade. A estatística do teste é apresentada na Equação 3:

$$A = -n - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (2i - 1) \ln(p_{(i)}) + \ln(1 - p_{(n-i+1)}) \quad (3)$$

Onde,

$$p_{(i)} = \Phi \left(X_{(i)} - \frac{\bar{X}}{S} \right) \quad (4)$$

sendo que Φ é função distribuição acumulada da distribuição normal padrão, e X (média) e S são a média e o desvio padrão dos valores. O p-valor também pode ser calculado pela estatística modificada de acordo com a Equação 5 (RAZALI & WAH, 2011; THAS & OTTOY, 2003):

$$Z = A \left(1 + \frac{0,75}{n} + \frac{2,25}{n^2} \right) \quad (5)$$

2.5.1.2.2 Avaliação da homocedasticidade

A regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) assume que cada nível da faixa tem uma variação absoluta constante (homocedasticidade), entretanto alguns ensaios produzem dados que são heterocedásticos com valor relativo dos erros constante. A verificação da ausência de valores discrepantes e a homocedasticidade dos dados para cada nível de concentração deve ser realizada antes de calcular a equação da regressão linear determinada pelo método dos mínimos quadrados e antes dos resultados serem utilizados para interpretar uma série de dados obtidos. Muitos testes de estatísticos têm sido utilizados para determinar se uma observação deve ser rejeitada dentro de um intervalo estabelecido com uma determinada significância estatística (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; MULHOLLAND & HIBBERT, 1997).

O teste de Cochran é utilizado para verificação de variâncias dos resultados, sendo aplicado para amostras de mesmo tamanho. É um teste unilateral que avalia a maior variância com a soma total das variâncias (ISO 5725-3:1994; AOAC, 2012).

A hipótese nula é verificada pela Equação 6:

$$C = \frac{\max s_i^2}{\sum s_i^2} \quad (6)$$

Onde C é o coeficiente de Cochran e $i = 1, 2, \dots, k$.

Na análise compara-se o valor calculado C com os valores críticos tabelados C_c em teste de 1 ou 5% de significância.

A decisão a ser tomada segue o seguinte critério:

- se $C < C_c$ (no nível de significância de 5%) se aceita a hipótese nula
- se $C_c (1\%) > C > C_c (5\%)$ situação suspeita
- se $C > C_c (1\%)$ rejeita-se a hipótese nula

AOAC (2012) sugere o emprego iterativo do teste de Cochran determinando um limite máximo de exclusão de 22,2% dos dados, por exemplo, 1 valor em 5, 2 valores em 9. Segundo Burke (2011) se mais de 20% dos dados originais for identificado como valor extremo, é importante questionar sobre a distribuição dos dados ou sobre a qualidade dos dados obtidos.

2.5.1.2.3 Avaliação da independência

A autocorrelação é a correlação seriada dos resíduos da regressão. A correlação ocorre quando existe dependência temporal dos valores sucessivos dos resíduos, apresentando correlação entre si. O método dos MMQO assume que os resíduos são independentes. A utilização de dados com autocorrelação afeta a variância das estimativas dos parâmetros obtidos pelo método de mínimos quadrados podendo subestimar a estimativa da variância da regressão e os intervalos de confiança (SOUZA, 2007). A presença de autocorrelação residual piora na eficiência das estimativas dos parâmetros, não apresentando o atributo desejável da variância mínima.

A determinação da autocorrelação de primeira ordem pode ser realizada utilizando o teste de Durbin-Watson que avalia a estrutura ou aleatoriedade dos resíduos da regressão. O teste é muito sensível para verificar a linearidade, mas não ideal para ser aplicado com este propósito. O teste é calculado utilizando a Equação 7.

$$d = \frac{\sum_{i=2}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} \quad (7)$$

Onde o numerador da Equação é a diferença ao quadrado entre resíduos em instantes sucessivos e o denominador é a soma do quadrado dos resíduos (ALI & SHARMA, 1993; SOUZA, 2005). Assumindo que os resíduos e_i são variáveis independentes, a autocorreção entre os resíduos $\rho_s = 0$. Para cada conjunto de dados, existem dois limites críticos, d_L (limite inferior) e d_u (limite superior). Se o valor calculado de d estiver entre estes limites, o teste é inconclusivo. Valores de $d < d_L$ indicam autocorrelação, enquanto que valores de $d > d_u$ indica independência dos resíduos. A comparação com os valores de d_L e d_u são realizados utilizando Tabelas que fornecem os limites, os quais são dependentes do nível de significância, α , do número de pontos e do número de variáveis preditas disponíveis. Os valores limites também podem ser verificados utilizando equações ou gráficos (SOUZA, 2005).

2.5.1.3 Efeito matriz

Efeito matriz é um estudo que objetiva avaliar possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental (BRASIL, 2011). Os diferentes fenômenos potencialmente induzidos pelos componentes da matriz podem afetar drasticamente o desempenho do método em termos de capacidade de detecção, seletividade, repetibilidade, precisão, linearidade de resposta (sinal versus concentração) e limite de quantificação (GOSETTI *et al.*, 2010)

Segundo Rogatski & Stein, (2005) algumas considerações devem ser feitas em relação ao efeito matriz quando à espectrometria de massas for empregada em associação com a cromatografia líquida, uma vez que a matriz pode causar uma supressão na eficiência de ionização e, conseqüentemente, pode ocorrer uma redução na sensibilidade do método.

Na detecção por espectrometria de massa efeitos de interferência da matriz mais frequentemente conduzir a fenomenos de supressão de íons, induzidas pela

presença na matriz de compostos voláteis capaz de alterar a eficiência da formação de gotículas analito (ou evaporação), bem como a quantidade dos íons de analito formados que atinge o detector (ANNESLEY, 2003)

O efeito matriz pode gerar uma elevada recuperação (> 120%) quando comparada com a determinação do padrão em solvente. Por outro lado as diferentes propriedades físico-químicas dos agrotóxicos geram diferentes comportamentos de adsorção no interior de um sistema de cromatografia gasosa, o que pode ser observado como diferentes formas dos picos. Podem ser verificados dois tipos diferentes de problemas como, distorção de pico (incluindo a ampliação e da cauda) ou a degradação térmica que conduz a picos de menor intensidade e, por vezes, o aparecimento de outros picos. Em ambos os casos, o resultado é uma resposta mais baixa na matriz do que no solvente (Rahman *et al.*, 2013).

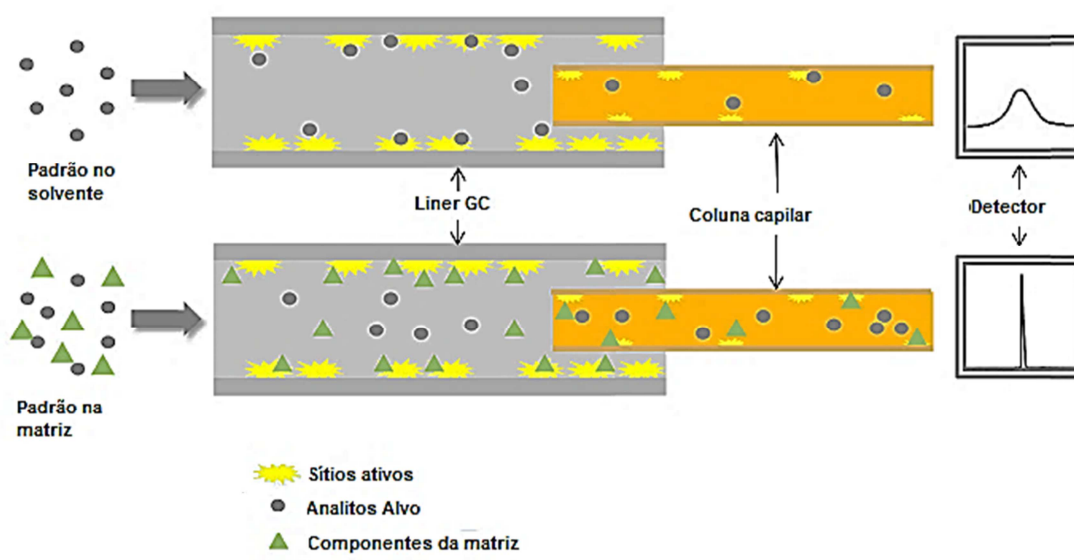


Figura 20 - Esquema do efeito dos interferentes na separação cromatográfica.

Fonte: Rahman *et al.*, 2013

Segundo Pinho e colaboradores (2009) efeito de matriz, além de gerar porcentagens de recuperação superiores a 100%, pode causar outras alterações na análise cromatográfica, como gerar resultado falso negativo, pelo mascaramento do pico do analito de interesse, falso positivo por identificação errônea do analito de interesse e aumento no sinal do detector, levando à superestimação do resultado devido a impurezas são eluídas com mesmo tempo de retenção dos agrotóxicos.

A fim de avaliar o efeito matriz em métodos cromatográficos preparam-se curvas analíticas em solvente e na matriz “branca” da amostra e se realiza a comparação das áreas obtidas. A Equação 8 é utilizada para a realização do cálculo do efeito matriz (SANCO 2013).

$$EfeitoMatriz\% = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (8)$$

Onde:

X1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas no extrato da matriz;

X2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em solvente.

Os valores determinados entre -20% e 20% são considerados diminuição/aumento de sinal, valores entre -50% e -20% ou 20% e 50% tem um efeito médio e um forte sinal de efeito matriz se verifica quando os valores calculados forem -50% ou acima de 50% (KMELLAR *et al.*, 2010).

2.5.1.4 Exatidão

Conforme o VIM (2012) a exatidão está definida como o grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro de um mensurando.

A avaliação da exatidão de um método envolve ensaios com materiais de referência certificados e/ou materiais de referência e/ou amostras fortificadas e amostras brancas (GREEN, 1996; NATA, 1997; AOAC, 2012; EURACHEM, 2000; INMETRO, 2011).

Materiais de referência certificados na área de alimentos são escassos e dispendiosos, em função das dificuldades de preparo dos materiais, homogeneização e garantia da estabilidade durante o transporte e armazenamento. Quando não há material de referência certificado disponível, a utilização de uma amostra branca da matriz de interesse pode ser utilizada adicionando-se quantidades conhecidas do analito na forma de material puro ou de pureza conhecida, para realizar ensaios de recuperação (SOUZA, 2007, INMETRO, 2011, EURACHEM, 2000). Quando não há disponibilidade de se obter

uma amostra livre de contaminação, outra opção é o método da adição padrão, pois estes experimentos permitem o estudo de diferentes tipos de analitos, concentrações e matrizes (GREEN, 1996; SHABIR, 2003; TAVERNIERS *et al.*, 2004). Quando se utiliza amostras fortificadas, sem a presença de um material de referência certificado, é possível avaliar as tendências e efeitos relacionados ao analito adicionado (TAVERNIERS *et al.*, 2004).

A exatidão está relacionada com o erro absoluto de uma medida e é geralmente dependente da concentração do analito, devendo ser determinadas para um diferente número de concentrações (HORWITA, 2003, TAVERNIERS *et al.*, 2004, INMETRO, 2011). A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração, conforme Equação 9 (ANVISA, 2003):

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (9)$$

Para avaliar a exatidão de um método pode-se utilizar as seguintes ferramentas: utilização de materiais de referência certificados, comparação de métodos ensaios, ensaios de recuperação do analito ou adição padrão (RIBANI *et al.*, 2004)

Os ensaios de recuperação são geralmente relatados em porcentagem de recuperação. Para determinações de resíduos e contaminantes em alimentos são aceitos intervalos de recuperação entre 70 e 120%, com precisão de até 20% (SANCO, 2013).

A avaliação de valores extremos deve ser realizada, pois podem ocasionalmente serem obtidos e devem ser rejeitados com o objetivo de garantir que estimativas das médias e dos desvios padrão não estejam contaminadas por erros (SOUZA, 2007). Testes como Dixon e Grubbs, utilizados para verificar a presença de valores extremos, buscam por uma medida da distância relativa de um ponto suspeito e o valor médio, assim como a maioria dos testes buscam por um

único valor, entretanto, algumas vezes é possível que existam mais de um valor extremo em um conjunto de dados (BURKE, 2001). A utilização do teste de Grubbs permite avaliar um valor extremo (G_1), dois valores extremos vicinais (G_2) e dois valores extremos polares (G_3). A forma de cálculo, na literatura, varia, assim como o nível de proteção adotado. HORWITZ (1995) e AOAC (2012) sugerem um nível de significância de 0,025 bilateral, BARRET & LEWIS (1994) e BURKE (2001) indicam 0,10 bilateral ou 0,05 unilateral.

O teste de Grubbs utiliza Equação 10:

$$|G_{calc}| = \frac{(x_i - x_{médio})}{s} \quad (10)$$

Onde:

x_i = valor suspeito de ser aberrante

$x_{médio}$ = média dos valores

s = desvio padrão amostral

Este teste avalia as seguintes hipóteses:

$H_0 = x_i$ é uma observação considerada como valor extremo

$H_1 = x_i$ não é uma observação considerada como valor extremo

Rejeita-se a hipótese H_0 com nível de significância α , se $G > G_c$, sendo G_c um valor crítico baseado na distribuição Z, o qual se encontra tabelado para alguns valores de α (Anexo 2).

2.5.1.4 Precisão

A precisão de um método é a declaração da proximidade da concordância entre resultados de ensaio mutuamente independentes e é normalmente expressa em termos de desvio-padrão porcentual. Ela é geralmente dependente da concentração do analito, e esta dependência deve ser determinada e documentada. A precisão pode ser expressa de diferentes maneiras, dependendo das condições em que for calculada (BRASIL, 2005).

A precisão pode avaliada pelo desvio padrão absoluto (σ), que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20. O que se calcula na prática é a estimativa do desvio padrão absoluto (s), de acordo com a Equação 11, tendo em vista que se utiliza geralmente um pequeno número de determinações (RIBANI *et al.*, 2004).

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (11)$$

Pode-se utilizar ainda o desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*), também conhecido como coeficiente de variação (CV) calculado pela Equação 12.

$$RSD(\%) \text{ ou } CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (12)$$

Os valores do coeficiente de variação dependem da faixa de concentração determinada. As determinações em concentrações macro requerem um RSD de 1 a 2% e análises de traços ou impurezas, dependendo da complexidade da amostra são aceitos RSD de até 20% (SANCO, 2013). Os valores da precisão do método podem ser melhorados aumentando o número de repetições da determinação. O guia ICH recomenda que sejam realizadas nove determinações contemplando toda a faixa de calibração, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta) com amostras em triplicata, ou um mínimo de seis determinações em amostras contendo uma concentração equivalente à concentração média da faixa de calibração (RIBEIRO *et al.* 2008). O INMETRO recomenda que sejam realizadas de sete a nove replicatas para o cálculo do RSD (INMETRO, 2011).

A função de Horwitz apresenta uma generalização muito conhecida do desvio padrão para avaliar a precisão. O “trompete de Horwitz” propõe com base em inúmeros resultados de ensaios interlaboratoriais na área de alimentos que a medida que a concentração do analito decresce em duas ordens de grandeza o desvio padrão aumenta com um fator de dois (HORWITZ, 1982). Embora a função de Horwitz funcione bem independente do analito, matriz e natureza do material

avaliado, o modelo mostra uma deficiência para níveis de concentração extremos (THOMPSON, 2000). Estudos deste autor mostraram desvios padrão de reprodutibilidade sistematicamente menor que os preditos na função de Horwitz para concentrações de analito inferiores a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$.

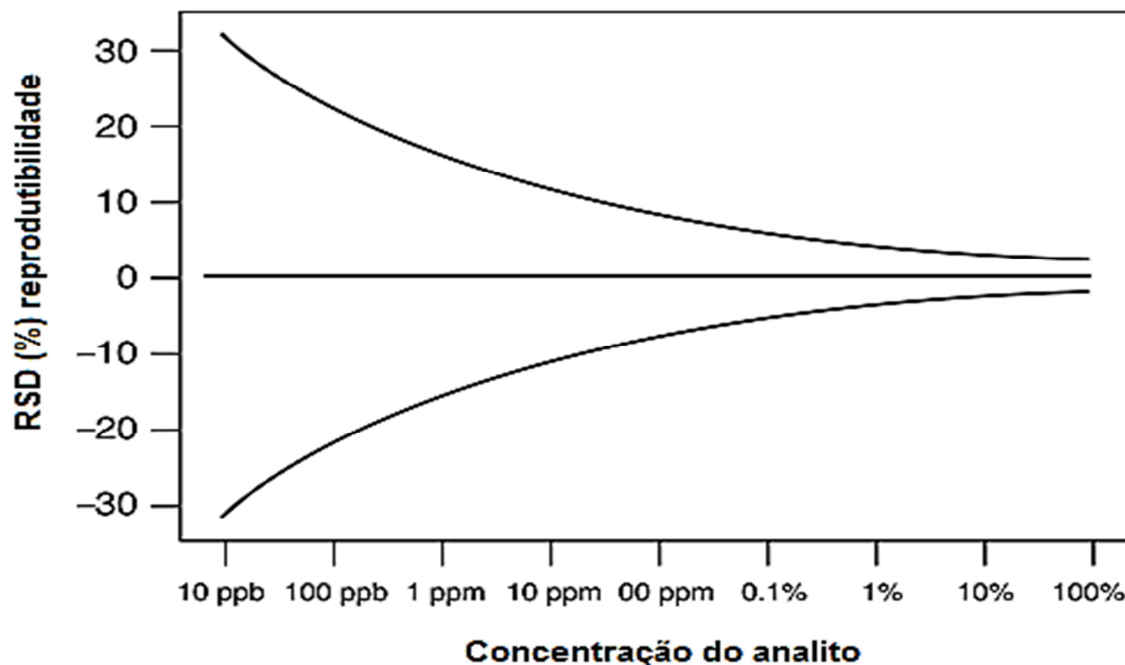


Figura 21 - Curva relacionando coeficiente de variação e concentração do analito. Fonte: Adaptado de Horwitz, 1982

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

Os valores de repetibilidade e reprodutibilidade podem ser comparados com os métodos existentes e se estes são satisfatórios, o método pode ser usado como um método validado. Se não existe um método com o qual comparar os parâmetros de precisão, os valores de repetibilidade e reprodutibilidade teóricos pode ser calculada a partir da Equação (13) de Horwitz.

$$RSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (13)$$

Onde C = a concentração expressa como fração mássica

Tabela 2 – Valores principais para o teste de Horwitz

Fração mássica	Unidade	RSD _R
1	100%	2
0,01	1%	4
0,0001	0,01%	8
0,000001	1 mg L ⁻¹	16
0,00000001	10 µg L ⁻¹	32

Fonte: AOAC, 2012

A função de Horwitz é uma Equação de precisão generalizada independente do analito e da matriz, sendo dependente apenas da concentração para a maioria dos métodos de análise (INMETRO, 2011).

A avaliação dos resultados da precisão é melhor conseguida através da utilização de valores HorRat para dar uma medida da aceitabilidade das características de precisão de um método. Em condições de repetibilidade o valor de HorRat pode ser obtido a partir do RSD(%) dividido pelo RSD_R estimado, conforme Equação 14.

$$\frac{RSD_{(R)} \text{ derivado do estudo colaborativo}}{RSD_{(R)} \text{ previsto da equação de Horwitz}} \quad (14)$$

Se os valores de HorRat forem menores ou iguais a 2, os valores da reprodutibilidade do método podem ser considerados satisfatórios. Os laboratórios devem se assegurar de que os métodos que eles empregam atendem esse critério (INMETRO, 2011, AOAC, 2012).

2.5.1.4.1 Repetibilidade

O termo repetibilidade, ou precisão intracorridas, define a precisão dos resultados obtidos dentro do próprio laboratório, utilizando o mesmo procedimento de medição; o mesmo observador; o mesmo instrumento usado sob mesmas condições. São medições feitas sob condições que podem ser repetidas em curto período de tempo entre as medições e podem ser expressas em termos de RSD

(BRASIL, 2011; ANVISA, 2005; RIBANI *et al.*, 2004). Segundo Anvisa (2005) a repetitividade deve ser verificada a partir de um mínimo de nove determinações contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste.

A AOAC (2012) estabelece que a repetitividade é aplicada para parâmetros calculados de replicatas analisadas simultaneamente, representa a variabilidade dentro do laboratório e pode ser expressa em termos de desvio padrão, variância, coeficiente de variação e desvio padrão relativo. Os valores aceitos para repetitividade podem ser calculados pela equação 15 ou de acordo com a Tabela 3.

$$RSD_r = C^{-0,15} \quad (15)$$

Onde C é a concentração, expressa como a fração mássica.

Tabela 3 – Valores aceitos para repetitividade em função da concentração

Concentração	Repetibilidade (RDS _r)
100%	1
10%	1,5
1%	2
0,1%	3
0,01%	4
10 µg g ⁻¹	6
1 µg g ⁻¹	8
10 µg kg ⁻¹	15

Segundo a AOAC (2012) os valores de aceitabilidade da repetitividade também podem ser calculados pela fórmula de HorRat, sendo que são considerados aceitos valores entre 0,5 e 2.

2.5.1.4.2 Precisão Intermediária

Através da precisão intermediária pode-se avaliar o efeito das variações dentro do laboratório. Os ensaios devem ser conduzidos por diferentes analistas, diferentes dias ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. Este parâmetro de validação representa a variabilidade dos resultados do

laboratório (INMETRO, 2011). A Anvisa recomenda para a determinação da precisão intermediária um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes. A precisão intermediária pode ser expressa através da estimativa do RSD (ANVISA 2003).

O MAPA estabelece que os estudos de precisão intermediária devem ser conduzidos considerando três diferentes níveis de concentração e as determinações devem ser realizadas em 6 repetições. Como critério de aceitação os valores obtidos não podem ser superiores aos valores da Tabela 4.

Tabela 4 – Valores aceitos de coeficiente de variação em função da concentração do analito.

CONCENTRAÇÃO (c)	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (RSD %)
$c < 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	35
$1 \mu\text{g kg}^{-1} \leq c < 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	30
$10 \mu\text{g kg}^{-1} \leq c < 100 \mu\text{g kg}^{-1}$	20
$100 \mu\text{g kg}^{-1} \leq c < 1 \text{mg kg}^{-1}$	15
$1 \text{mg kg}^{-1} \leq c < 10 \text{mg kg}^{-1}$	10
$10 \text{mg kg}^{-1} \leq c < 100 \text{mg kg}^{-1}$	7,3
$100 \text{mg kg}^{-1} \leq c < 1 \text{g kg}^{-1}$	5,3
$1 \text{g kg}^{-1} \leq c < 10 \text{g kg}^{-1}$	3,7
$10 \text{g kg}^{-1} \leq c < 100 \text{g kg}^{-1}$	2,7
$100 \text{g kg}^{-1} \leq c < 1000 \text{g kg}^{-1}$	2,0

O $RSD = u_c(c_{\text{ana}}) / c_{\text{ana}}$, isto é, o coeficiente de variação é igual a incerteza combinada da concentração do analito dividido pela própria concentração do analito.

Fonte: MAPA, 2011

2.5.1.5 Reprodutibilidade

Segundo Anvisa (2005) a reprodutibilidade é um conceito de precisão relacionada a medições feitas sob condições que podem ser reproduzidas: mesmo método; operadores diferentes; laboratórios diferentes; equipamentos diferentes; longo período de tempo entre as medições.

Segundo Ribani (2004) a IUPAC não aconselha tirar conclusões com menos de cinco laboratórios e recomenda oito laboratórios em seu guia atual. Deve-se observar também que os laboratórios possuam competência e habilidade similar aos que utilizarão o método na rotina.

2.5.1.6 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

2.5.1.6.1 Limites de Detecção

O limite de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas (EURACHEM, 1998; BRITO *et al.*, 2003).

O vocabulário Internacional de Metrologia (VIM, 2012) define como: “Valor medido, obtido por um dado procedimento de medição, para o qual a probabilidade de declarar falsamente a ausência de um componente em um material é β , sendo α a probabilidade de declarar falsamente a sua presença”

O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: Método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004 e RIBEIRO *et al.*, 2008).

a) Método visual

Na determinação do limite de detecção utilizando método visual os ensaios são conduzidos utilizando a matriz com (baixas) concentrações conhecidas do analito de interesse, de tal modo que o sinal e o ruído sejam distinguidos visualmente.

b) Método da relação sinal-ruído

Neste método é feita a comparação entre o sinal da amostra com baixa concentração do analito com o de um branco (matriz isenta do composto de interesse). A relação sinal ruído usualmente utilizada na proporção de 3:1. Este método pode ser aplicado somente em procedimentos analíticos que mostram o ruído da linha de base.

c) Método baseado em parâmetros da curva analítica

Para calcular estes dados, uma curva analítica deverá ser feita utilizando a matriz contendo o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção. Utiliza-se a Equação 16 para o cálculo do limite de detecção:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (16)$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da Equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da Equação e S é a inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

2.5.1.6.2 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) é o menor valor de concentração em que o analito pode ser quantificado com certo limite de confiança, ou seja, abaixo deste valor medições não apresentam suficiente confiança para quantificação (THOMPSON *et al.*, 2002).

O LOQ está relacionado com a concentração, a precisão e a exatidão do método. A medida que o LOD decresce diminui a precisão da medida. (RIBANI *et al.* 2004)

O limite de quantificação é a menor concentração ou teor que pode ser quantificada com a maior incerteza aceitável ou Incerteza Máxima Aceitável (I_{max}). Para calcular o LQ usando a Incerteza Máxima Aceitável, procede-se inicialmente ao cálculo da incerteza da medição analítica, devem-se considerar as concentrações mais baixas do analito, a partir do nível mais baixo calibrado, até se encontrar a concentração que atinge a I_{max} (BRASIL, 2011).

Os métodos de determinação do limite de quantificação são semelhantes aos utilizados no cálculo do limite de detecção. Quando se utiliza o método relação sinal-ruído deve-se considerar a relação 10:1. Quando se utiliza o método da curva analítica também se utiliza a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta (s) e a inclinação da curva analítica (S), conforme Equação 17 (RIBANI *et al.*, 2004).

$$LQ = 10x \frac{s}{S} \quad (17)$$

2.5.1.7 Sensibilidade

É a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Sob o ponto de vista prático, a sensibilidade constitui o coeficiente angular do gráfico analítico expresso pela Equação 18 (INMETRO, 2011; BRITO *et al.*, 2003):

$$S = \frac{dy}{dx} \quad (18)$$

Onde: S = sensibilidade;

dy = variação da resposta;

dx = variação da concentração.

Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido. A sensibilidade expressa a capacidade de o analito gerar variação na propriedade medida causada por incremento na concentração ou quantidade do analito (INMETRO, 2011; BRITO *et al.*, 2003).

2.5.1.8 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento. (ANVISA, 2003)

A Anvisa estabelece os seguintes parâmetros para avaliar a robustez relativa o aos ensaios cromatográficos (ANVISA, 2003): Para cromatografia líquida:

variação do pH da fase móvel, variação na composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura, vazão da fase móvel. Para cromatografia gasosa: diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura, velocidade do gás de arraste.

2.5.1.9 Incerteza de Medição

A incerteza de uma medição é um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem com razoabilidade ser atribuídos ao mensurando (EURACHEM/CITAC, 2002).

De acordo com a norma ABNT ISO/IEC 17025:2005 um laboratório de ensaio deve ter e deve aplicar um procedimento para estimar a incerteza de suas medições e quando for estimada a incerteza de medição, todos os componentes de incerteza que sejam importantes para uma determinada situação devem ser considerados usando-se métodos de análise apropriados (ABNT, 2005).

A estimativa da incerteza da medição e a exatidão permite a avaliação da conformidade do resultado bem como a comparabilidade das determinações, sendo uma garantia do resultado da medição no atendimento às normas, legislações e limites legais. Entretanto os dados da incerteza de medição devem ser aplicados cautelosamente para que se evite a falsa sensação de certeza sobre o valor verdadeiro da medição. Estimativas de incerteza típicas são baseadas em dados prévios e podem não refletir a incerteza associada à análise da amostra corrente (SANCO, 2013). Desta forma, deve-se avaliar estimar cuidadosamente as fontes que compõe o cálculo da incerteza.

A incerteza da medição compreende, em geral, muitos componentes. Alguns destes componentes podem ser avaliados a partir da distribuição estatística dos resultados de séries de medições e podem ser caracterizados por desvios padrão. Os outros componentes, que também podem ser caracterizados por desvios padrão, são avaliados pela distribuição de probabilidades convencional, baseada na experiência e em fontes de informação adicionais (EURACHEM/CITAC, 2002).

Para o resultado de uma medição, y , a incerteza total, denominada incerteza padrão combinada e explicitada por $\mu_c(y)$, é um desvio padrão estimado, igual à raiz quadrada positiva da variância, obtida pela combinação de todos os componentes da incerteza através da lei de propagação da incerteza. Esta lei

permite que a incerteza-padrão combinada de um resultado seja prontamente incorporada na avaliação da incerteza-padrão combinada de outro resultado no qual a primeira é utilizada (INMETRO, 2008).

Em química analítica, para a maioria dos fins, deve-se usar a incerteza expandida, U . A incerteza expandida dá um intervalo dentro do qual se crê encontrar-se o valor do mensurando, com um maior grau de confiança. U é obtido pela multiplicação da incerteza padrão combinada, $u_c(y)$, por um fator de expansão k . A escolha do fator k é baseada no grau de confiança desejado. Para um grau de confiança de aproximadamente 95%, k é 2 (EURACHEM/CITAC, 2002).

As contribuições da incerteza para resultados analíticos podem incidir em quatro grupos principais (ANVISA, 2005)

- i) Contribuições da variabilidade aleatória de curta duração, tipicamente estimada a partir de experimentos de repetibilidade.
- ii) Contribuições, tais como: efeitos do operador, incerteza de calibração, erros de escala graduada, efeitos do equipamento e do laboratório, estimativas a partir dos experimentos de reprodutibilidade entre laboratórios, intercomparações internas, resultados de ensaios de proficiência.
- iii) Contribuições fora do escopo dos ensaios interlaboratoriais, tais como incerteza dos materiais de referência.
- iv) Outras fontes de incerteza, tais como: variabilidade da amostragem, falta de homogeneidade da amostra, efeitos de matriz e incerteza derivação do analito.

O Guia para a Expressão da Incerteza de Medição estabelece dois tipos de incerteza: as do tipo A que são aquelas que são avaliadas por métodos estatísticos e as do tipo B as quais que são avaliadas por outros meios (INMETRO, 2008).

Incertezas tipo A são caracterizados pelas variâncias estimadas s_i^2 , (ou pelos “desvios-padrão” estimados, s_i e pelo número de graus de liberdade, ν_i . Onde apropriado, as covariâncias devem ser fornecidas.

Incertezas do tipo B devem ser caracterizadas pelos termos u_j^2 , que podem ser considerados como aproximações das variâncias correspondentes, cuja existência é suposta. Os termos u_j^2 podem ser tratados como variâncias e os termos u_j , como desvios padrão. Quando a incerteza tipo B não for avaliada por observação de dados o julgamento científico é baseado em todas as informações disponíveis sobre a possível variabilidade da variável de entrada. O conjunto de informações pode incluir (ISO GUIA, 2008): dados de medições prévias; experiência com ou conhecimento geral do comportamento e das propriedades de materiais e

instrumentos relevantes; especificações do fabricante; dados fornecidos em certificados de calibração e outros certificados; incertezas atribuídas a dados de referência extraídos de manuais.

2.5.1.9.1 Incerteza-padrão combinada

Incerteza-padrão do resultado de uma medição, quando este resultado é obtido por meio dos valores de várias outras grandezas, sendo igual à raiz quadrada positiva de uma soma de termos, que constituem as variâncias ou covariâncias destas outras grandezas, ponderadas de acordo com o quanto o resultado da medição varia com mudanças nestas grandezas (ISO GUIA, 2008). O cálculo é realizado de acordo com a equação 19.

$$u_C = \sqrt{u(S_r)^2 + u(S_e)^2 + u(rec)^2 + u(preparo\ da\ amostra)^2 + u(preparo\ do\ padrão)^2} \quad (19)$$

2.5.1.9.2 Incerteza expandida

Quantidade que define um intervalo em torno do resultado de uma medição com o qual se espera abranger uma grande fração da distribuição dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando (ISO GUIA, 2008). Para associar um nível da confiança específico ao intervalo definido pela incerteza expandida são necessárias suposições explícitas ou implícitas com respeito à distribuição de probabilidade caracterizada pelo resultado da medição e sua incerteza-padrão combinada, calculada conforme a equação 20.

$$U = u_c \cdot k \quad (20)$$

Onde:

u_c = incerteza combinada

k = fator de abrangência ($k=2$), baseado no teste t de Student

2.5.1.9.3 Distribuição de probabilidade

Alguns tipos mais frequentes de distribuição de probabilidade para fontes de incerteza tipo B, de acordo com ISO GUIA, 2008 são:

a) **Distribuição de probabilidade normal:** Uma grandeza de entrada possui uma distribuição de probabilidade normal quando existir uma maior probabilidade de seus valores ocorrerem próximos a média e com simetria em relação à média. É a mais importante e mais utilizada. Uma distribuição de probabilidade normal abrange, quando se considera dois desvios padrão aproximadamente 95,45% da distribuição.

b) **Distribuição de probabilidade triangular:** Uma grandeza de entrada possui uma distribuição de probabilidade triangular quando for possível estimar suas fronteiras, ou seja os limites inferiores e superiores da dispersão dos valores e afirma-se que há maior probabilidade de que o valor verdadeiro esteja no centro desse intervalo, sendo que a probabilidade decai linearmente para os extremos.

c) **Distribuição de probabilidade retangular:** Quando a grandeza de entrada somente permite estimar suas fronteiras, ou seja, os limites inferiores e superiores da dispersão dos valores sem ter informações suficientes para estimar o valor da probabilidade dentro do intervalo.

d) **Distribuição de probabilidade biomodal ou em forma de U:** Aplicada quando somente é possível estimar as fronteiras do valor de uma grandeza de entrada e afirmar que há uma maior probabilidade que o valor verdadeiro esteja nos extremos dos intervalos.

2.5.1.10 Divisores

Os divisores utilizados para transformar as fontes de incerteza em fonte de incerteza padrão dependem da distribuição de probabilidade e do tipo de fonte de incerteza. A aplicação de divisores visa transformar aquela fonte inicial de incerteza em um desvio padrão. Os valores utilizados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Divisores e distribuição de probabilidade

Tipo de fonte de incerteza	Distribuição de probabilidade	Divisor
Desvio padrão experimental (tipo A)	Normal	\sqrt{n} Onde n = número de repetições realizadas
Desvio padrão de R&R	Normal	1
Desvio padrão de cartas controle	Normal	1
Incerteza do padrão de referência do sistema de medição (tipo B)	Normal	κ Onde κ é o fator de abrangência expresso no certificado de calibração do padrão
Demais fontes de incerteza tipo B	Retangular	$\sqrt{3}$
	Triangular	$\sqrt{6}$
	Bimodal	$\sqrt{2}$

Fonte: Inmetro, 2003

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e no Laboratório de Cromatografia do Centro de Pesquisa em Alimentação (Cepa) da Universidade de Passo Fundo (UPF). Foram realizadas avaliações de diferentes técnicas de preparo de amostra para a extração de resíduos de agrotóxicos em amostras de trigo. Posteriormente foi realizada a otimização e validação do procedimento proposto. Foram utilizadas as técnicas de cromatografia líquida à espectrometria de massas em Série (LC-MS/MS) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em Série (GC-MS/MS).

3.1 Instrumentação

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram: Sistema GC-MS/MS equipado com: cromatógrafo a gás GC-MS TQ 8030; amostrador automático AOC-20j; analisador de massas tipo triplo quadrupolo (Shimadzu, Japão).

- Sistema LC-MS/MS equipado com: cromatógrafo líquido LC 8040, amostrador Nexera, analisador de massas tipo triplo quadrupolo (Shimadzu, Japão);
- Agitador vórtex – Quimis, modelo 220.2 (Quimis, Brasil)
- Balança analítica de precisão, modelo SV-200 (Shimadzu, Japão);
- Balança analítica de precisão, modelo AUW-220 (Shimadzu, Japão);
- Centrífuga refrigerada, modelo NT 825 (Nova técnica, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha e Eppendorf, Canadá);
- Sistema de purificação de água Milli-Q® (Millipore, EUA);
- Desruptor de célula ultra-sônico, 500 W, 20 kHz, com microponeta de titânio de 4 mm (Unique, Brasil)
- Ultrafreezer CL 120 80V, (Coldlab, Brasil)

3.2 Condições utilizadas nos sistemas cromatográficos

3.2.1 Condições utilizadas no sistema LC-MS/MS

As condições utilizadas no sistema LC-MS/MS para o desenvolvimento do método e análise dos agrotóxicos estudados em amostras de trigo estão descritas a seguir.

- Cromatografia em fase reversa utilizando coluna analítica XR-ODS III (150 x 2,0 mm x 2,2 μm), marca Shimadzu;
- A fase móvel utilizada teve como referência o pacote de método do fornecedor LC/MS/MS *Method Package* e constituída de: Fase móvel A: acetato de amônio 5 mmol L⁻¹ e B: metanol com 5 mmol L⁻¹ de acetato de amônio

Tabela 6 - Gradiente da fase móvel utilizado para a eluição dos compostos.

Tempo (min)	% A	% B
1,70	60	40
3,00	50	50
4,00	45	55
9,50	5	95
13,51	85	15
15,00	85	15

- Vazão da fase móvel: 0,3 mL min⁻¹; Volume de injeção: 10 μL ; Fonte de ionização: ESI; Analisador de massas do tipo triplo quadrupolo, operando no modo MS/MS; Tempo da análise cromatográfica: 15 min; Temperatura da coluna: 40 °C; Voltagem capilar: 4,5 kV; Temperatura de dessolvatação: 400 °C; Vazão do gás de dessolvatação (N₂): 600 L h⁻¹; Vazão do spray: 80 L h⁻¹; Vazão do gás colisão (Argônio): 0,10 mL min⁻¹; Temperatura da fonte: 150 °C.

A espectrometria de massas em série foi utilizada para a operação do equipamento, no modo de varredura SRM e ionização por eletronebulização no modo positivo.

Utilizaram-se as condições do pacote de método LC-MS/MS *Method Package*, onde estão as condições cromatográficas tais como os íons precursores e íons produtos, as energias de colisão e as energias do cone.

Para os compostos ausentes neste banco de dados, foram realizadas injeções dos padrões individualmente, sem a coluna cromatográfica, a fim de determinar as melhores condições do analisador de massas. Para estas

otimizações foi utilizada solução analítica na concentração de $250 \mu\text{g L}^{-1}$. A partir destas injeções foram definidos os íons característicos de cada composto estudado, os quais foram monitorados no modo SRM no quadrupolo (Q1) e no quadrupolo (Q3) foi realizada a varredura do íon produto. O modo de ionização da fonte utilizado foi eletronebulização positiva, em função das características dos analitos, voltagem do capilar, energias de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos. Em seguida, foram avaliadas as transições, no modo SRM a serem utilizadas para a quantificação (transição de maior intensidade) e confirmação (transição de segunda maior intensidade) dos compostos estudados e estes dados foram inseridos no banco de dados LC-MS/MS *Method Package*. Posteriormente, realizou-se a análise de uma solução analítica contendo todos os agrotóxicos na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ preparada em acetonitrila, a fim de verificar o tempo de retenção dos analitos e a intensidade do sinal analítico.

3.2.2 Condições utilizadas no sistema GC-MS/MS

As condições utilizadas no sistema GC-MS/MS para o desenvolvimento do método e análise dos agrotóxicos estudados em amostras de trigo estão descritas a seguir.

- Coluna cromatográfica RTX – 5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm ; Software: GSMS solution versão 4.11; Analisador de massas: espectrométrico de massas tipo triplo quadrupolo; Temperatura do injetor: $250 \text{ }^\circ\text{C}$; Volume de injeção $1,0 \mu\text{L}$ (splitless); Programação da temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de $120 \text{ }^\circ\text{C}$ (1,0 min), com incremento de temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até $280 \text{ }^\circ\text{C}$ (4,17 min); logo após um incremento de $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até $300 \text{ }^\circ\text{C}$; Vazão do gás de arraste (Hélio) constante em $0,8 \text{ mL min}^{-1}$; Tempo total de corrida: 30 min; Temperatura de *transferline*: $300 \text{ }^\circ\text{C}$; Ionização por impacto por elétrons; Voltagem 70 eV ; Temperatura da fonte de ionização: $200 \text{ }^\circ\text{C}$; Modo de aquisição MS/MS;

3.3 Materiais utilizados

Os materiais utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram: Filtros de nylon de 13 mm de diâmetro e $0,2 \mu\text{m}$ de tamanho de poro (Vertical Chromatography, Tailândia); Frascos de vidro (vial), capacidade de 4,0, 2,0 e 0,2 mL; Ponteiras de polipropileno com capacidade de $200 \mu\text{L}$, 1 mL e 10 mL (Brand,

Alemanha); Tubos de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha); Vidrarias de laboratório em geral.

3.4 Solventes, reagentes e gases

Os solventes, reagentes e gases utilizados neste trabalho: acetato de sódio anidro p.a. (J.T. Baker, EUA); acetona 99,5% ACS (Tedia, EUA); acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt, EUA); ácido acético glacial 99,9% (Merck, Brasil); ácido fórmico, grau HPLC (Audaz, Brasil) água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q® (resistividade de $18,2 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$) (Millipore, EUA); cloreto de sódio p.a. (Merck, Brasil); detergente Detertec® neutro (Vetec, Brasil); gás argônio usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS e GC-MS/MS com 99,9999% de pureza (Air Products, Brasil); hexano p.a. 98,5% (Caledon, Canadá); metanol grau HPLC (J.T. Baker, EUA); sorvente Bondesil C18 com tamanho de partícula de $40 \mu\text{m}$ (Agilent, EUA); sorvente Bondesil PSA com tamanho de partícula de $40 \mu\text{m}$ (Agilent, EUA); sulfato de magnésio anidro p.a. (J.T. Baker, EUA).

3.5 Agrotóxicos selecionados

Os agrotóxicos selecionados para este estudo são compostos comumente utilizados na agricultura, para a cultura do trigo e previstos na Instrução Normativa nº 18, de 25 de junho de 2013. Estes compostos foram adquiridos da companhia Dr. Ehrenstorfer (Ausburg, Alemanha). A Tabela 7 lista os agrotóxicos utilizados neste estudo e a técnica cromatográfica utilizada na determinação analítica. As informações referentes à classe química, grupo químico e fórmula molecular e fórmula estrutural de cada composto estudado está apresentada no APÊNDICE A.

Tabela 7 – Agrotóxicos utilizados neste estudo.

(continua)

Agrotóxicos determinados por LC-MS/MS			Agrotóxicos determinados por GC-MS/MS
Abamectina	Diclofluanida	Picloram	Bifentrina
Acetamiprido	Dimeoato	Omeoato	Bromofós etílico
Ametrina	Diuram	Propoxur	Carbofenotion
Atrazina	Diflubenzuron	Procloraz	Ciflutrina
Aramita	Epoxiconazol	Profenofos	Cipermetrina

Azaconazol	Etiprole	Simazina	Ciproconazole
Azimetifós	Etoprofos	Terbufos	Dicrotofós
Azinfos metílico	Finarimol	Tebuconazol	Dimetenamid-p
Azoxistrobina	Flutriafol	Tiabendazol	Fenbuconazole

Tabela 7 – Agrotóxicos utilizados neste estudo.

(conclusão)

Agrotóxicos determinados por LC-MS/MS			Agrotóxicos determinados por GC-MS/MS
Benfuracarbe	Forato	Tiacloprido	Fenvalerato
Boscalida	Imidacloprido	Tiametoxan	Iprodiona
Buprofezina	Indoxacarb	Tiodicarb	Mepronil
Carbendazin	Linurom	Tolcofos metílico	Metconazol
Carbofurano	Malationa	Triadimenol	Parationa metílica
Carboxina	Metsulfuron metílico	Triazofos	Pendimetalin
Carbosulfano	Monocrotofós	Triciclazole	Pirimetaniil
Clorimuron etílico	Monolinurom	Trifloxistrobina	Pirimicarb
Clorpirifós etílico	Metamidofós	Triflumizol	Pirimifós metílico
Clorpirifós metílico	Metomil	Triflumurom	
Cresoxim metílico	Pirazofos	Triticonazol	

3.6 Seleção do padrão interno e do padrão de controle

A utilização do padrão interno e do padrão de controle tem como objetivo verificar fontes de erros, bem como melhorar a robustez de métodos, uma vez que corrige vários fatores dentro de um procedimento analítico que pode ter um impacto sobre os resultados da análise. A utilização de padrões em diferentes fases do procedimento analítico permite verificação da correta execução da extração e análise de cada amostra. Os compostos que são adicionados antes da etapa de extração são denominados Padrão de Controle (PC) e aqueles adicionados no extrato final, imediatamente antes da injeção são denominados Padrão Interno (PI) (SANCO, 2013).

O trifenilfosfato (TPP, do inglês *triphenyl phosphate*) foi utilizado como padrão interno na concentração de 20 µg L⁻¹ e linurom deuterado (linurom- d6), nas análises por LC-MS/MS, como padrão de controle nas mesmas concentrações empregadas para a avaliação dos ensaios de recuperação. A quantificação foi realizada utilizando calibração externa. O padrão interno foi utilizado somente para verificação da resposta do equipamento, não sendo utilizado para quantificação.

O Padrão de controle, do inglês *surrogate*, é definido como um composto puro adicionado ao material de análise, no qual, o comportamento químico e físico é representativo da substância de interesse na forma nativa. O padrão é transferido para a amostra e pode não estar efetivamente no mesmo equilíbrio que se encontra na forma nativa, portanto a determinação da recuperação do padrão de substituição realiza-se fazendo uma “correção de recuperação” para a substância de interesse, é por esta razão, chamado de padrão de substituição (RIBANI *et al.*, 2004). O padrão de substituição ideal deve ser comportar de forma similar aos analitos durante toda a determinação analítica, incluindo a extração, separação cromatográfica e análise pela espectrometria de massas. O isótopo modificado de algum analito tem sido utilizado, pois possuem massas suficientemente diferentes para serem determinados por cromatografia acoplada à espectrometria de massas (JEMAL, 2003). Neste trabalho foi utilizado linurom deuterado como padrão de substituição. O padrão foi adicionado na concentração de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em todas as amostras utilizadas no estudo na etapa de fortificação.

3.7 Preparo das soluções analíticas

Preparou-se inicialmente as soluções analíticas na concentração de 1000 mg L^{-1} em acetonitrila, de cada principio ativo, individualmente. Foi medida a massa de todos os reagentes sólidos, considerando seu grau de pureza. As soluções foram preparadas em balão volumétrico e foram agitadas em vórtex por 1 minuto para completa dissolução. A partir das soluções de concentração 1000 mg L^{-1} , preparou-se 50 mL de uma solução de trabalho na concentração 5 mg L^{-1} contendo todos os analitos. Esta solução foi utilizada para o estudo da linearidade do método e para os ensaios de fortificação. A partir da mistura 5,0 mg L^{-1} , foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações de 2; 5; 10; 20; 50; 70; 100; 150; 200 e 250; $\mu\text{g L}^{-1}$ em acetonitrila:água (70:30) v/v e no extrato da matriz avaliada.

A solução do padrão interno TPP utilizado foi preparada na concentração de 1000 mg L^{-1} . Em seguida foram preparados 10 mL de uma solução na concentração de 10 mg L^{-1} contendo apenas TPP. A partir dessa solução preparou-se uma solução na concentração 1,0 mg L^{-1} , a qual foi adicionada 20 μL ao extrato final para injeção. Todas as soluções analíticas foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura menor que $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo que antes de serem utilizadas as

soluções foram retiradas do freezer e esperou-se que estas atingissem a temperatura ambiente para utilização.

3.8 Amostra de trigo

A amostra de trigo utilizada no trabalho foi fornecida pela Cooperativa de Prestação de Serviços Técnicos (Coptec) de São Miguel das Missões-RS. A amostra foi triturada em moinho de facas e armazenada em freezer até o momento da utilização. A amostra foi caracterizada pelo laboratório de Físico-Química da Universidade de Passo Fundo e se obteve os seguintes resultados: umidade 12,98 g/100 g, proteína 13,80 g/100 g, lipídios 1,56 g/100 g, resíduo mineral fixo 1,49 g/100 g, fibra alimentar 15,60 g/100 g. Foi determinada também a capacidade de retenção de água (CRS) da amostra de trigo a fim de se definir a quantidade de água a ser adicionada no trigo para posterior análise, a fim de garantir uma umectabilidade mínima para favorecer a extração dos analitos. Para isso foi realizado o ensaio de determinação da capacidade de retenção de solvente na amostra utilizada no estudo. A capacidade de retenção de água está associada a todos os constituintes do trigo e determina a capacidade da matriz absorver e reter hidrodinamicamente, capilarmente e fisicamente a água. Os resultados do ensaio de capacidade de retenção de água são indicados em percentagem da massa do gel após a exposição ao solvente dividida pela massa original da amostra (WALKER, 2008; TRAYNHAM, 2007). O método também considera a umidade da amostra e é determinado com base em 14% de umidade e é calculado conforme Equação 21 (AACC, 2000).

$$CRS (\%) = \left(\left(\frac{\text{Massa do gel}}{\text{Massa da farinha}} \right) \times \left(\frac{86}{100 - \text{umidade da farinha}} \right) - 1 \right) \times 100 \quad (21)$$

O ensaio determinou que a capacidade de retenção de água da amostra de trigo é de 78,25 g /100 g, isto significa que 100 g de amostra de trigo saturam com a adição de 78,25 mL de água. Assim, foram utilizados 10 mL de água para 10 g de amostra de trigo moído.

A partir do extrato do branco da matriz foi determinada a concentração de matéria seca ou extrato seco a fim de avaliar a concentração de sólidos totais

presente. O ensaio foi realizado utilizando 2 mL de extrato, o qual foi seco a 105 °C por 2 h. Foi determinada a quantidade de sólidos de 0,35 g/100 g.

3.9 Estudo de diferentes procedimentos de extração

Este estudo foi realizado utilizando amostras “branco” de trigo, fortificadas na concentração 150 µg kg⁻¹ e cada ensaio foi realizado em triplicata. Após a fortificação, as amostras foram mantidas em repouso por 1 hora antes de realizar o procedimento de extração (PRESTES *et al.*, 2011).

Foram também avaliados diferentes solventes para extração dos compostos em estudo, baseado no trabalho de Li *et al.* (2013). Com base na literatura, diferentes técnicas de extração foram utilizadas: para agitação do extrato foi utilizado vórtex e ultrassom, baseado nos trabalhos de Gonzalez-Curbelo *et al.*, (2013) e Granby *et al.*, (2004). Para partição foi avaliada a utilização de ultracongelamento em comparação com a utilização de sais (WALORCZYK & DROZDZYNSKI, 2012). O estudo de limpeza do extrato foi realizado utilizando C18 e PSA. A Figura 22 mostra o fluxograma dos procedimentos avaliados.

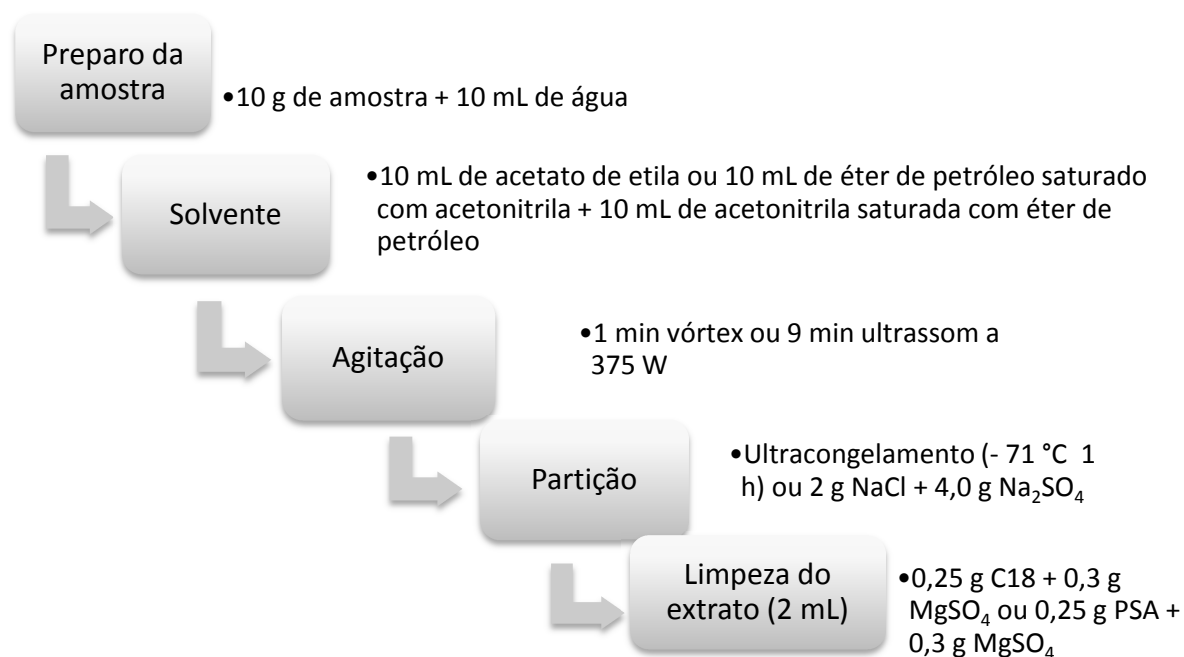


Figura 22 – Fluxograma dos fatores e níveis do planejamento fatorial do método estudado.

Para avaliação dos procedimentos de extração foi realizado o planejamento fatorial 2^4 . A Tabela 8 apresenta as variáveis reais e codificadas no planejamento fatorial e os níveis de cada variável, sendo que as variáveis estão definidas em dois níveis normalizados como (1) e (-1) e a Tabela 9 apresenta o detalhamento de cada procedimento.

Tabela 8 - Variáveis reais e codificadas avaliadas através do planejamento fatorial 2^4 e os níveis de cada variável.

Código das variáveis (X_i)	Fatores (F_i)	Níveis	
		Valor mínimo (- 1)	Valor máximo (+ 1)
X_1	$F_1 =$ solvente	Acetato de etila	10 mL de éter de saturado com acetonitrila + 10 mL de acetonitrila saturada com éter de petróleo
X_2	$F_2 =$ agitação	9 min ultrassom a 375 W	1 min vórtex
X_3	$F_3 =$ partição	Ultracongelamento (- 71 °C 1 h)	2 g NaCl + 4,0 g Na_2SO_4
X_4	$F_4 =$ limpeza (2 mL)	0,25 g C18 + 0,3 g MgSO_4	0,25 g PSA + 0,3 g MgSO_4

Tabela 9 - Planejamento fatorial para as diferentes técnicas de extração

NÚMERO	SOLVENTE	AGITAÇÃO	PARTIÇÃO	LIMPEZA (2 mL do extrato)
1	10 mL de Acetato de etila	9 min de Ultrassom a 375 W	2 g de NaCl + 4,0 g de Na ₂ SO ₄	0,25 g de C18 + 0,3 g de MgSO ₄
2	10 mL de éter de saturado com acetonitrila + 10 mL de acetonitrila saturada com éter de petróleo	9 min de Ultrassom a 375 W	2 g de NaCl + 4,0 g de Na ₂ SO ₄	0,25 g de C18 + 0,3 g de MgSO ₄
3	10 mL de Acetato de etila	1 min agitador Vórtex	2 g de NaCl + 4,0 g de Na ₂ SO ₄	0,25 g de C18 + 0,3 g de MgSO ₄
4	10 mL de éter de saturado com acetonitrila + 10 mL de acetonitrila saturada com éter de petróleo	1 min agitador Vórtex	2 g de NaCl + 4,0 g de Na ₂ SO ₄	0,25 g de C18 + 0,3 g de MgSO ₄
5	10 mL de Acetato de etila	9 min de Ultrassom a 375 W	Congelamento (1 h a - 71 °C)	0,25 g de C18 + 0,3 g de MgSO ₄
6	10 mL de éter de saturado com acetonitrila + 10 mL de acetonitrila saturada com éter de petróleo	9 min de Ultrassom a 375 W	Congelamento (1 h a - 71 °C)	0,25 g de C18 + 0,3 g de MgSO ₄
7	10 mL de Acetato de etila	1 min agitador Vórtex	Congelamento (1 h a - 71 °C)	0,25 g de C18 + 0,3 g de MgSO ₄
8	10 mL de éter de saturado com acetonitrila + 10 mL de acetonitrila saturada com éter de petróleo	1 min agitador Vórtex	Congelamento (1 h a - 71 °C)	0,25 g de C18 + 0,3 g de MgSO ₄
9	10 mL de Acetato de etila	9 min de Ultrassom a 375 W	2 g de NaCl + 4,0 g de Na ₂ SO ₄	0,25 g de PSA + 0,3 g de MgSO ₄
10	10 mL de éter de saturado com acetonitrila + 10 mL de acetonitrila saturada com éter de petróleo	9 min de Ultrassom a 375 W	2 g de NaCl + 4,0 g de Na ₂ SO ₄	0,25 g de PSA + 0,3 g de MgSO ₄
11	10 mL de Acetato de etila	1 min agitador Vórtex	2 g de NaCl + 4,0 g de Na ₂ SO ₄	0,25 g de PSA + 0,3 g de MgSO ₄
12	10 mL de éter de saturado com acetonitrila + 10 mL de acetonitrila saturada com éter de petróleo	1 min agitador Vórtex	2 g de NaCl + 4,0 g de Na ₂ SO ₄	0,25 g de PSA + 0,3 g de MgSO ₄
13	10 mL de Acetato de etila	9 min de Ultrassom a 375 W	Congelamento (1 h a - 71 °C)	0,25 g de PSA + 0,3 g de MgSO ₄
14	10 mL de éter de saturado com acetonitrila + 10 mL de acetonitrila saturada com éter de petróleo	9 min de Ultrassom a 375 W	Congelamento (1 h a - 71 °C)	0,25 g de PSA + 0,3 g de MgSO ₄
15	10 mL de Acetato de etila	1 min agitador Vórtex	Congelamento (1 h a - 71 °C)	0,25 g de PSA + 0,3 g de MgSO ₄
16	10 mL de éter de saturado com acetonitrila + 10 mL de acetonitrila saturada com éter de petróleo	1 min agitador Vórtex	Congelamento (1 h a - 71 °C)	0,25 g de PSA + 0,3 g de MgSO ₄

3.10 Validação do método para análise de agrotóxicos em grãos de trigo

Para a validação do método analítico foram utilizados os seguintes parâmetros (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003; SANCO, 2013, AOAC, 2012):

Seletividade,

- Curva analítica, considerando as premissas de normalidade, homocedasticidade,
- faixa linear e independência dos resíduos;
- Efeito matriz,
- Exatidão;
- Precisão (repetibilidade e precisão intermediária),
- Limite de detecção do instrumento (LOD_i) e do método (LOD_m) e
- Limite de quantificação do instrumento (LOQ_i) e do método (LOQ_m)
- Estimativa da incerteza da medição

O Plano de validação está demonstrado no na figura 23. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Microsoft Excel[®].

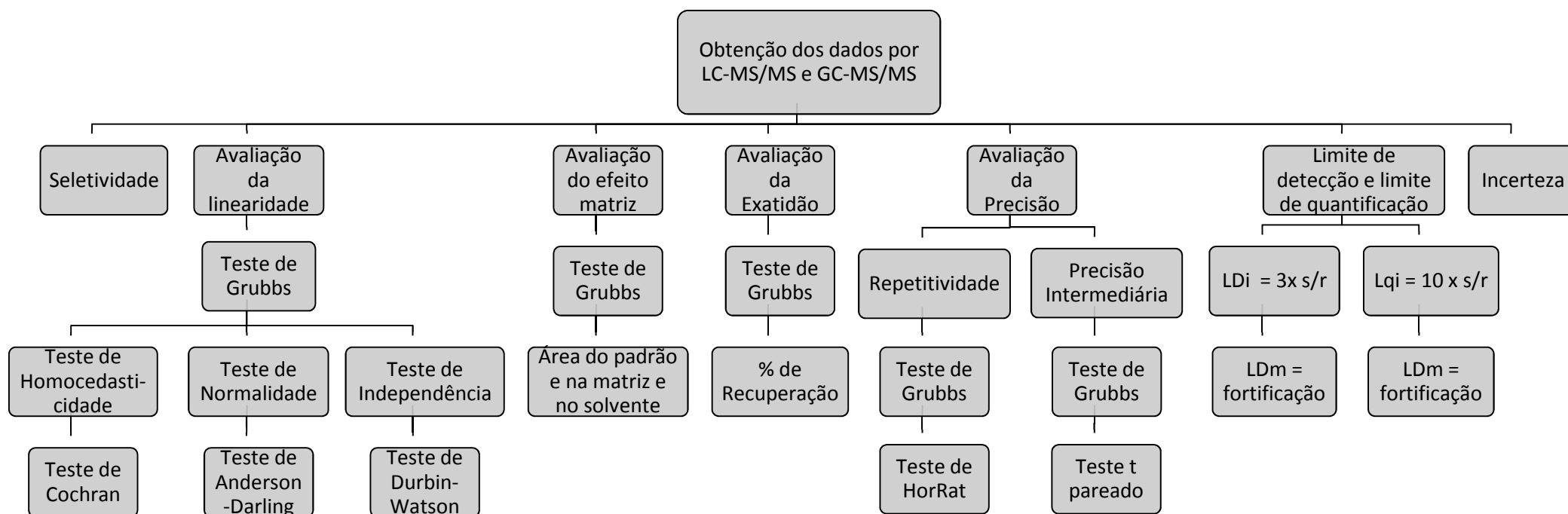


Figura 23 – Fluxograma da avaliação dos parâmetros de validação.

3.10.1 Seletividade

A avaliação da seletividade foi realizada através da avaliação os cromatogramas dos extratos da matriz isenta de agrotóxicos. A ausência de picos nos “brancos” evidencia a seletividade do método.

3.10.2 Curva analítica e faixa linear

A curva analítica foi obtida a partir das soluções analíticas, contendo os agrotóxicos em estudo, preparadas de acordo com o item 3.7, tanto em solvente, quanto no extrato da matriz trigo nas concentrações 2; 5; 10; 20; 50, 70, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g L}^{-1}$.

As soluções para obtenção das curvas analíticas foram injetadas em triplicata e posteriormente, foram realizados os cálculos da média das áreas e do RSD. A avaliação da normalidade da distribuição dos resíduos foi determinada utilizando o teste de Anderson-Darling. O teste de Anderson-Darling é um teste amplo de função empírica para a hipótese nula de normalidade (RAZALI & WAH, 2011; PETTITT, 1977).

Os parâmetros da regressão foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários e gráficos dos resíduos (erros) da regressão foram construídos e examinados para investigação de perfis que demonstrassem heterocedasticidade ou desvio de linearidade, sendo indicados como valores extremos (*outliers*) utilizando o teste de Cochran (ISO 5725-3; AOAC, 2012). A homocedasticidade dos pontos da curva foi avaliada considerando 5% de significância. O valor de referência para o teste é de 0,6530, considerando que foram utilizados para o teste dez pontos analisados em três repetições. A determinação da autocorrelação de primeira ordem, ou independência dos resíduos, foi realizada utilizando o teste de Durbin-Watson que avalia a estrutura ou aleatoriedade dos resíduos da regressão (ALI & SHARMA, 1993; SOUZA, 2005). A faixa linear foi estabelecida considerando a menor e a maior concentração excluindo-se os pontos que não atenderam os critérios de aceitação para os testes aplicados.

3.10.3 Efeito matriz

Foram preparadas curvas analíticas em solvente e no extrato “branco” da matriz e realizou-se a comparação das áreas obtidas para a avaliação do efeito matriz.

As curvas foram preparadas em dez níveis de concentração e injetadas no sistema cromatográfico em triplicata. O preparo e leitura das curvas em solvente e matriz foram realizadas no mesmo dia, em condições similares. A Equação 8 foi utilizada para a realização do cálculo do efeito matriz (GOSETTI *et al.*, 2010; SANCO, 2010).

Deste modo, é possível verificar se a matriz exerce efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (diminuição de sinal) sobre o resultado da análise. Segundo GOSETTI *et al.*, (2010) e FERRER *et al.*, (2011), o efeito matriz começa a exercer influência nas análises quando o resultado for acima de 20%.

3.10.4 Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão

Para avaliar a exatidão, o preparo da amostra foi realizado utilizando o procedimento que apresentou melhores resultados de recuperação definido através do tratamento estatístico. Sendo assim, foi pesado $10 \pm 0,05$ g de amostra de trigo moído em moinho de facas, diretamente em tubos de polipropileno com tampa rosqueável (capacidade de 50 mL), adicionou-se 10 mL de água e efetuou-se a fortificação com a mistura dos agrotóxicos estudados, nas concentrações de 10; 20; 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, adicionando para isso, respectivamente, 25; 40; 100 e 200 μL de uma solução analítica 5 mg L^{-1} . Os tubos contendo o trigo fortificado foram agitados por 9 min com sonda de ultrassom e posteriormente congelados na temperatura de -71 °C por 30 min. Após os extratos foram centrifugados a 3400 rpm durante 5 minutos. Foi retirado 2 mL de cada extrato e realizado cleanup com 0,250 g de C18 e 0,300 g de sulfato de magnésio. Os extratos foram agitados por 1 min, centrifugados a 3400 rpm por 5 min e posteriormente filtrados. Para as determinações cromatográficas foi adicionado 20 μL do padrão interno na concentração 1 mg L^{-1} .

Os ensaios de fortificação foram realizados utilizando a amostra “branco”, isto é, livre da presença dos agrotóxicos em estudo. Este procedimento foi utilizado para avaliar a exatidão do método, pela recuperação dos compostos em estudo.

O procedimento de extração das amostras fortificadas foi realizado em 8 repetições para cada um dos níveis de fortificação (10,0; 20,0; 50,0 e 100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e cada nível foi injetado uma vez, obtendo-se 8 replicatas. O cálculo de recuperação foi realizado de acordo com a Equação 22, conforme recomendações do guia de validação do INMETRO (2011).

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (22)$$

Onde:

C1= Concentração determinada na amostra fortificada;

C2= Concentração determinada na amostra não fortificada;

C3= Concentração teórica.

A eficiência da recuperação foi comparada com os resultados obtidos na extração utilizando o método QuEChERS, validado no LARP, aplicado para trigo. O método consiste na utilização de 10 g do *slurry* (3:2, amostra: água) fortificada na concentração de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 10 mL de acetonitrila acidificada com 1% de ácido acético como solvente extrator. As amostras foram agitadas por 1 min em vórtex. Após foi adicionado às amostras 4,0 g de MgSO_4 e 1,7 g CH_3COONa , sendo então agitadas por 1 min manualmente. A seguir as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 8 min. 2 mL do sobrenadante foi retirado e transferido para um tubo de 15 mL onde foi adicionado 0,300 g MgSO_4 e 0,250 g C18, sendo agitadas em vórtex por 1 min. Após as amostras foram novamente centrifugadas a 3500 rpm por 8 min quando então foram filtradas com filtros de 0,2 μm de diâmetro e injetadas nos sistemas cromatográficos.

3.10.5 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

Para avaliar a precisão do método, em termos de repetibilidade (RSD_r), foram realizadas oito extrações de cada nível de fortificação (10,0; 20,0; 50,0 e 100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e cada extrato foi injetado uma vez ($n = 8$).

Os resultados obtidos foram inicialmente avaliados utilizando o teste de Grubbs a fim de verificar a presença de valores extremos (GRUBBS, 1969; BURKE, 2001). Foi utilizado o teste para um valor extremo (G_1) ou dois valores extremos (G_2). A indicação de valor extremo por um dos testes foi suficiente para remoção do dado. O teste de Grubbs foi aplicado até que novos valores não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22,2% no número original de resultados (HORWITZ, 1995).

Para determinar a precisão, em termos de repetitividade, a qual foi calculada através do desvio padrão relativo (RSD), utilizou-se a Equação de HorRat, (WOOD, 1999) nas replicatas das amostras adicionadas em cada nível de concentração. Este parâmetro foi considerado adequado quando os valores foram menores que 2 (INMETRO, 2011, AOAC, 2012).

A precisão intermediária (RSD_{pi}) do método foi avaliada realizando o procedimento analítico em dias diferentes, através da injeção da curva analítica na matriz “branco” fortificada nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os dados foram estatisticamente avaliados utilizando teste t pareado para estes três níveis de fortificação e em quatro replicatas dos resultados das recuperações. Foram considerados resultados significativamente iguais os valores que não apresentaram diferença estatística no nível de 5%.

3.10.6 Limite de detecção e limite de quantificação

Após a avaliação dos dados de linearidade das curvas analíticas e dos ensaios de fortificação, de cada um dos compostos estudados, procedeu-se a determinação do limite de detecção do instrumento (LOD_i) e do método (LOD_m) e do limite de quantificação do instrumento (LOQ_i) e do método (LOQ_m).

O limite de detecção e quantificação do instrumento foram determinados pelo software *Labsolutions* 5.0, sendo que o limite de detecção foi determinado a partir da relação de três vezes a relação sinal/ruído e para o limite de quantificação dez vezes a relação sinal/ruído, sendo determinado pico a pico.

Os limites de detecção e quantificação instrumentais foram expressos em $\mu\text{g kg}^{-1}$.

A determinação do LOQ_m foi realizada adotando-se o menor ponto da curva analítica para cada analito, levando em consideração a relação sinal ruído (INMETRO, 2011). Para isto, foram realizadas injeções de soluções analíticas nas concentrações de 10,0; 20,0; 50,0 e 100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ preparadas no extrato “branco” da matriz. O limite de quantificação do método é considerado como sendo a menor concentração que, fortificada na matriz, apresenta resultados de recuperação entre 70 e 120%, com RSD menor ou igual a 20% (SANCO, 2013). A partir destes valores, o LOD_m foi determinado como sendo a concentração 3,33 vezes menor que o LOQ_m .

3.10.7 Estimativa da Incerteza da medição

O resultado de uma medição é, em geral, somente uma aproximação ou estimativa do valor do mensurando e, assim, só é completo quando acompanhado pela declaração da incerteza dessa estimativa. Portanto, a incerteza do resultado de uma medição reflete a falta de conhecimento exato do valor do mensurando, sendo uma indicação quantitativa da qualidade do resultado, de forma tal que aqueles que o utilizam possam avaliar sua confiabilidade. Sem a declaração da incerteza, os resultados de medição não podem ser comparados, sejam entre os próprios resultados da medição, ou com valores de referência fornecidos em uma especificação ou em uma norma (INMETRO, 2003).

A Figura 24 mostra o diagrama de Ishikawa que contém todas as grandezas de entrada advindas das fontes de incerteza do processo.

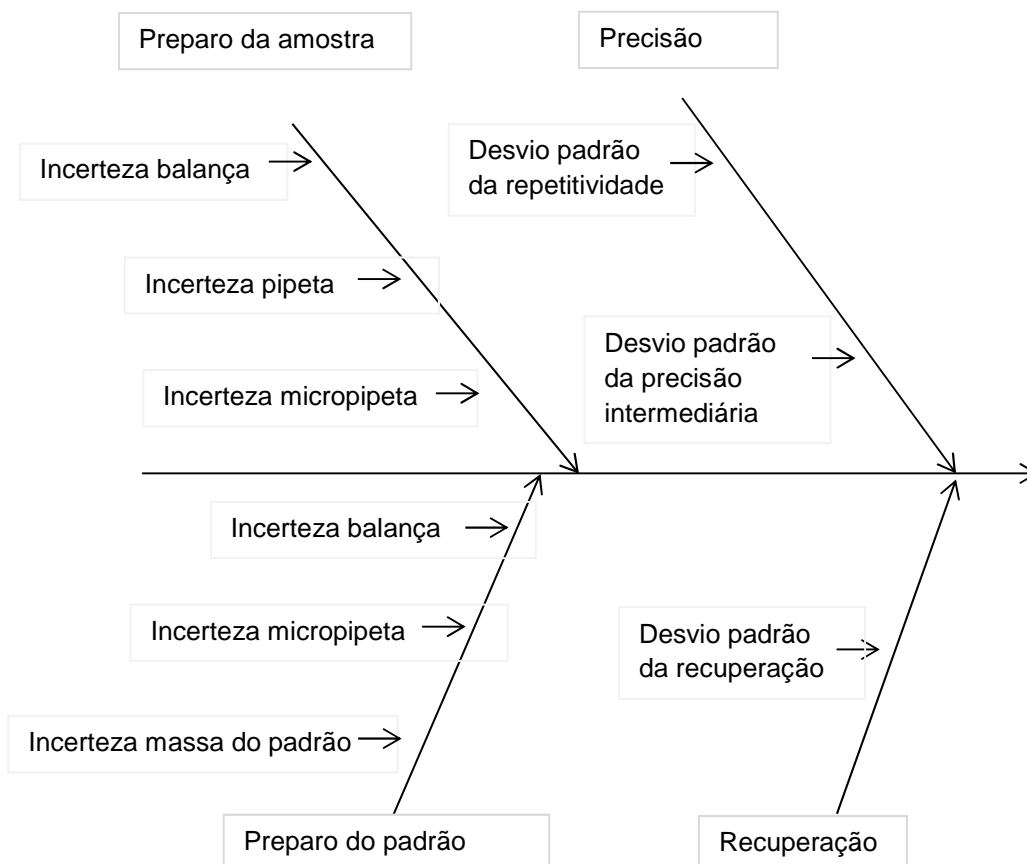


Figura 24 – Diagrama de Ishikawa contendo todas as fontes de incerteza do método

Os cálculos utilizados para determinar a estimativa da incerteza foram as equações de 23 a 28 (ISO GUM 2008; INMETRO, 2013)

3.10.7.1 Contribuição da repetitividade

$$u(S_r) = t_{\infty} \cdot \frac{S_r}{\sqrt{n}} \quad (23)$$

Onde:

t = valor para distribuição de Student, com nível de confiança de 95% bilateral.

S_r = Desvio padrão da repetitividade

N = número de medições

3.10.7.2 Contribuição da precisão intermediária

A incerteza da precisão intermediária foi estimada em função do desvio padrão (S_e) calculado da análise de variância (ANOVA) dentro e entre os grupos, calculando um intervalo de confiança pela distribuição de student com nível de confiança de 95% bilateral (t) e pelo número de replicatas (n), de acordo com as equações 24 e 25.

$$u(S_e) = t_{\infty} \cdot \frac{S_e}{\sqrt{n}} \quad (24)$$

$$S_e = \sqrt{\frac{S_{pi}(\text{precisão intermediária}) - S_r(\text{repetitividade})}{n}} \quad (25)$$

3.10.7.3 Contribuição da recuperação

A incerteza da recuperação foi estimada em função do desvio padrão $u(x)(rec)$ calculado da análise de variância (ANOVA) dentro e entre os grupos, calculando um intervalo de confiança pela distribuição de student com nível de confiança de 95% bilateral (t) e pelo número de replicatas (n), de acordo com as equações 26, 27 e 28.

$$u(rec) = \sqrt{bias^2 + u(x)c, t^2} \quad (26)$$

$$u(x)c, t = \sqrt{u(x)^2} \quad (27)$$

$$u(x)(rec) = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (28)$$

3.10.7.4 Incerteza combinada

O cálculo da incerteza combinada foi realizada utilizando a incerteza da repetitividade $u(S_r)$, da precisão intermediária (uS_e), da recuperação

(tendência) $u(\text{rec})$, do preparo da amostra $u(\text{preparo da amostra})$ e $u(X_{c1})$ do preparo do padrão, conforme equação 19.

3.10.7.5 Incerteza expandida

A incerteza expandida foi calculada pela equação 20 que define um intervalo em torno do resultado de uma medição com o qual se espera abranger uma grande fração da distribuição dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando (ISO GUIA, 2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Condições cromatográficas empregadas para análise de resíduos de agrotóxicos em trigo por GC-MS/MS e LC-MS/MS

As Tabelas 10 e 11 apresentam os agrotóxicos que foram analisados por LC-MS/MS, utilizando o modo de ionização ESI (+) e modo de aquisição SRM e os compostos que foram analisados por GC-MS/MS, respectivamente. As tabelas também mostram os tempos de retenção (t_R), íons precursores, íons produto e energia de colisão das transições monitoradas. Neste estudo foram selecionadas duas transições características para cada composto, sendo a transição mais intensa (mais estável) utilizada para a quantificação dos compostos e a segunda transição mais intensa para a confirmação da identidade dos mesmos.

Tabela 10 - Compostos com seus respectivos tempos de retenção (t_R), íons precursores, íons produto e energia de colisão das transições monitoradas dos compostos analisados por LC-MS/MS.

(continua)

PRINCÍPIO ATIVO	t_R (min)	TRANSIÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO			TRANSIÇÃO DE CONFIRMAÇÃO		
		ÍON PRECURSOR	ÍON PRODUTO	ENERGIA	ÍON PRECURSOR	ÍON PRODUTO	ENERGIA (eV)
Abamectina	12,0	890,7	305,2	28	890,7	567,4	15
Acetamiprido	4,1	223,1	126,1	22	223,1	56,1	15
Ametrina	8,3	228,1	186,1	18	228,1	68,1	39
Atrazina	7,3	216,1	174,1	17	216,1	96,1	25
Aramita	7,8	335,0	105,3	34	335,0	303,1	7
Azaconazol	6,5	313,9	163,0	28	313,9	69,2	28
Azimetifós	5,9	325,0	183,1	16	325,0	112,1	38
Azinfos metílico	7,8	318,1	132,1	14	318,1	261,0	7
Azoxistrobina	8,0	404,1	172,1	14	404,1	392,0	31
Benfuracarb	10,4	411,3	195,1	27	411,3	190,0	15
Boscalida	8,4	341,0	112,0	22	341,0	34,9	30
Buprofezina	10,7	305,9	121,0	12	305,9	57,4	25
Carbendazin	4,8	192,1	160,1	17	192,1	132,1	30
Carbofurano	4,1	237,8	163,0	15	237,8	181,0	11
Carboxina	6,6	236,1	143,0	14	236,1	124,0	20
Carbosulfano	12,7	381,2	118,1	19	381,2	160,1	18
Clorimuron etílico	5,9	415,1	186,0	20	415,1	83,1	15
Clorpirifós etílico	11,1	349,8	97,0	34	349,8	198,0	48

Tabela 10 - Compostos com seus respectivos tempos de retenção (t_R), faixas de retenção, íons precursores, íons produto e energia de colisão das transições monitoradas dos compostos analisados por LC-MS/MS.

(continuação)

PRINCÍPIO ATIVO	tR (min)	TRANSIÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO			TRANSIÇÃO DE CONFIRMAÇÃO		
		ÍON PRECURSOR	ÍON PRODUTO	ENERGIA	ÍON PRECURSOR	ÍON PRODUTO	ENERGIA (eV)
Clorpirifós metílico	12,4	321,9	289,0	15	321,9	125,0	15
Cresoxim metílico	9,5	314,1	222,2	13	314,1	235,1	15
Diclofluanida	9,1	330,7	123,0	20	330,7	141,0	18
Dimeoato	2,2	230,0	199,0	9	230,0	125,0	22
Diurum	7,6	233,0	72,0	21	233,0	160,1	26
Diflubenzuron	5,6	328,0	141,0	38	328,0	158,0	20
Epoconazol	9,1	330,1	121,2	21	330,1	141,1	18
Etiprole	8,1	396,8	350,9	21	396,8	254,8	32
Etoprofos	9,1	243,1	131,0	20	234,1	97,0	32
Finarimol	9,0	330,9	268,0	23	330,9	81,0	53
Flutriafol	7,2	302,1	123,0	28	302,1	109,0	31
Forato	10,0	261,0	75,0	9	261,0	199,1	7
Imidacloprido	3,5	256,1	175,0	17	256,1	209,1	14
Indoxacarb	10,1	528,2	150,0	24	528,2	203,0	37
Linurom	8,2	249,0	160,1	17	249,0	182,1	14
Malationa	8,5	331,0	127,1	12	331,0	99,0	23
Metsulfuron metílico	3,2	382,1	167,1	16	382,1	141,1	15
Monocrotofós	2,9	224,1	127,1	15	224,1	193,0	8
Monolinurom	6,9	215,1	126,1	17	215,1	148,1	14
Metamidofós	2,0	142,1	94,0	15	142,1	125,0	16
Metomil	2,7	163,1	88,1	11	163,1	106,0	13
Pirazofos	10,0	373,8	194,0	34	373,8	222,1	22
Picloram	1,6	240,8	99,0	21	240,8	159,1	11
Omeoato	2,1	241,1	183,0	10	214,1	155,0	14
Pirimetanil	8,4	210,1	107,0	25	210,1	168,0	29
Pirimicarb	7,2	239,2	72,1	25	239,2	182,2	19
Propoxur	6,2	210,1	111,1	13	210,1	168,1	7
Procloraz	9,9	376,0	308,0	11	376,0	366,0	17
Profenofos	10,5	372,9	302,8	19	372,9	345,0	12
Simazina	6,3	201,8	96,0	23	201,8	124,0	17
Terbufos	10,7	289,0	103,2	9	289,0	57,1	24
Tebuconazol	9,4	307,9	70,1	23	307,9	125,1	35
Tiabendazol	5,6	202,0	175,1	24	202,0	131,1	33
Tiacloprido	4,6	253,0	126,1	20	253,0	99,0	43
Tiametoxan	2,8	292,0	211,1	11	292,0	181,1	23
Tiodicarb	6,7	355,1	88,1	21	355,1	108,1	17

Tabela 10 - Compostos com seus respectivos tempos de retenção (t_R), faixas de retenção, íons precursores, íons produto e energia de colisão das transições monitoradas dos compostos analisados por LC-MS/MS.

(conclusão)

PRINCÍPIO ATIVO	tR (min)	TRANSIÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO			TRANSIÇÃO DE CONFIRMAÇÃO		
		ÍON PRECURSOR	ÍON PRODUTO	ENERGIA	ÍON PRECURSOR	ÍON PRODUTO	ENERGIA (eV)
Tolcofos metílico	7,6	301,6	125,0	50	301,6	174,9	43
Trifenilfosfato	9,7	327,2	152,1	36	327,2	215,2	27
Trifloxistrobina	10,1	409,1	186,1	18	409,1	145,0	44
Triflumizol	10,3	346,1	278,1	13	346,1	73,2	17
Triflumurom	9,8	359,1	156,0	16	359,1	139,0	33
Triticonazol	9,0	318,1	70,1	21	318,1	125,1	39
Triadimenol	9,1	296,1	70,1	11	296,1	99,2	15
Triazofos	8,7	314,1	162,2	23	314,1	119,2	35
Triciclazole	5,0	190,0	163,0	21	190,0	136,0	24

Tabela 11 - Compostos com seus respectivos tempos de retenção (t_R), faixas de retenção, íons precursores, íons produto e energia de colisão das transições monitoradas dos compostos analisados por GC-MS/MS.

PRINCÍPIO ATIVO	tR (min)	ÍONS DE QUANTIFICAÇÃO			ÍONS DE CONFIRMAÇÃO		
		ÍON PRECURSOR	ÍON PRODUTO	ENERGIA	ÍON PRECURSOR	ÍON PRODUTO	ENERGIA (eV)
Bifentrina	22,1	181,1	166,1	12	181,1	153,1	8
Bromofós etílico	17,9	358,9	302,9	14	358,9	330,9	28
Carbofenotion	20,6	341,9	157,0	14	341,9	143,0	18
Ciflutrina	25,5	226,1	206,1	14	226,1	199,1	6
Cipermetrina	25,9	181,1	152,1	22	181,1	127,1	24
Ciproconazole	19,4	222,1	125,1	24	222,1	82,0	12
Dicrotofós	11,8	127,1	109,0	12	127,1	95,0	18
Dimetenamid-p	14,7	230,0	154,1	10	230,0	137,1	20
Fenbuconazole	25,5	198,1	129,1	10	198,1	102,1	24
Fenvalerato	27,0	419,1	225,1	6	419,1	167,1	12
Iprodiona	22,1	314,0	245,0	12	314,0	56,0	22
Mepronil	20,2	269,1	119,1	14	269,1	227,1	6
Metconazol	22,6	125,0	89,0	25	125,0	90,0	14
Parationa metílica	14,9	263,0	109,0	14	263,0	136,0	8
Pendimetalin	17,1	252,1	162,1	10	252,1	208,1	8
Pirimetanil	13,5	198,0	118,0	14	198,0	197,0	18
Pirimicarb	14,3	238,1	166,1	12	238,1	72,0	24
Pirimifós metílico	15,7	305,1	180,1	8	305,1	290,1	12

A Figura 25 apresenta os cromatogramas obtidos por LC-MS/MS do extrato “branco” da matriz de trigo e da solução analítica preparada no solvente (acetato de etila) contendo os agrotóxicos e em estudo na concentração $250 \mu\text{g L}^{-1}$.

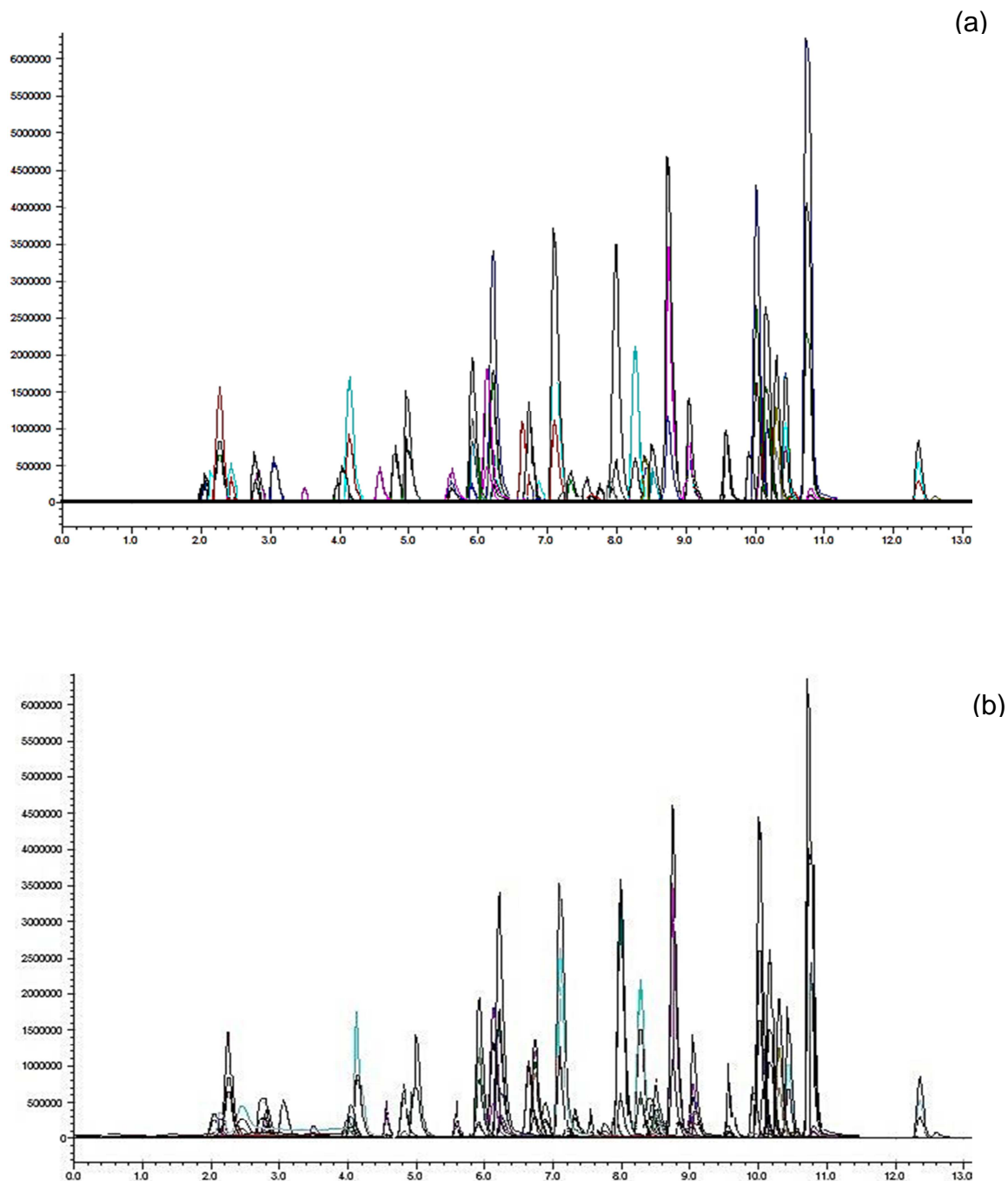


Figura 25 – Cromatograma obtido por LC-MS/MS da solução analítica de $250 \mu\text{g L}^{-1}$ (a) na matriz branco e (b) no solvente contendo os analitos estudados

A Figura 26 apresenta os cromatogramas obtidos por GC-MS/MS do extrato “branco” da matriz de trigo e da solução analítica preparada no solvente (acetato de etila) contendo os agrotóxicos em estudo na concentração $250 \mu\text{g L}^{-1}$.

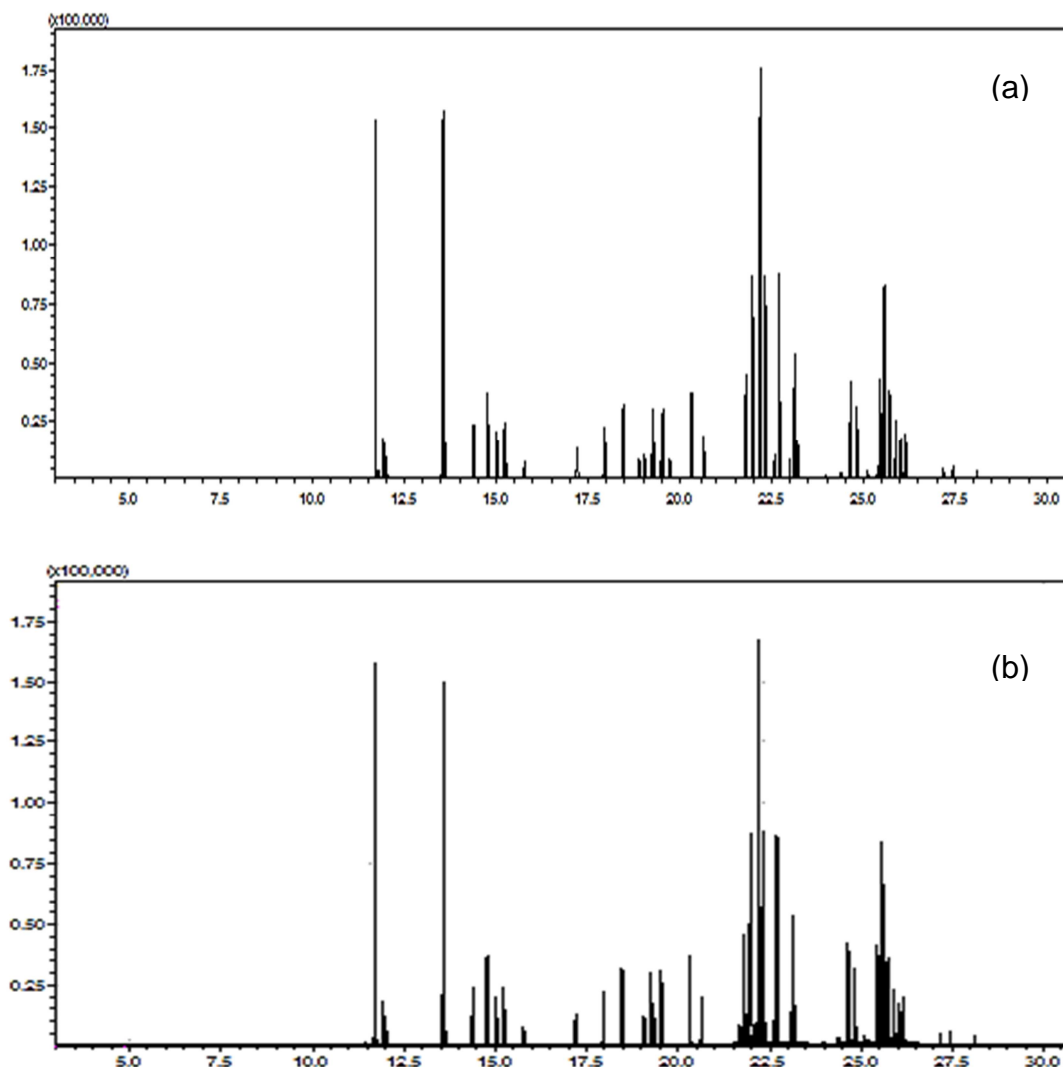


Figura 26 – Cromatograma obtido por GC-MS/MS da solução analítica de $250 \mu\text{g L}^{-1}$ na matriz branco (a) e no solvente (b) contendo os analitos estudados

4.2 Avaliação dos procedimentos estudados através do planejamento fatorial

A Tabela 12 mostra o planejamento fatorial completo, o plano experimental e os resultados experimentais. Os resultados apresentados na

Tabela são referentes a média de recuperação para todos os agrotóxicos estudados por experimento.

Tabela 12 - Planejamento fatorial completo, o plano experimental e os resultados experimentais.

N°	Planejamento fatorial/ Plano Experimental				Média dos resultados de R%	RSD (%)
	X ₁ (Solvente)	X ₂ (Agitação)	X ₃ (Partição)	X ₄ (Limpeza)		
1	-1 (ACET)	-1 (US)	1 (SAL)	-1 (C18)	86	4,3
2	1 (ACN+ETP)	-1 (US)	1 (SAL)	-1 (C18)	0	0
3	-1 (ACET)	1 (VÓRTEX)	1 (SAL)	-1 (C18)	81	0,9
4	1 (ACN+ETP)	1 (VÓRTEX)	1 (SAL)	-1 (C18)	2	72,4
5	-1 (ACET)	-1 (US)	-1 (UC)	-1 (C18)	94	19,2
6	1 (ACN+ETP)	-1 (US)	-1 (UC)	-1 (C18)	0	0
7	-1 (ACET)	1 (VÓRTEX)	-1 (UC)	-1 (C18)	90	8,9
8	1 (ACN+ETP)	1 (VÓRTEX)	-1 (UC)	-1(C18)	2	6,8
9	-1 (ACET)	-1 (US)	1 (SAL)	1 (PSA)	78	25,5
10	1 (ACN+ETP)	-1 (US)	1 (SAL)	1 (PSA)	0	11,9
11	-1 (ACET)	1 (VÓRTEX)	1 (SAL)	1 (PSA)	82	0,5
12	1 (ACN+ETP)	1 (VÓRTEX)	1 (SAL)	1 (PSA)	2	20,9
13	-1 (ACET)	-1 (US)	-1 (UC)	1 (PSA)	77	4,5
14	1 (ACN+ETP)	-1 (US)	-1 (UC)	1 (PSA)	3	31,7
15	-1 (ACET)	1 (VÓRTEX)	-1 (UC)	1 (PSA)	0	0
16	1 (ACN+ETP)	1 (VÓRTEX)	-1 (UC)	1 (PSA)	0	0

ACET: acetate de etila; ACN+ETP: acetonitrila saturada com éter de petróleo + éter de petróleo saturado com acetonitrila; US: ultrassom; UC: ultracongelamento

R%: se refere a avaliação estatística de todos os analitos por procedimento, analisados em triplicata.

RSD (%): coeficiente de variação das três repetições de todos analito estudados. Os valores zero é em função de que não houve recuperação dos analitos.

A Figura 27 mostra que o fator -1 apresentou melhor recuperação para todos os parâmetros avaliados

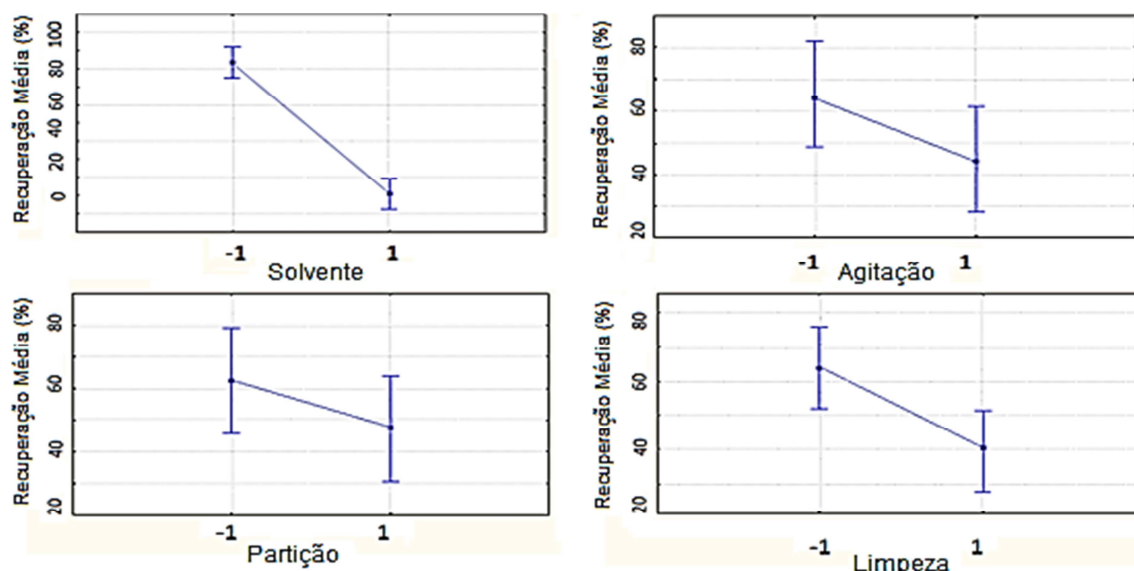


Figura 27 – Teste de significância para a recuperação média (%) de todos os compostos estudados ($p=0,05$)

Os resultados da análise fatorial mostraram a influência das variáveis independentes. O solvente ($p=0,000$) e a limpeza ($p = 0,014$) mostraram diferença significativa na recuperação de todos os agrotóxicos. A agitação ($p=0,083$) e a partição ($p=0,198$) não apresentaram diferença estatística na recuperação dos analitos. As interações entre as variáveis foram significativas ($p<0,05$). A Tabela 13 mostra os principais efeitos e interações entre os fatores para os agrotóxicos estudados.

Tabela 13 – Principais efeitos e interações entre os fatores estudados.

	Efeito estimado	Coeficiente de regressão	p
Interação	37,4882	37,4882	0,00000
$(X_1) \times (X_1)$	-72,3415	-36,1707	0,00000
$(X_2) \times (X_2)$	-10,3585	-5,1793	0,00173
$(X_3) \times (X_3)$	-7,6390	-3,8195	0,01697
$(X_4) \times (X_4)$	-14,9057	-7,4528	0,00002
$(X_1) \text{ by } (X_2)$	11,3951	5,6975	0,00067
$(X_1) \text{ by } (X_3)$	7,3261	3,6631	0,02161
$(X_1) \text{ by } (X_4)$	14,8226	7,4113	0,00002
$(X_2) \text{ by } (X_3)$	-10,8368	-5,4184	0,00112
$(X_2) \text{ by } (X_4)$	-8,6737	-4,3369	0,00738
$(X_3) \text{ by } (X_4)$	-12,6123	-6,3062	0,00021
$(X_1) * (X_2) * (X_3)$	9,3349	4,6675	0,00423
$(X_1) * (X_2) * (X_4)$	6,9922	3,4961	0,02781
$(X_1) * (X_3) * (X_4)$	13,1608	6,5804	0,00013
$(X_2) * (X_3) * (X_4)$	-9,9503	-4,9752	0,00248

As interações entre as variáveis apresentadas na Figura 28 mostraram que o tipo de solvente teve diferença significativa nas interações testadas, como apresentado nas Figuras 28 (a), (b) e (c). O solvente teve diferença significativa com menores porcentagens de recuperação. A Figura 28 (a) mostra que a interação entre agitação e a partição, sendo que não houve diferença estatística quando avaliado com diferentes solventes. O resultado da avaliação da interação entre a agitação e a limpeza dos extratos mostrou que independente do solvente utilizado não há diferença significativa entre as variáveis, como mostra a Figura 28 (b). Na Figura 28 (c) se evidencia que diferentes tipos de partição e limpeza não tem diferença estatística quando avaliados na interação com os diferentes solventes estudados. O uso de agitação por vórtex, de maneira geral, mostrou menor recuperação e diferença estatística quando avaliado na interação com a partição (1) e limpeza dos extratos (1), como mostra a Figura 28 (d).

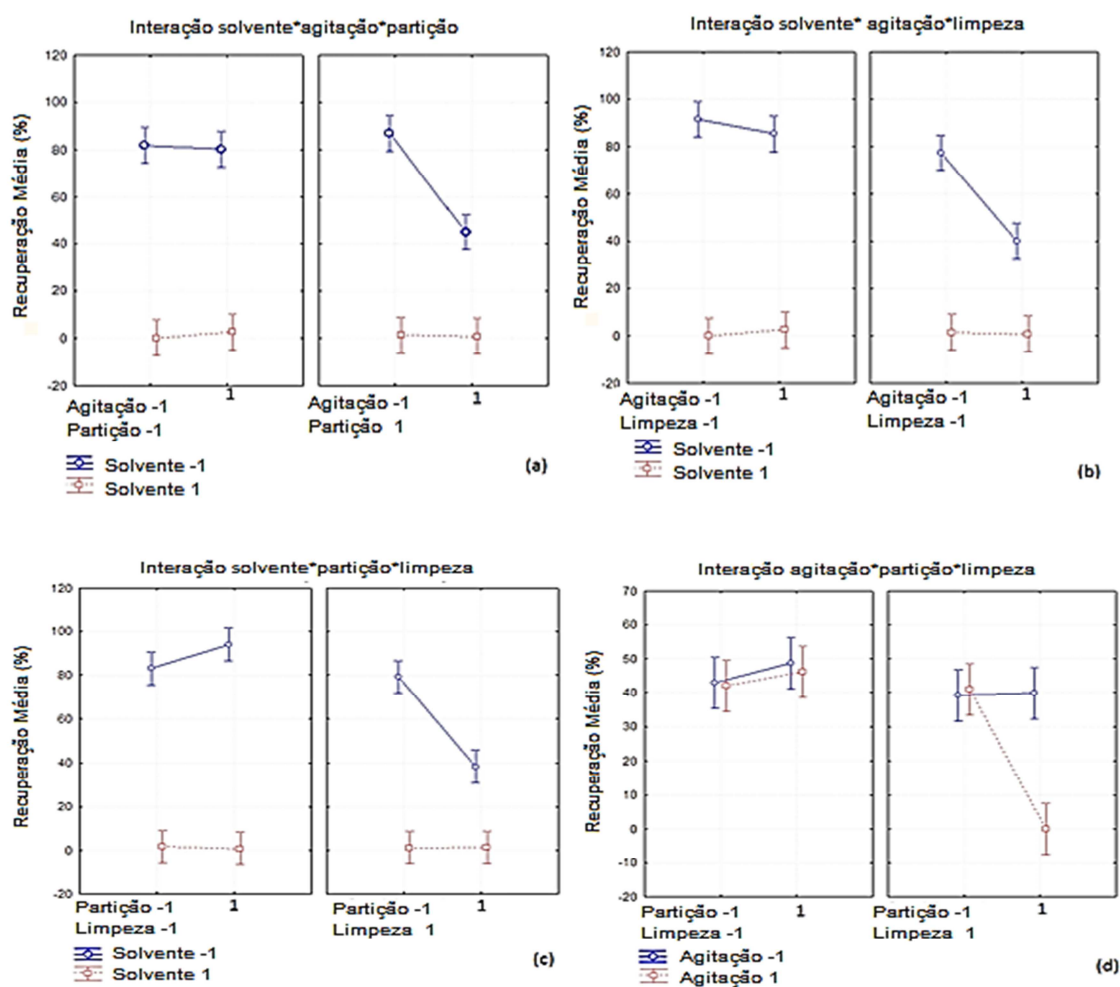


Figura 28 – Gráficos de interações entre três fatores: solvente, agitação, partição e limpeza.

A análise de variância determinou valor de $R^2=2$, isto mostra que a variação explicada pelo modelo é significativamente maior do que a variação que não foi explicada (MURALIDHAR *et al.*, 2001). O coeficiente de determinação de 0,957 obtido indica que 95,7% da resposta é explicada pelo modelo (TENG & XU 2008; KAUSHIK *et al.*, 2006).

Os resultados mostraram que a utilização do solvente éter de petróleo saturado com acetonitrila mais acetonitrila saturada com éter de petróleo não foi eficiente na extração em nenhum dos procedimentos estudados e para nenhum dos agrotóxicos avaliados. A acetonitrila modificada com ácido fórmico ou acético tem se mostrado muito eficiente na extração dos analitos da matriz estudada (Kolberg *et al.*, 2011; Gonzalez-Curbelo *et al.*, 2013), em função de que muitos compostos apresentam melhor condição química, em meio de caráter ácido, pelos grupos funcionais que compõe estes analitos. Este comportamento não se verificou quando da utilização da acetonitrila com éter de petróleo, que possui característica apolar, não tendo, assim, afinidade com os analitos além de não modificar e melhorar a característica da acetonitrila como solvente extrator. No trabalho de Pan *et al.*, (2008) o solvente acetato de etila também foi determinado como melhor extrator para determinação de agrotóxicos em amostras de vegetais, quando comparado com acetonitrila, acetona e diclorometano.

O método de agitação utilizando ultrassom se mostrou mais eficiente que o vórtex. Chemat *et al.*, (2011) em seu trabalho publicado de revisão sobre a utilização do ultrassom compara a sua utilização com outras técnicas, onde mostrou grande rapidez, simplicidade e eficiência. Neste trabalho utilizou-se uma sonda de ultrassom após a adição do solvente orgânico, por 9 min a 375 W, em todos os experimentos, este processo se mostrou eficiente. Apenas três agrotóxicos (propoxem, malationa e triadimenol) dos 60 avaliados a extração com vórtex foi estatisticamente mais eficiente que a utilização do ultrassom. Estes resultados também concordam com os dados obtidos no trabalho de Hercegova *et al.*, (2005) que utilizou ultrassom no preparo de amostras com recuperações próximas a 100% para 90% dos analitos avaliados.

A análise estatística mostrou que a utilização de ultracongelamento para partição dos analitos foi o fator que apresentou menor significância dos fatores estudados. A vantagem partição a baixa temperatura é que os componentes da amostra são congelados com a fase aquosa, enquanto que os agrotóxicos são

extraídos pela fase orgânica (PINHO *et al.*, 2010). A partição envolve a migração dos analitos da fase aquosa para fase orgânica e para a maioria dos agrotóxicos estudados para matriz trigo o melhor procedimento foi o que se utilizou ultracongelamento. Os sais solvatam em meio aquoso e a sua utilização melhora a recuperação de pesticidas polares (Andersson *et al.*, 1991). Neste trabalho a utilização de NaCl não foi significativa na recuperação dos analitos, apesar de sua capacidade de solvatação em meio aquoso e facilitando a migração dos analitos para a fase orgânica (Prestes *et al.*, 2009). No trabalho relatado por Walorczyk (2008) a utilização de ultracongelamento mostrou recuperações de 67% para grãos de trigo analisados na faixa de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Na determinação de fungicidas em brotos de feijão, onde foi utilizado o ultracongelamento das amostras para a etapa de partição, foram alcançadas recuperações entre 80,4 e 96,3% (CHO *et al.*, 2013). Os autores concluíram que a extração com solvente com partição a baixa temperatura (SE-LTP, do inglês *Solvent extraction with low temperature partitioning*) é uma técnica promissora devido suas vantagens quando comparado com outras técnicas, como praticidade, redução do número de etapas, confiabilidade e seletividade.

O apêndice B apresenta as condições ótimas estabelecidas pelo planejamento fatorial por princípio ativo estudado. O software utilizado na avaliação dos resultados do planejamento apontou as melhores condições analíticas para a melhor recuperação. Entretanto, o programa utilizado (Statistica) não considera a faixa de 70 a 120% de recuperação, mas sim a maior recuperação. A Tabela 14 apresenta os princípios ativos que apresentaram recuperações no intervalo desejado.

Pode-se observar que muitos analitos avaliados apresentaram recuperações satisfatórias para mais de um procedimento estudado. A Figura 29 apresenta os resultados das recuperações dos analitos nos procedimentos que apresentaram melhores respostas.

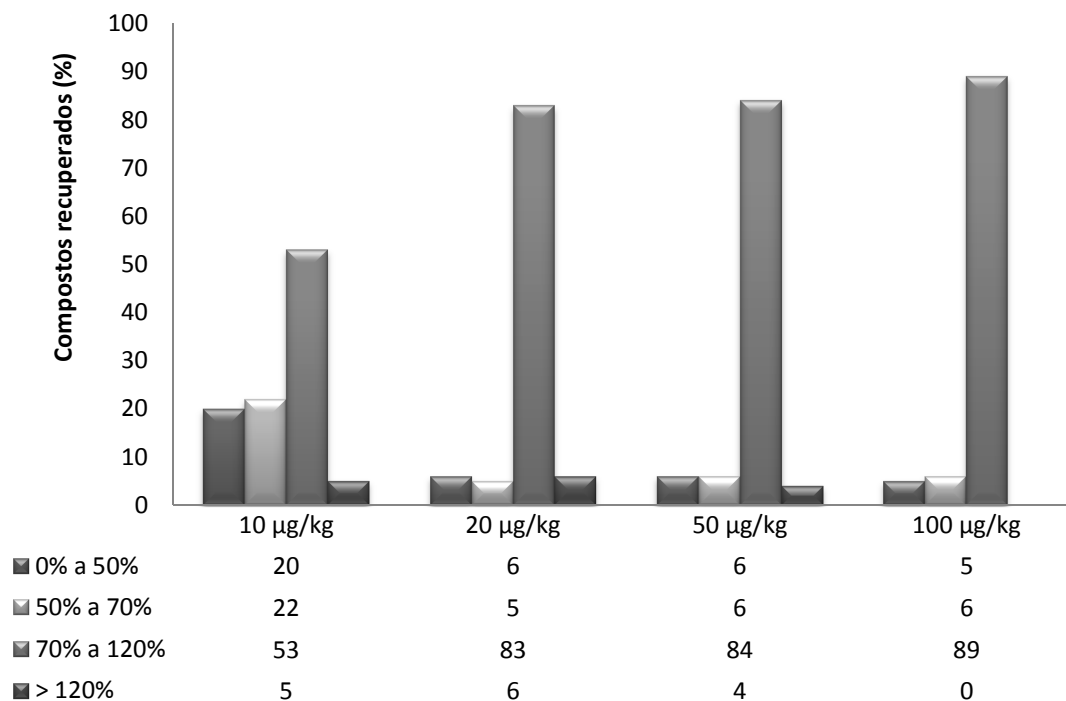


Figura 29 – Porcentagens de compostos recuperados nos procedimentos com melhor resposta.

Tabela 14 – Princípios ativos na condição ótima e as recuperações entre 70 e 120% nos procedimentos com resultados satisfatórios
(continua)

N°	Solvente	Agitação	Partição	Limpeza	Condições ótimas estabelecidas pelo planejamento fatorial	Princípios Ativos com Recuperações entre 70 e 120%
1	ACET	US	NaCl	C18	Carboxina, Azoxistrobin, Carbofurano, Carbosulfano, Ametrina, Epoxiconazol, Bendiocarb, imidacloprido (8)	Abamectina, Ametrina, Atrazina, Azametifós, Azoxistrobina, Bendiocarb, Benfluracarb, Bromofós etílico, Carbofenotion, Carbofurano, Carbosulfano, Carboxina, Ciproconazol, Cipermetrina, Clorpirifós etílico, Cresoxin metílico, Dimetenamida-p, Diurom, Etiprole, Etoprofós, Febuconazol, Fenvalerato, Finarimol, Flutriafol, Forato, Indoxacarbe, Malationa, Metconazol, Mepronil, Monolinurom, Omeoato, Parationa metílica, Pendimentalina, Piraclostrobina, Pirazofós, Pirimetanil, Pirimicarbe, Pirimifós metílico, Profenofós, Propoxur, Terbufós, Tiacloprido, Tiodicarbe, Tolcofós metílico, Triadimenol, Trifloxistrobina, Triflumizol, Triflumurom, Triticonazo (49)
3	ACET	VORTEX	NaCl	C18	Atrazina, Bendiocarb, Bromofós etílico, Carbofenotion, Diclofluamida, Dimetoato, Diurom, Epoxiconazol, Fenarimol, Forato, Malationa, Metamidofós, Pirimifós metílico, Propoxur, Simazina, Triadimenol, Triazofós, (17)	Abamectina, Ametrina, Atrazina, Azifós metílico, Azoxistrobina, Bendiocarb, Benfluracarb, Carbosulfano, Carbofenotion, Carboxina, Ciflutrina, Clorpirifós etílico, Cresoxin metílico, Dicrotofós, Diurom, Flutriafol, Forato, Indoxacarbe, Iprodiona, Linurom, Monocrotofós, Monolinurom, Piraclostrobina, Pirazofós, Pirimicarbe, Procloraz, Profenofós, Propoxur, Terbufós, Tiabendazol, Tolcofós metílico, Trifloxistrobina, Triflumizol, Triflumurom (35)
5	ACET	US	UC	C18	Abamectina, Aramita, Azaconazol, Azametifós, Azinfós metílico, Benfluracarb, Bifentrina, Boscalida, Buprofezina, Carbofenotion, Carbosulfano, Carbendazim, Ciflutrina, Cipermetrina, Ciproconazole, Metomil, Clorontranipole, Clorpirifós etílico, Clorpirifós metílico, Diclofluamida, Dicrotofós, Diflubenzuron, Dimeoato, Dimetenamid-p, Etoprofós, Fenbuconazole, Fenvalerato, Flutriafol, Indoxicarb, Iprodiona, Linurom, Mepronil, Metconazol, Metsulfuron metílico, Monolinurom, Parationa metílica, Piraclostrobina, Pendimetalin, Picloram, Pirimetanil, Pirimicarbe, Pirimifós metílico, Procloraz, Profenofós, Tebuconazol, Terbufós, Tiacloprido, Tiametoxan, Tiodicarbe, Tolcofós metílico, Trifloxistrobina, Triflumizol, Triflumurom (53)	Ametrina, Aramita, Atrazina, Azaconazol, Azametifós, Azoxistrobina, Bendiocarb, Benfluracarb, Bifentrina, Carbendazin, Carbofenotion, Carbofurano, Carbosulfano, Carboxina, Carbendazim, Ciflutrina, Cipermetrina, Ciproconazol, Clorpirifós, Cresoxin metílico, Diclofluamida, Dicrotofós, Diflubenzuron, Dimeoato, Diurom, Doclofluamida, Etoprofós, Fenbuconazole, Finarimol, Flutriafol, Forato, Indoxacarbe, Iprodiona, Linurom, Malationa, Metconazol, Metsulfuron metílico, Mepronil, Monolinurom, Parationa metílica, Pendimentalina, Picloram, Piraclostrobina, Pirimetanil, Pirimifós metílico, Procloraz, Profenofós, Propoxur, Simazina, Tebuconazol, Terbufós, Tiacloprido, Tiodicarbe, Tolcofós metílico, Triadimenol, Triflumizol, Triflumurom, Triticonazol (59)

Tabela 14 – Princípios ativos na condição ótima e as recuperações entre 70 e 120% nos procedimentos com resultados satisfatórios (conclusão)

Nº	Solvente	Agitação	Partição	Limpeza	Condições ótimas estabelecidas pelo planejamento fatorial	Princípios Ativos com Recuperações entre 70 e 120%
7	ACET	VORTEX	UC	C18	Carbofenotion (1)	Ametrina, Atrazina, Azametifós, Azifós metílico, Azoxistrobina, Benfluracarb, Carbofurano, Carbosulfano, Carboxina, Clorpirifós, Cresoxin metílico, Diurom, Doclofluamida, Epoxiconazol, Etoprofós, Flutriafol, Forato, Indoxacarbe, Iprodiona, Linurom, Malationa, Monolinurom, Piraclostrobina, Pirimicarbe, Procloraz, Profenofós, Propoxur, Terbufós, Tiacloprido, Tiodicarbe, Tolcofós metílico, Triadimenol, Trifloxistrobina, Triflumizol, Triflumurom, Triticonazol, (36)
11	ACET	VORTEX	NaCl	PSA	Tiabendazol, Monocrotofós (2)	Abamectina, Ametrina, Atrazina, Azifós metílico, Benfluracarb, Boscalida, Carbofenotion, Carbofurano, Carbosulfano, Carboxina, Ciproconazol Clorpirifós, Diurom, Epoxiconazol, Etiprole, Flutriafol, Forato, Indoxacarbe, Linurom, Malationa, Piraclostrobina, Pirazofós, Pirimetanil, Profenofós, Propoxur, Terbufós, Tiabendazol, Tolcofós metílico, Trifloxistrobina, Triflumizol, Triflumurom, Triticonazol (37)
13	ACET	US	UC	PSA	Clorimurom etílico, Pirimicarbe, Acetamiprido, Propoxur, Etiprole (5)	Abamectina, Ametrina, Atrazina, Azifós metílico, Azoxistrobina, Benfluracarb, Boscalida, Carbofurano, Carbosulfano, Carboxina, Ciflutrina, Clorotranipole, Clorpirifós, Cresoxin metílico, Diurom, Etiprole, Etoprofós, Finarimol, Flutriafol, Forato, Indoxacarbe, Linurom, Malationa, Monolinurom, Piraclostrobina, Pirazofós, Pirimetanil, Pirimicarbe, Procloraz, Profenofós, Propoxur, Terbufós, Tiabendazol, Triadimenol, Trifloxistrobina, Triflumizol, Triflumurom, Triticonazol (38)

ACET: Acetado de Etila; US Ultrassom; UC: Ultracongelamento

4.3 Validação do procedimento proposto

O fluxograma abaixo apresenta as etapas do método que foi validado:

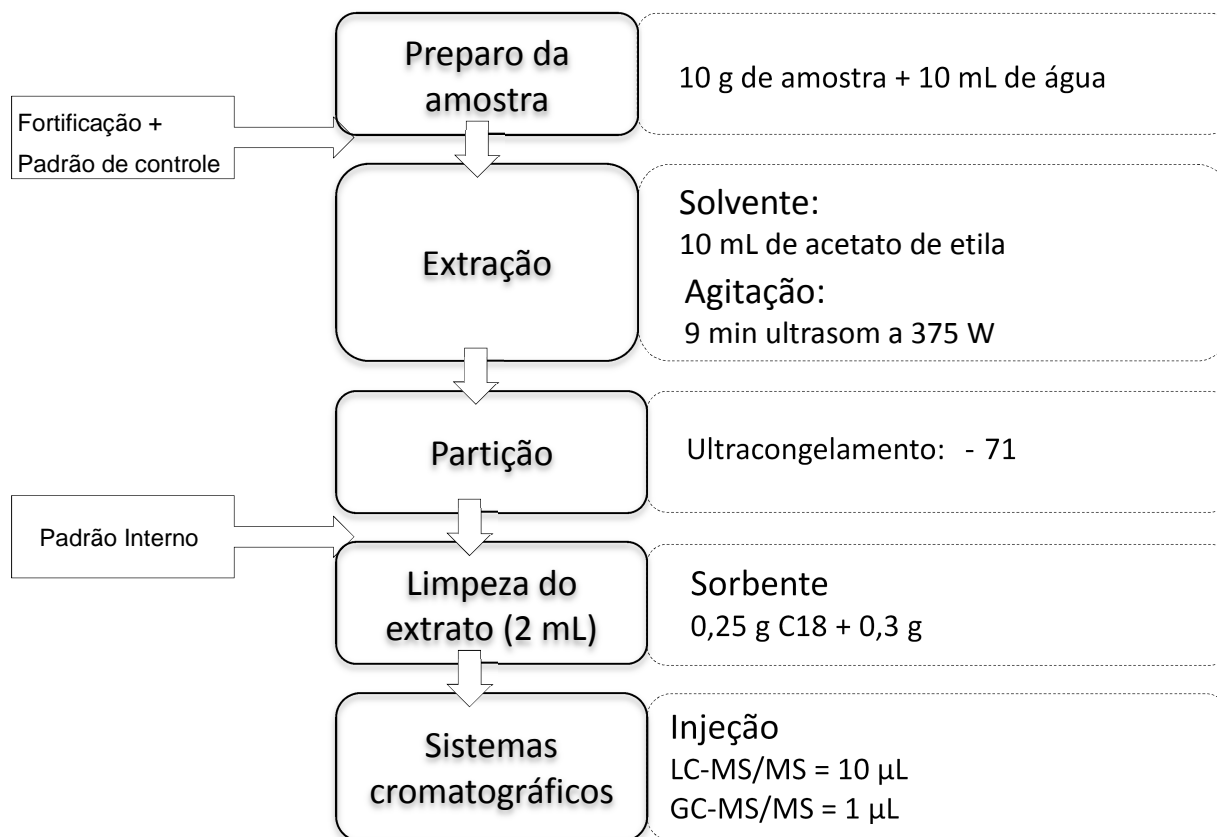


Figura 30 - Representação do método utilizado para extração dos agrotóxicos nas amostras de trigo.

4.3.1 Seletividade

A seletividade é a extensão na qual um procedimento analítico pode determinar analito(s) particular(es) em mistura(s) ou matriz(es) sem a interferência de outros componentes de comportamento semelhante. É a capacidade do procedimento analítico de discriminar entre a substância a ser analisada e substâncias análogas (isômeros, metabólitos, produtos de degradação, componentes da matriz, componentes que possam gerar interferências, entre outros) (BRASIL, 2011).

A avaliação da seletividade do método foi realizada através da comparação dos cromatogramas obtidos por injeções dos extratos de amostras “branco” e extratos de amostras fortificadas nos sistemas cromatográficos. Esta avaliação tem por

objetivo verificar a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos em estudo.

Os cromatogramas obtidos por GC-MS/MS e LC-MS/MS demonstram a seletividade do método, pois não se verificou picos nos tempos de retenção dos analitos em estudo neste método, conforme demonstrado na Figura 31.

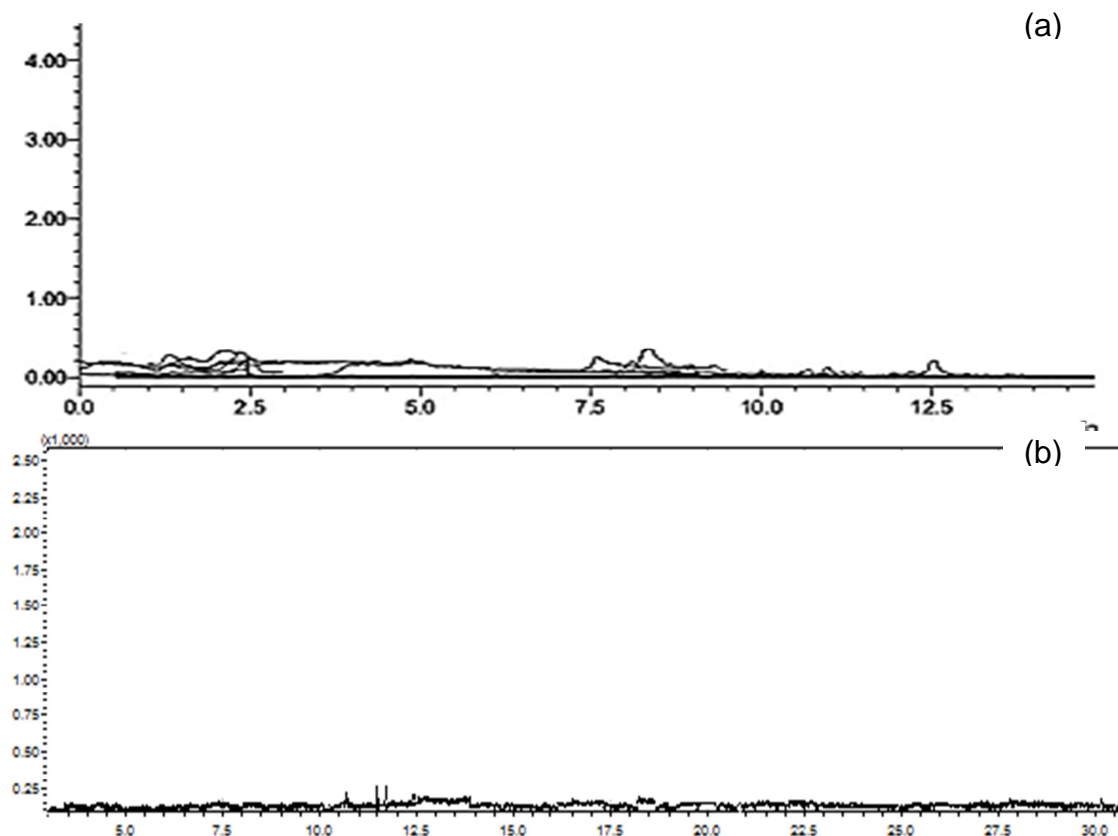


Figura 31 – Cromatograma obtido por LC-MS/MS (a) e por GC/MS/MS do branco da matriz (b)

4.3.2 Curva analítica – Normalidade da distribuição dos valores, homocedasticidade, faixa linear e independência dos resíduos.

A faixa de trabalho de cada agrotóxico estudado foi determinada através das injeções em triplicata das soluções analíticas preparadas em acetato de etila e no extrato da matriz trigo, nas concentrações 2,0; 5,0; 10,0; 20; 50; 70; 100; 150 200 e 250 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A avaliação da premissa de que os resíduos da regressão devem seguir a distribuição normal (os desvios da normalidade não são significativos) foi

confirmada pelo teste de Anderson-Darlin. O teste rejeita a hipótese de normalidade quando os valores de $p < 0,05$. A avaliação da presença de valores discrepantes na curva analítica foi realizada através do teste de Cochran utilizando oito pontos da curva, onde foi verificada a homocedasticidade dos níveis de concentração. O valor de referência para o teste é de 0,6530, considerando que foram utilizados oito pontos analisados em três repetições. A avaliação dos valores extremos permitiu perceber os pontos que afetavam o ajuste do modelo. Os pontos de concentração 2 e 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para todos os agrotóxicos estudados, o ponto 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para abamectina, carbendazin e tolcófós metílico e o ponto 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para acetamiprido, ametrina, azaconazol, dimeoato, etiprole e o omeoato, apresentaram heterocedasticidade ($p < 0,05$) e desvio da linearidade ($p < 0,05$). O teste de Durbin-Watson mostrou a independência dos resíduos da regressão ($p > 0,05$). Foi verificada uma alta significância da regressão ($p < 0,001$) com desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$) na faixa avaliada. A variabilidade dos resíduos da regressão nos pontos da curva preparados foi constante.

As premissas de que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, são homocedásticos e independentes foram confirmadas garantindo uma aplicação segura da curva analítica para quantificação dos analitos.

As equações das curvas foram estimadas pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) e utilizadas para o cálculo da concentração dos analitos.

Os valores dos testes de normalidade realizados através da estatística de Anderson-Darlin, a avaliação da homocedasticidade pelos resultados do teste de Cochran, o teste de independência realizado de acordo com Durbin & Watson, a faixa linear e o coeficiente de determinação (R^2) estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultados da análise da regressão dos analitos do padrão
(continua)

Agrotóxico	Teste de Normalidade	Teste de Cochran	Teste de Independência	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R ²
Abamectina	0,2620	0,4577	0,1785	20 a 250	0,9953
Acetamiprido	0,1115	0,5316	0,1612	10 a 200	0,9974
Ametrina	0,2182	0,3727	0,0595	10 a 200	0,9975
Aramita	0,8928	0,5809	0,0588	10 a 250	0,9989
Atrazina	0,7248	0,4966	0,2068	10 a 250	0,9962
Azaconazol	0,4736	0,4684	0,0721	10 a 200	0,9976
Azametifós	0,6993	0,3133	0,0536	10 a 250	0,9981
Azifós metílico	0,3412	0,4727	0,0509	10 a 250	0,9971
Azoxistrobina	0,1133	0,4982	0,0594	10 a 250	0,9968
Benfluracarbe	0,3511	0,4507	0,0551	10 a 250	0,9968
Bifentrina	0,1886	0,4224	0,0594	10 a 250	0,9959
Boscalida	0,5065	0,2768	0,0664	10 a 250	0,9975
Bromofós etílico	0,0500	0,6319	0,0501	10 a 250	0,9954
Buprofesina	0,3879	0,6503	0,7758	10 a 250	0,9959
Carbendazin	0,3400	0,4186	0,0557	20 a 250	0,9959
Carbofenotion	0,2445	0,3200	0,1203	10 a 250	0,9949
Carbofurano	0,0519	0,6169	0,3142	10 a 250	0,9956
Carbosulfano	0,0892	0,5842	0,6760	10 a 250	0,9970
Carboxina	0,3245	0,4829	0,0898	10 a 250	0,9970
Ciflutrina	0,4279	0,6317	0,3488	10 a 250	0,9944
Cipermetrina	0,3822	0,4235	0,1671	10 a 250	0,9956
Ciproconazole	0,7536	0,5521	0,0632	10 a 250	0,9971
Clorimuron etílico	0,4083	0,5799	0,3408	10 a 200	0,9972
Clorpirifós etílico	0,7661	0,4726	0,0544	10 a 250	0,9972
Clorpirifós metílico	0,0628	0,5592	0,0528	10 a 250	0,9980
Cresoxin metílico	0,0628	0,5740	0,0528	10 a 250	0,9954
Diclofunanida	0,1239	0,5740	0,3542	10 a 250	0,9974
Dicrotofós	0,2064	0,5601	0,0546	10 a 250	0,9962
Diflubenzuron	0,5632	0,4850	0,8650	10 a 250	0,9974
Dimeoato	0,5739	0,5537	0,0501	10 a 200	0,9957
Dimetenamida-p	0,0799	0,6337	0,0585	10 a 250	0,9956
Diurum	0,3915	0,3452	0,0517	10 a 250	0,9971
Epoxiconazol	0,1725	0,5362	0,6582	10 a 250	0,9959
Etiprole	0,4130	0,3659	0,0547	10 a 200	0,9957
Etoprofós	0,0635	0,3007	0,4872	10 a 250	0,9907
Fenbuconazole	0,0802	0,5195	0,0572	10 a 250	0,9955
Fenvalerato	0,3585	0,4778	0,0571	10 a 250	0,9987
Finarimol	0,6311	0,6275	0,6141	10 a 250	0,9950
Flutriafol	0,4706	0,6396	0,6701	10 a 250	0,9992
Forato	0,0952	0,5511	0,7639	10 a 250	0,9974
Imidacloprido	0,2107	0,3627	0,9184	10 a 250	0,9954

Tabela 15 – Resultados da análise da regressão dos analitos do padrão

Agrotóxico	(conclusão)				
	Teste de Normalidade	Teste de Cochran	Teste de Independência	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R ²
Indoxacarbe	0,0755	0,4105	0,8183	10 a 250	0,9986
Iprodiona	0,5092	0,4794	0,4223	10 a 250	0,9953
Linurom	0,4155	0,6203	0,0855	10 a 250	0,9955
Malationa	0,4155	0,3608	0,0855	10 a 250	0,9972
Mepronil	0,1145	0,3731	0,0703	10 a 250	0,9964
Metamidofós	0,1767	0,3589	0,0524	10 a 250	0,9920
Metconazol	0,2254	0,5488	0,0633	10 a 250	0,9953
Metomil	0,7337	0,4667	0,0525	10 a 250	0,9981
Metsulfuron metílico	0,5313	0,3465	0,0842	10 a 250	0,9969
Monocrotofós	0,2439	0,3072	0,1316	10 a 250	0,9977
Monolinurom	0,1061	0,5049	0,7460	10 a 250	0,9981
Omeoato	0,1623	0,6028	0,3985	10 a 200	0,9991
Paration metílico	0,0716	0,4927	0,0519	10 a 250	0,9964
Pendimentalina	0,3380	0,5760	0,0510	10 a 250	0,9972
Picloram	0,7359	0,2903	0,2244	10 a 250	0,9952
Pirazofós	0,7319	0,4406	0,0583	10 a 250	0,9977
Pirimetaniil	0,9955	0,3661	0,0631	10 a 250	0,9957
Pirimicarbe	0,0762	0,5045	0,0511	10 a 250	0,9955
Pirimifós metílico	0,6126	0,5495	0,1715	10 a 250	0,9956
Procloraz	0,8164	0,5779	0,0687	10 a 250	0,9966
Profenofós	0,7810	0,4800	0,4713	10 a 250	0,9962
Propoxur	0,0716	0,5240	0,3414	10 a 250	0,9995
Simazina	0,1800	0,4274	0,0850	10 a 250	0,9983
Tebuconazol	0,9425	0,4751	0,2228	10 a 250	0,9971
Terbufós	0,2598	0,5403	0,5655	10 a 250	0,9973
Tiabendazol	0,0682	0,6097	0,4383	10 a 250	0,9968
Tiacloprido	0,2797	0,5584	0,0932	10 a 250	0,9986
Tiametoxan	0,8758	0,4749	0,1851	10 a 250	0,9973
Tiodicarbe	0,6249	0,4839	0,0944	10 a 250	0,9990
Tolcofós metílico	0,6350	0,3389	0,3936	20 a 250	0,9953
Triadimenol	0,9524	0,6088	0,8738	10 a 250	0,9959
Triafozós	0,3936	0,4648	0,0512	10 a 250	0,9969
Triciclazole	0,3936	0,4441	0,0512	10 a 250	0,9976
Trifloxistrobina	0,3093	0,5134	0,0520	10 a 250	0,9972
Triflumizol	0,2152	0,4902	0,9949	10 a 250	0,9988
Triflumurom	0,1967	0,5024	0,3535	10 a 250	0,9986
Triticonazol	0,4390	0,6119	0,0582	10 a 250	0,9986

4.3.3 Efeito matriz

Os extratos preparados na matriz para serem posteriormente injetados no cromatógrafo deverão ser suficientemente limpos, de modo que não ocorram efeitos da matriz na análise cromatográfica. O grau de efeitos de matriz pode ser medido comparando os padrões analíticos preparados em solvente com os padrões de mesmas concentrações nos extratos da matriz (LEHOTAY *et al.*, 2010)

O efeito da matriz pode gerar supressão ou aumento do sinal analítico, isto é causado pela interação entre os analitos e coextrativos da matriz na amostra preparada, que pode suprimir ou aumentar a ionização do analito na fonte de ionização, resultando em um menor ou maior sinal medido o que afeta a exatidão do resultado quantitativo. Esta é uma questão desafiadora para análise LC-MS/MS porque este tipo de efeito de matriz pode depender do analito, matriz ou do modo de ionização (ZHANG *et al.*, 2011).

Na Tabela 16 estão listados os resultados obtidos para o efeito matriz, avaliado para os agrotóxicos determinados por LC-MS/MS e na Tabela 17 estão listados os resultados obtidos para o efeito matriz, avaliado para os agrotóxicos determinados por LC-MS/MS a partir das curvas analíticas contendo os analitos preparados no extrato da matriz da amostra com as soluções de mesma concentração preparada em acetato de etila, tendo em vista que este é o solvente extrator do procedimento estudado neste trabalho.

Tabela 16 – Efeito matriz dos agrotóxicos estudados na matriz trigo determinados por LC-MS/MS

(continua)

Agrotóxico	%	Agrotóxico	%	Agrotóxico	%
Abamectina	23	Diclofluanida	28	Picloram	30
Acetamiprido	44	Dimeoato	46	Omeoato	31
Ametrina	20	Diurom	96	Propoxur	34
Atrazina	26	Diflubenzuron	7	Procloraz	31
Aramita	26	Epoconazol	39	Profenofos	35
Azaconazol	-16	Etiprole	-25	Simazina	42
Azimetifós	44	Etoprofos	7	Terbufos	27
Azinfos metílico	33	Finarimol	25	Tebuconazol	34
Azoxistrobina	30	Flutriafol	29	Tiabendazol	-19

Tabela 16 – Efeito matriz dos agrotóxicos estudados na matriz trigo determinados por LC-MS/MS

(conclusão)					
Agrotóxico	%	Agrotóxico	%	Agrotóxico	%
Benfuracarbe	-26	Forato	38	Tiacloprido	-33
Boscalida	41	Imidacloprido	3	Tiametoxan	12
Buprofezina	-25	Indoxacarb	33	Tiodicarb	26
Carbendazin	26	Linurom	24	Tolcofos metílico	22
Carbofurano	40	Malationa	49	Triadimenol	5
Carboxina	55	Metsulfuron metílico	-16	Triazofos	30
Carbosulfano	44	Monocrotofós	33	Triciclazole	-34
Clorimuron etílico	-55	Monolinurom	40	Trifloxistrobina	42
Clorpirifós etílico	24	Metamidofós	34	Triflumizol	-53
Clorpirifós metílico	31	Metomil	25	Triflumurom	31
Cresoxim metílico	31	Pirazofos	27	Triticonazol	-28

Tabela 17 – Efeito matriz dos agrotóxicos estudados na matriz trigo determinados por GC-MS/MS

Agrotóxico	%	Agrotóxico	%	Agrotóxico	%
Bifentrina	12	Dicrotofós	10	Metconazol	25
Bromofós etílico	13	Dimetenamid-p	11	Parationa metílica	9
Carbofenotion	10	Fenbuconazole	9	Pendimetalin	9
Ciflutrina	10	Fenvalerato	6	Pirimetamil	48
Cipermetrina	13	Iprodiona	19	Pirimicarb	10
Ciproconazole	9	Mepronil	10	Pirimifós metílico	10

Os resultados mostraram que todos os analitos estudados neste trabalho sofrem efeito da matriz na determinação cromatográfica. Os valores ficaram entre 3 e 97%, sendo que 32% dos analitos apresentaram efeito matriz < 20%. A fim de minimizar o efeito matriz as soluções analíticas foram preparadas na matriz branca de trigo (FERRER *et al.*, 2011). Pinho *et al.* (2009) propõem outros métodos para minimizar o efeito matriz para determinações utilizando cromatografia em fase gasosa, como injeção com temperatura programada de vaporização, injeção direta na coluna (*on column*), utilização de analitos protetores, como açúcares e seus derivados (poliidroxilados), ácidos carboxílicos, aminoácidos, compostos alifáticos, compostos básicos como a ureia, limpeza dos extratos, a fim de separar satisfatoriamente os analitos de co-extrativos

remanescentes, utilização do método de adição padrão ou determinar uma função de correção. Ainda segundo os autores, para minimização do efeito matriz, é necessário conhecer as propriedades dos agrotóxicos analisados, como polaridade, volatilidade, entre outras.

4.3.4 Exatidão (recuperação)

Os parâmetros de exatidão e recuperação dos analitos foram avaliados através da injeção de quatro níveis de concentração em oito repetições. A avaliação de valores extremos foi realizada através do teste de Grubbs. Foram excluídos valores discrepantes até o limite máximo de 22,2% e posteriormente foi calculada a recuperação para cada nível de concentração. A Tabela 18 apresenta as recuperações para os níveis avaliados.

Tabela 18 – Recuperação dos analitos nos níveis avaliados

(continua)

Agrotóxico	Níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	10		20		50		100	
	Rec %	%RSD	Rec %	%RSD	Rec %	%RSD	Rec %	%RSD
Abamectina	73	18	85	16	114	22	71	10
Acetamiprido	50	10	79	13	102	15	72	15
Ametrina	23	22	83	18	79	13	80	8
Aramita	69	26	84	17	81	18	85	11
Atrazina	69	22	91	10	84	14	88	16
Azaconazol	74	16	70	18	74	27	116	9
Azametifós	85	9	88	14	86	20	70	10
Azifós Metílico	80	15	71	15	80	20	76	11
Azoxistrobina	83	16	75	15	86	22	90	17
Benfluracarbe	49	17	74	13	94	13	88	18
Bifentrina	148	18	118	5	105	10	103	1
Boscalida	71	15	79	12	96	19	112	12
Bromofós etílico	85	24	93	16	92	5	82	10
Buprofezina	64	19	83	19	92	17	82	12
Carbendazin	50	16	119	17	91	16	73	13
Carbofurano	114	11	114	7	107	4	98	7
Carbofenotion	38	63	98	15	112	7	107	2,
Carbosulfano	86	6	98	17	83	29	70	13
Carboxina	94	7	90	8	96	10	92	9
Clorimuron etílico	68	19	101	15	77	24	79	15

Tabela 18 – Recuperação dos analitos nos níveis avaliados

(continuação)

Agrotóxico	Níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	10		20		50		100	
	Rec %	%RSD	Rec %	%RSD	Rec %	%RSD	Rec %	%RSD
Clorpirifós etílico	91	17	76	4	78	20	96	12
Clorpirifós metílico	76	18	139	19	82	10	86	7
Cresoxin metílico	49	20	124	15	84	17	71	9
Ciflutrina	113	14	96	6	108	5	105	8
Cipermetrina	86	10	91	5	99	14	106	10
Ciproconazol	91	16	104	12	115,5	7	104	5
Diclofluanida	121	17	112	27	92	18	81	12
Dicrotofós	106	8	109	16	95	7	107	3
Diflubenzuron	55	16	31	20	84	15	87	13
Dimetenamid-p	131	16	89	16	75	14	105	13
Dimetoato	44	20	83	19	75	20	91	7
Diurum	55	19	98	19	101	20	6	14
Epoconazol	89	11	113	23	126	18	78	19
Etiprole	54	23	73	22	64	23	98	16
Etoprofós	47	20	87	24	31	19	89	10
Fenbuconazole	70	21	79	22	76	7	74	10
Fenvalerato	n.q	n.q	109	8,7	125	6,2	118	8
Finarimol	75	2	101	26	74	18	105	21
Flutriafol	71	20	64	24	70	27	71	13
Forato	53	18	72	21	77	21	86	15
Imidacloprido	67	16	98	18	14	19	89	15
Indoxacarbe	63	19	96	25	83	19	98	18
Iprodiona	35	16	114	18	112	9	108	2
Linurom	72	18	84	21	71	18	93	12
Malationa	93	14	101	19	100	11	72	5
Mepronil	123	10	104	15	125	10	105	12
Metamidofós	44	11	25	15	17	12	26	15
Metconazol	n.q	n.q	100	14	104	21	100	16
Metomil	75	20	76	20	95	14	81	15
Metsulfuron metílico	70	13	45	11	81	20	82	10
Monocrotofós	59	18	75	29	96	19	54	8
Monolinurom	70	15	58	6	83	15	84	14
Ometoato	42	9	8	15	5	16	24	19
Parationa metílica	88	5	98	19	121	7	106	2
Pendimetalin	105	9	111	12	102	4	106	2
Picloram	95	14	89	13	114	7	79	21
Pirazofós	99	27	101	18	85	15	77	18

Tabela 18 – Recuperação dos analitos nos níveis avaliados

(conclusão)

Agrotóxico	Níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	10		20		50		100	
	Rec %	%RSD	Rec %	%RSD	Rec %	%RSD	Rec %	%RSD
Pirimetanil	25	21	74	16	86	20	83	13
Pirimicarbe	74	17	73	18	56	19	37	18
Pirimifós metílico	103	17	108	17	93	2	106	3
Procloraz	54	20	79	17	80	12	25	10
Profenofós	86	20	116	18	89	13	85	19
Propoxur	19	20	119	8	113	4	86	13
Simazina	36	15	70	19	89	17	91	11
Tebuconazol	119	18	75	18	83	11	93	11
Terbufós	60	19	62	17	76	13	92	12
Tiabendazol	49	18	65	20	63	21	65	20
Tiacloprido	90	19	77	19	84	17	62	17
Tiametoxan	120	6	121	14	23	16	86	5
Tiodicarb	70	18	91	14	85	16	72	8
Tolclofós metílico	70	16	81	13	72	19	78	11
Triazofós	85	18	56	15	77	20	52	5
Triciclazole	74	14	111	11	81	9	107	20
Trifloxistrobina	67	18	97	24	80	15	88	19
Triflumizol	68	17	74	15	73	19	72	17
Triflumurom	16	32	74	20	70	15	52	13
Triticonazol	42	18	47	17	62	12	75	6

Os resultados mostraram que o procedimento tem boa recuperação para a maioria dos analitos estudados. Todos os níveis de fortificação apresentaram recuperação acima de 50% dos analitos. As fortificações nas concentrações de 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ apresentaram recuperações acima de 90% dos compostos avaliados. As menores recuperações foram verificadas na concentração de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ onde 23% dos analitos apresentaram recuperação abaixo de 50% e 24% apresentaram recuperação entre 50 e 70%.

Zhang *et al.* (2011) em seu trabalho relatou que 25% dos analitos avaliados apresentaram recuperação menor que 70% na faixa de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e recuperações entre 79% e 84% para os níveis de concentração mais altos 25, 100, and 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras de *commodities* agrícolas utilizando acetonitrila, extração em fase sólida dispersiva e HPLC-MS/MS. Valores de recuperação abaixo de 70% também foram relatadas no trabalho de Kolberg *et al.* (2011) nas concentrações

de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para amostras de trigo e farinha de trigo utilizando GC-MS.

Os analitos que apresentaram recuperação abaixo de 70% na concentração de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ não estão previstos para serem aplicados na cultura de trigo, conforme IN nº 18, de 25 de junho de 2013 (BRASIL, 2013). Os desvios padrão das repetições nas quatro fortificações preparadas foram maiores que 20% para 14% dos compostos na concentração de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo diminuída para concentrações maiores, 13%, 10% e 1%, para os níveis 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente. Segundo Horwitz (1982) a medida que a concentração do analito decresce em duas ordens de grandeza o desvio padrão aumenta com um fator de dois.

A Figura 32 apresenta a distribuição das porcentagens de recuperações obtidas no procedimento nas concentrações avaliadas.

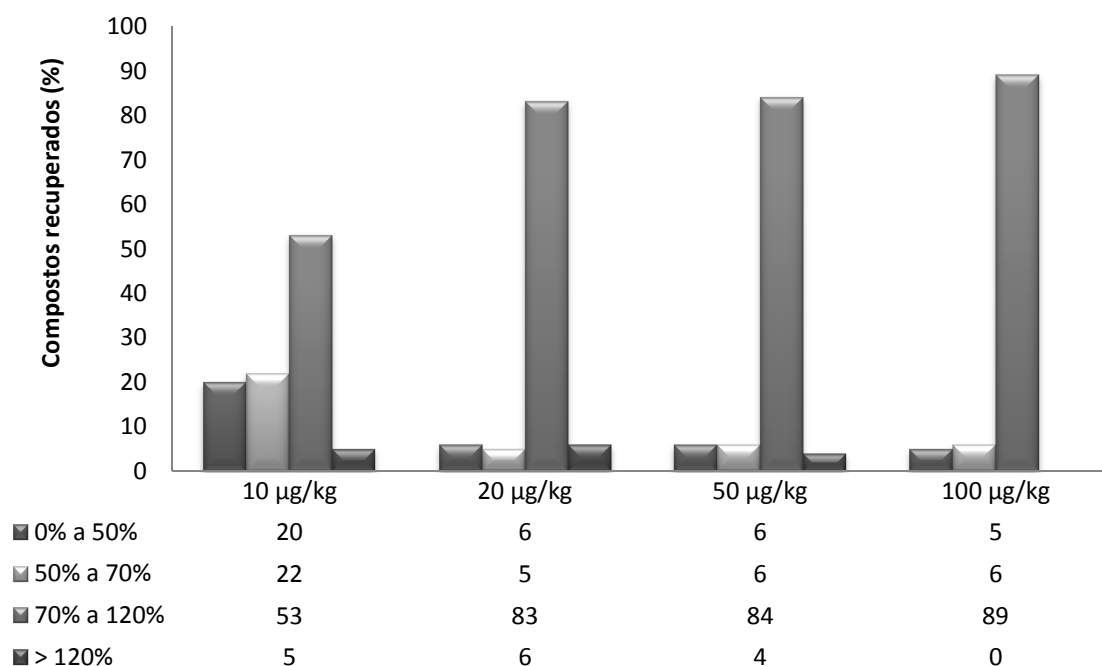


Figura 32 - Percentual de agrotóxicos que apresentaram faixas de recuperação de 0 a 50%, entre 50 e 70%, entre 70 e 120% e >120%, após ensaios de recuperação.

Para comparação da eficiência do método foi realizada a extração pelo método QuEChERS. Para comparação da eficiência do método foi realizada a extração pelo método QuEChERS com as amostras de trigo fortificadas a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e se obteve os resultados apresentados na Tabela 19:

Tabela 19 – Recuperação dos analitos utilizando extração QuEChERS

% Recuperação	Agrotóxicos recuperados
0 a 50%	12
50 a 70%	19
70 a 120%	44
> 120%	3

O método QuEChERS mostrou menores recuperações que o procedimento estudado para os seguintes analitos: abamectina, aramita, atrazina, buprofezina, carbendazin, clorpirifós metil, clorpirifós etil, cresoxin, etiprole, finarimol, linuron, forato, profenofós, simazina, tebuconazol, terbufós, tolcofós metil, triciclazole triticonazo. Todos os agrotóxicos com recuperações menores apresentam solubilidade em água menor que 64 g L^{-1} . Os resultados mostraram que as recuperações maiores que o procedimento estudado foi determinado para os analitos: febuconazol, malationa, monocrotofós, pirimicarbe, tiacloprido, que apresentam solubilidade em água acima de 145 g L^{-1} . O acetato de etila possui menor solubilidade em água, 7,7% em massas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, enquanto que acetonitrila é totalmente solúvel em água, o que favorece a extração de analitos de menor polaridade (SMALLWOOD, 1996). Os resultados concordam com o trabalho de PAN *et al.*, (2008), que colocam a acetonitrila como um solvente mais polar que acetato de etila, sendo mais eficiente para extração de multiresíduos de agrotóxicos. O trabalho de Mol *et al.*, (2003) relata a alta eficiência do acetato de etila para extração de agrotóxicos organofosforado em vegetais e frutas, quando comparado com outros solventes.

4.3.5 Precisão

A avaliação da precisão do método foi realizada utilizando 3 níveis de concentração analisados em 4 repetições. Os resultados da repetitividade foram inicialmente avaliados estatisticamente através do teste de Grubbs a fim de verificar a presença de valores extremos nas concentrações de 10, 50 e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e após foi aplicado o teste de HorRat. O método apresentou repetitividade, pois os resultados do teste ficaram menores que o valor de referência. O parâmetro é considerado aceitável quando o resultado do teste de for < 2 (AOAC, 2012). A precisão intermediária foi realizada através da análise dos mesmos níveis de concentração da repetitividade, mas com resultados de análises

realizadas em dias diferentes e pelo mesmo analista. Foram tratados os resultados dos analitos que apresentaram recuperações acima de 70% nos níveis de fortificação estudados. Os resultados foram avaliados utilizando o teste t em quatro repetições. O valor crítico para aceitar a hipótese nula de que os resultados são significativamente diferentes é de 3,182, estabelecido pela Tabela do teste t. Os resultados da análise estatística estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 – Resultados da avaliação da precisão do procedimento

(continua)

Agrotóxico	Repetitividade			Precisão intermediária		
	Teste de HorRat			Teste t		
	100 µg kg ⁻¹	50 µg kg ⁻¹	10 µg kg ⁻¹	100 µg kg ⁻¹	50 µg kg ⁻¹	10 µg kg ⁻¹
Abamectina	0,317	0,303	0,520	0,778	4,559	0,775
Acetamiprido	0,143	0,303	n.q.	0,349	1,180	n.q.
Ametrina	0,191	0,224	n.q.	3,136	7,830	n.q.
Aramita	0,057	0,168	n.q.	2,350	2,637	n.q.
Atrazina	0,073	0,289	n.q.	1,774	0,681	n.q.
Azaconazol	0,231	0,146	0,363	2,748	3,037	1,271
Azametifós	0,420	0,442	0,476	3,020	1,303	1,005
Azifós Metílico	0,186	0,124	0,413	3,189	1,245	0,846
Azoxistrobina	0,139	0,152	0,610	1,316	3,610	3,432
Benfluracarbe	0,315	0,179	0,328	0,163	0,067	1,372
Bifentrina	0,020	0,160	0,260	-3,073	-2,191	1,732
Boscalida	0,216	0,296	0,363	0,814	0,915	2,384
Bromofós etílico	0,110	0,240	0,520	0,688	0,455	0,129
Buprofezina	0,109	0,436	n.q.	-2,062	-1,004	n.q.
Carbendazin	1,008	0,327	n.q.	-2,315	-1,471	n.q.
Carbofurano	0,523	0,177	0,378	-0,048	-2,370	0,933
Carbofenotion	0,100	0,250	1,520	-0,162	-0,686	-1,528
Carbosulfano	0,203	0,257	0,384	-2,865	-1,672	-8,816
Carboxina	0,170	0,284	0,190	1,427	-0,229	0,839
Clorimuron etílico	0,231	0,139	n.q.	3,132	7,596	n.q.
Clorpirifós etílico	0,239	0,139	0,212	1,436	0,981	1,000
Clorpirifós metílico	0,202	0,283	0,342	1,532	1,742	0,522
Cresoxin metílico	0,190	0,250	n.q.	3,156	1,668	n.q.
Ciflutrina	0,170	0,030	0,210	0,898	-0,378	-3,000
Cipermetrina	0,090	0,260	n.q.	-1,782	0,617	n.q.
Ciproconazol	0,110	0,200	1,550	0,302	1,145	-0,655
Diclofluanida	0,079	0,379	0,503	2,819	0,684	-0,167
Dicrotofós	0,230	0,860	0,450	-2,748	4,541	-1,987

Tabela 20 – Resultados da avaliação da precisão do procedimento

(continuação)

Agrotóxico	Repetitividade			Precisão intermediária		
	Teste de HorRat			Teste t		
	100 µg kg ⁻¹	50 µg kg ⁻¹	10 µg kg ⁻¹	100 µg kg ⁻¹	50 µg kg ⁻¹	10 µg kg ⁻¹
Diflubenzuron	0,342	0,736	n.q.	-0,546	-0,161	n.q.
Dimetenamid	0,230	0,861	0,45	-0,520	-0,542	-0,522
Dimetoato	0,222	0,109	n.q.	2,153	2,313	n.q.
Diurom	0,112	0,230	n.q.	1,823	-0,501	n.q.
Epoxiconazol	0,169	0,209	0,363	1,732	0,374	-0,083
Etiprole	0,062	0,128	n.q.	-0,786	7,295	n.q.
Etoprofós	0,251	0,303	n.q.	0,589	3,140	n.q.
Fenbuconazole	0,350	0,080	0,580	-0,236	-2,325	-1,000
Fenvalerato	0,230	0,150	n.q.	2,292	-3,160	n.q.
Finarimol	0,069	0,140	0,477	-2,231	1,221	-0,513
Flutriafol	0,069	0,140	0,477	-2,231	1,221	-0,513
Forato	0,092	0,085	n.q.	3,155	2,159	n.q.
Imidacloprido	0,230	n.q.	n.q.	0,022	n.q.	n.q.
Indoxacarbe	0,193	0,281	n.q.	-0,359	-0,107	n.q.
Iprodiona	0,260	0,290	0,480	0,875	2,043	0,655
Linurom	0,193	0,318	0,189	1,386	3,160	2,460
Malationa	0,314	0,414	0,481	0,273	-0,030	-0,926
Mepronil	0,280	0,220	0,250	-0,375	0,495	-0,361
Metamidofós	1,110	0,300	n.q.	-0,9929	0,358	n.q.
Metconazol	0,270	0,350	n.q.	0,736	0,199	n.q.
Metomil	0,144	0,310	0,413	1,448	0,901	-0,523
Metsulfuron metílico	0,176	0,312	0,202	-0,012	2,247	1,143
Monocrotofós	0,172	0,378	n.q.	0,656	-3,151	n.q.
Monolinurom	0,146	0,300	0,386	2,927	0,004	3,671
Ometoato	0,319	0,211	n.q.	-0,927	3,082	n.q.
Parationa metílica	0,170	0,160	0,360	1,157	-1,320	1,192
Pendimetalin	0,120	0,240	0,290	-0,365	1,169	3,000
Picloram	0,146	0,100	0,319	-0,129	2,611	-0,333
Pirazofós	0,181	0,353	0,413	3,134	-0,516	-0,051
Pirimetanil	0,117	0,299	n.q.	-0,247	0,946	n.q.
Pirimicarbe	0,229	0,192	0,278	0,834	3,127	-2,586
Pirimifós metílico	0,130	0,160	0,380	-0,270	1,362	-3,167
Procloraz	0,254	0,352	n.q.	1,013	1,348	n.q.
Profenofós	0,161	0,048	0,190	0,169	-1,817	2,773
Propoxur	0,170	0,123	n.q.	3,145	-3,143	n.q.
Simazina	0,080	0,123	n.q.	-1,319	-0,279	n.q.
Tebuconazol	0,082	0,124	0,425	0,865	0,239	0,908

Tabela 20 – Resultados da avaliação da precisão do procedimento

(conclusão)

Agrotóxico	Repetitividade			Precisão intermediária		
	Teste de HorRat			Teste t		
	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Terbufós	0,198	0,231	n.q.	-1,228	3,087	n.q.
Tiabendazol	0,058	0,241	n.q.	-0,057	-0,640	n.q.
Tiacloprido	0,219	0,213	0,292	3,076	2,247	1,492
Tiametoxan	0,183	0,308	0,367	-0,518	-0,518	2,998
Tiodicarb	0,075	0,308	0,368	1,790	-1,242	1,044
Tolclofós metílico	0,098	0,135	0,202	1,237	3,153	0,905
Triazofós	-1,278	0,300	1,819	-1,278	3,000	1,819
Triciclazole	0,079	0,037	0,240	1,208	-2,159	-1,351
Trifloxistrobina	0,208	0,037	n.q.	0,148	-2,161	n.q.
Triflumizol	0,134	0,161	n.q.	-1,161	-0,134	n.q.
Triflumurom	0,043	0,122	n.q.	-0,182	n.q.	n.q.
Triticonazol	0,171	0,181	n.q.	-0,362	n.q.	n.q.

n.q.= não quantificado

Os resultados mostraram boa precisão intermediária do procedimento avaliado. Os princípios ativos abamectina, azaconazol, clorpirifós etílico, dicrotofós e etiprole apresentaram diferença significativa na precisão intermediária no nível de concentração de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Este nível de concentração apresentou desvio padrão relativo acima de 20% para estes compostos, refletindo assim na precisão intermediária. Os princípios ativos abamectina, azaconazol, clorpirifós etílico e dicrotofós que apresentaram este comportamento, não são monitorados para a cultura do trigo. O agrotóxico etiprole é recomendado para ser utilizado como inseticida para trigo pela IN nº 18 de 2013, entretanto, o limite máximo permitido para cultura é de 1 mg kg^{-1} , concentração muito maior que 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, onde não apresentou precisão intermediária (BRASIL, 2013) não comprometendo, assim, o método no monitoramento deste princípio ativo tendo em vista que apresentou resultados satisfatórios para a concentração de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A literatura relata a medida da precisão dos resultados, geralmente, com base na porcentagem de recuperação dos analitos (LI *et al.*, 2013; PAN *et al.*, 2008; ROMERO-GONZÁLEZ *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2011). Considerando os valores de recuperação, se obteve uma distribuição semelhante aos conseguidos na repetitividade e em consonância com os relatados na literatura. O trabalho de Banerjee *et al.* (2007) relata a avaliação da precisão através da equação de

HorRat, os resultados mostraram o método satisfatório, com todos os analitos obtendo valor < 2 . A utilização de HorRat na avaliação da repetitividade do método também foi utilizada no trabalho de Kanrar *et al.* (2010) onde os resultados calculados na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ obtiveram valores < 2 , sendo assim satisfatórios no parâmetro avaliado.

Este estudo também considerou os valores de RSD (%) na avaliação da repetitividade do método na concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os resultados ficaram entre 1 e 21%, sendo que apenas para o agrotóxico picloram se obteve o RSD de 21%, pode-se assim afirmar que 99% dos analitos avaliados estão de acordo com o estabelecido pela SANCO (2013).

4.3.6 Limite de detecção e limite de quantificação

A determinação dos valores de limites de detecção e quantificação, tanto para o instrumento quanto para o método foi realizada conforme descrito no item 3.10.6. O LOQ_i variou de 0,5 a $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e o LOD_i , determinado como sendo 3,33 vezes menor que o LOQ_i variou de 0,15 a $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$. O LOQ_m , obtido como sendo o menor nível de fortificação, foi de 10 ou $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ e o LOD_m , a concentração 3,33 vezes menor que este valor, ou seja, 3,0 ou $7,5 \mu\text{g kg}^{-1}$, conforme apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 – Limites de detecção e quantificação dos instrumentos utilizados (em $\mu\text{g L}^{-1}$) e do método avaliado (em $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Agrotóxico	Instrumento		Método		Agrotóxico	Instrumento		Método	
	LD _i	LQ _i	LD _m	LQ _m		LD _i	LQ _i	LD _m	LQ _m
	Abamectina	0,3	1,0	6,7		20,0	Diurom	1,5	5,0
Acetamiprido	0,6	2,0	6,7	20,0	Forato	1,5	5,0	6,7	20,0
Ametrina	0,6	2,0	6,7	20,0	Imidacloprido	1,5	5,0	6,7	20,0
Aramita	1,5	5,0	6,7	20,0	Indoxacarbe	0,6	2,0	6,7	20,0
Atrazina	1,5	5,0	6,7	20,0	Iprodiona	3,0	10,0	3,3	10,0
Azaconazol	1,5	5,0	3,3	10,0	Linurom	3,0	10,0	3,3	10,0
Azametifós	0,6	2,0	3,3	10,0	Malationa	1,5	5,0	3,3	10,0
Azifós Metílico	3,0	10,0	3,3	10,0	Mepronil	1,5	5,0	6,7	20,0
Azoxistrobina	0,6	2,0	6,7	20,0	Metamidofós	1,5	5,0	6,7	20,0

(continua)

Tabela 21 – Limites de detecção e quantificação dos instrumentos utilizados (em $\mu\text{g L}^{-1}$) e do método avaliado (em $\mu\text{g kg}^{-1}$).

(conclusão)

Agrotóxico	Instrumento		Método		Agrotóxico	Instrumento		Método	
	LD	LQ	LD	LQ		LD	LQ	LD	LQ
Benfluracarbe	0,6	2,0	3,3	10,0	Metconazol	3,0	10,0	6,7	20,0
Bifentrina	0,3	1,0	3,3	10,0	Metomil	1,5	5,0	3,3	10,0
Boscalida	1,5	5,0	3,3	10,0	Metsulfuron metílico	0,6	2,0	3,3	10,0
Bromofós etílico	0,6	2,0	3,3	10,0	Monocrotofós	1,5	5,0	6,7	20,0
Buprofezina	0,6	2,0	6,7	20,0	Monolinurom	3,0	10,0	3,3	10,0
Carbendazin	0,6	2,0	6,7	20,0	Partiona metílica	0,6	2,0	3,3	10,0
Carbofurano	1,5	5,0	3,3	10,0	Ometoato	1,5	5,0	6,7	20,0
Carbofenotion	1,5	5,0	3,3	10,0	Pendimetalin	0,6	2,0	3,3	10,0
Carbosulfano	0,6	2,0	3,3	10,0	Picloram	3,0	10,0	3,3	10,0
Carboxina	1,5	5,0	3,3	10,0	Pirazofós	1,5	5,0	3,3	10,0
Ciflutrina	1,5	5,0	3,3	10,0	Pirimetanol	1,6	4,7	6,0	20,0
Clorimuron Etilico	0,6	2,0	6,7	20,0	Pirimicarbe	1,5	5,0	3,3	10,0
Clorpirifós etílico	1,5	5,0	3,3	10,0	Pirimifós metílico	1,5	5,0	3,3	10,0
Clorpirifós metílico	3,0	10,0	3,3	10,0	Profenofós	1,5	5,0	3,3	10,0
Cresoxin metílico	1,5	5,0	6,7	20,0	Propoxur	3,0	10,0	6,7	20,0
Ciflutrina	1,5	5,0	3,3	10,0	Pirimetanol	1,5	5,0	3,3	10,0
Cipermetrina	1,5	5,0	3,3	10,0	Simazina	1,5	5,0	6,7	20,0
Ciproconazol	1,5	5,0	3,3	10,0	Tebuconazol	0,6	2,0	3,3	10,0
Diclofluanida	3,0	10,0	3,3	10,0	Terbufós	1,5	5,0	6,7	20,0
Dicrotofós	0,6	2,0	3,3	10,0	Tiabendazol	0,6	2,0	6,7	20,0
Diflubenzuron	0,6	2,0	6,7	20,0	Tiodicarb	0,3	1,0	3,3	10,0
Epoxiconazol	3,0	10,0	3,3	10,0	Tiametoxan	0,6	2,0	3,0	10,0
Etiprole	3,0	10,0	6,7	20,0	Tolclofós metílico	1,5	5,0	3,3	10,0
Etoprofós	1,5	5,0	6,7	20,0	Triazofós	0,6	2,0	3,3	10,0
Fenbuconazole	1,5	5,0	3,3	10,0	Triciclazole	1,5	5,0	6,7	20,0
Fenvalerato	1,5	5,0	6,7	20,0	Trifloxistrobina	0,6	2,0	6,7	20,0
Finarimol	3,0	10,0	3,3	10,0	Triflumizol	0,3	1,0	6,7	20,0
Flutriafol	3,0	10,0	3,3	10,0	Triflumurom	1,5	5,0	6,7	20,0
Procloraz	1,5	5,0	6,7	20,0	Triticonazol	1,5	5,0	3,3	10,0

Os limites de detecção e quantificação determinados para o procedimento são adequados para atender a legislação vigente para os princípios ativos recomendados para a cultura do trigo. Os resultados também estão de acordo com os valores encontrados na literatura (GRANBY *et al.*, 2004; ROMERO-GONZÁLEZ *et al.*, 2011; LACINA *et al.*, 2012)

4.3.7 Estimativa da incerteza das medições

Foram calculadas as estimativas de incerteza das medições em dois níveis de concentração, 10 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os resultados estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 – Estimativa da incerteza de medição do método avaliado para determinação multirresíduo de agrotóxicos em trigo por LC-MS/MS e GC-MS/MS ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

(continua)

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
	10	100		10	100
Abamectina	2,0	21,5	Forato	2,5	9,7
Acetamiprido	2,0	8,3	Imidacloprido	1,9	10,3
Ametrina	2,6	5,7	Indoxacarbe	1,8	13,3
Aramita	3,0	8,7	Flutriafol	2,1	7,6
Atrazina	2,1	10,6	Iprodiona	2,2	10,9
Azaconazol	2,0	8,5	Linurom	2,0	8,7
Atrazina	3,0	8,7	Malationa	1,7	5,6
Azaconazol	2,1	10,6	Mepronil	2,5	7,5
Azametifós	1,6	5,7	Metamidofós	1,5	7,7
Azifós Metílico	1,8	6,5	Metconazol	1,6	5,7
Azoxistrobina	1,9	10,4	Metomil	1,9	10,7
Benfluracarbe	2,3	12,3	Metsulfuron metílico	2,3	6,8
Bifentrina	2,3	6,8	Monocrotofós	2,3	6,4
Boscalida	2,0	10,1	Monolinurom	2,0	9,3
Bromofós etílico	2,1	9,8	Ometoato	2,3	7,9
Buprofezina	2,2	7,9	Partiona metílica	2,3	10,5
Carbendazim	2,2	8,0	Pendimetalin	2,7	9,5
Carbofurano	1,9	7,7	Picloram	1,6	12,6
Carbofenotion	2,0	9,5	Pirazofós	2,1	10,6
Carbosulfano	1,5	6,9	Pirimetanil	2,5	14,5
Carboxina	1,5	6,7	Pirimicarbe	3,0	11,5
Ciflutrina	2,3	6,3	Pirimifós metílico	3,2	10,0
Clorimuron Etílico	2,1	8,9	Procloraz	2,0	7,9
Clorpirifós etílico	1,8	9,1	Profenofós	1,9	12,0
Clorpirifós metílico	1,9	6,1	Propoxur	2,4	16,4
Cresoxin metílico	2,3	6,3	Simazina	2,0	7,4
Ciflutrina	1,8	5,3	Tebuconazol	2,2	7,9
Cipermetrina	1,7	5,6	Terbufós	2,2	8,3
Ciproconazol	1,7	5,7	Tiabendazol	2,4	7,1
Diclofluanida	2,1	7,5	Tiacloprido	1,8	8,7
Dicrotofós	1,8	5,1	Tiametoxan	1,7	10,9
Diflubenzuron	2,1	8,6	Tiodicarb	2,1	11,7
Diurom	2,4	7,3	Tolclofós metílico	2,0	13,7
Epoxiconazol	1,6	11,2	Triazofós	1,8	10,2
Etiprole	1,8	6,8	Triciclazole	2,0	11,2
Etoprofós	2,3	6,8	Trifloxistrobina	2,0	12,0

Tabela 22 – Estimativa da incerteza de medição do método avaliado para determinação multirresíduo de agrotóxicos em trigo por LC-MS/MS e GC-MS/MS ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

(continua)

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
	10	100		10	100
Fenbuconazole	2,7	6,2	Triflumizol	2,0	9,3
Fenvalerato	2,1	7,9	Triflumurom	1,7	19,2
Finarimol	1,9	16,3	Triticonazol	2,4	7,1

Os resultados mostram que as incertezas no nível de menor concentração variaram na faixa de 15 a 32% e no maior nível de concentração a variação foi de 5,1 a 21%, valores dentro do valor máximo estabelecido pela Sanco de até 50% do valor medido (SANCO, 2013).

O trabalho de Banerjee *et al.* (2007) apresenta os resultados da estimativa da incerteza para 82 agrotóxicos determinados em uvas. Os valores ficaram abaixo de 20% para todos os analitos avaliados.

O resultado da estimativa da incerteza das análises realizadas no trabalho de Sivaperumal *et al.* (2015) ficaram na faixa de 10 a 40% para os 60 agrotóxicos determinados em frutas e vegetais.

Na determinação de 160 agrotóxicos em vegetais por LC-MS/MS, Kmellár *et al.* (2008), estabeleceram como incerteza das medições o desvio padrão médio do procedimento estudado resultante da avaliação intralaboratorial. A fim de estabelecer a incerteza expandida o desvio padrão foi multiplicado por $k = 2$. O valor da incerteza do método ficou em $0,3002 \mu\text{g kg}^{-1}$ considerando um nível de nível de confiança de 95%.

Em recente trabalho Walorczyk (2014) determinou incerteza das medições onde foram analisados 22 agrotóxicos em groselha. Os resultados das incertezas ficaram na entre 7 e 53% com a incerteza média de 21%. Para a maioria dos compostos a incerteza foi de 30%. Segundo o autor, o valor mais alto de incerteza (53%) foi em consequência da baixa recuperação e alto RSD.

Na determinação de agrotóxicos em águas por LC-MS/MS foi estimada a incerteza de medição de 15 agrotóxicos em água superficial. Os resultados ficaram entre 13 e 51% para todos os analitos, independente da faixa de concentração (MARGOUM *et al.*, 2013).

No trabalho de Kankar *et al.* (2010) foi validado e determinada a incerteza de medição para a determinação de 42 agrotóxicos em amostras de chá por LC-

MS/MS. O método desenvolvido apresentou incerteza menor que 20% para os analitos avaliados.

A determinação dos valores da estimativa da incerteza da medição permite uma avaliação ampla do método desenvolvido, pois define as contribuições dos erros sistemáticos e aleatórios do processo, possibilitando avaliar e planejar melhorias a fim de minimizar tais erros e reduzir a incerteza da medição.

O limite de quantificação associado a incerteza permite avaliar se o resultado do método desenvolvido consegue quantificar o analito de modo a atender aos limites máximos de resíduos estabelecidos pela legislação. O método desenvolvido atende aos valores definidos pela Instrução Normativa nº 18, de 25 de junho de 2013 para a cultura do trigo (BRASIL, 2013), com exceção do agrotóxico cipermetrina que tem como LMR $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ e apresentou LOQ_m de $10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ e incerteza de $1,7 \mu\text{g kg}^{-1}$.

A figura 33 mostra o resultado da associação do limite de quantificação com os valores da incerteza, em relação ao limite máximo de resíduo dos agrotóxicos azoxistrobina (1), ciflutrina (2), carbosulfano (3), forato (4), metsulfurom-metílico (5), pirimicarbe (6), trifloxistrobina (7) e triflumizol (8).

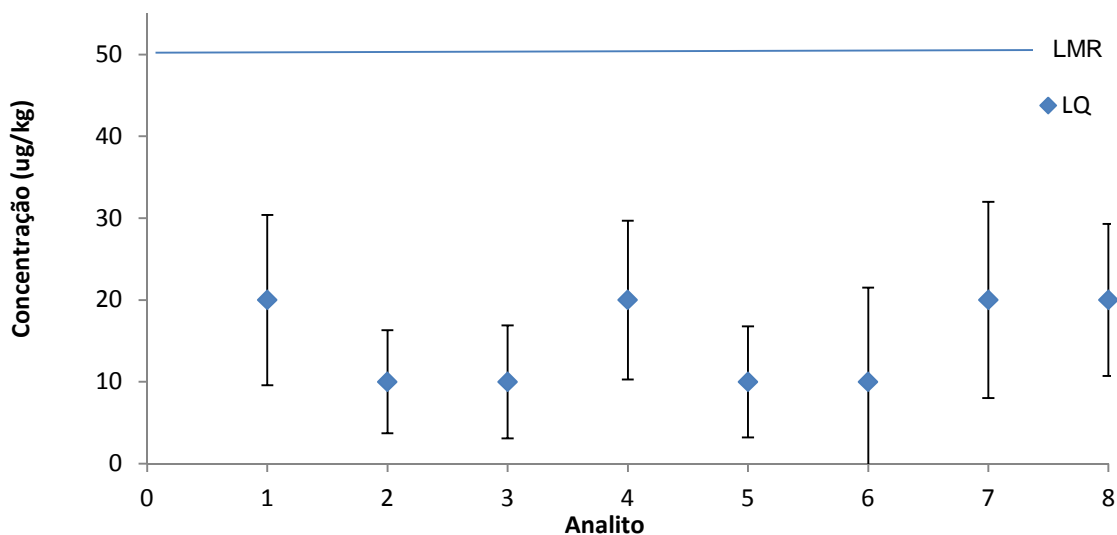


Figura 33 – Limite de quantificação do método \pm a estimativa da incerteza calculada para a faixa de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$.

5 CONCLUSÕES

Este estudo apresentou a avaliação de diferentes métodos de preparo de amostra para determinação multiresíduos em amostras de trigo por GC-MS/MS e LC-MS/MS. O trabalho utilizou planejamento fatorial a fim de avaliar os seguintes parâmetros: tipo de solvente, agitação, partição e limpeza dos extratos. Os resultados, quando submetidos a análise estatística, mostraram que para os analitos avaliados, a utilização de acetato de etila, ultrassom, ultracongelamento e C18 apresentou diferença significativa para a maioria dos analitos. O método foi validado na faixa de 10 a 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e foram confirmadas a normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos. O efeito matriz mostrou a necessidade de a quantificação ser realizada com a curva preparada no extrato branco da matriz. O Teste de Grubbs permitiu a avaliação da presença de valores extremos antes dos cálculos da recuperação. As fortificações nas concentrações de 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ apresentaram recuperações acima de 90%. As menores recuperações foram verificadas na concentração de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ onde 23% dos analitos apresentaram recuperação abaixo de 50% e 24% apresentaram recuperação entre 50 e 70%. A precisão se mostrou adequada nos parâmetros de repetitividade e precisão intermediária após os testes aplicados. A faixa de RSD (%) na concentração de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ficou entre 1 e 21%, sendo que apenas para o agrotóxico picloram se obteve o RSD de 21%. O LOQ_m , obtido como sendo o menor nível de fortificação foi adequado para quantificar os analitos estudados de acordo com a legislação vigente. A estimativa da incerteza das medições foi determinada em dois níveis de concentração 10 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os resultados mostram que as incertezas no nível de menor concentração variaram na faixa de 15 a 32% e no maior nível de concentração a variação foi de 5,1 a 21%, sendo que estes valores são adequados para determinação dos analitos estudados, com exceção do agrotóxico cipermetrina que tem como LMR 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e apresentou LOQ_m de 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e incerteza de 1,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Os resultados da validação mostraram que o método desenvolvido se apresentou adequado para determinação dos agrotóxicos estudados mostraram a confiabilidade analítica para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de trigo.

DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os ensaios necessários à execução do estudo foram realizados no Laboratório de Cromatografia da Universidade de Passo Fundo (UPF). O laboratório já tem implantado um sistema de segregação de resíduos químicos conforme as normas institucionais. Os resíduos sólidos foram segregados e armazenados em sacos plásticos pretos e devidamente identificados. Os resíduos líquidos foram acondicionados em bombonas plásticas identificadas de acordo com sua classificação. Estes resíduos são coletados pelo setor de Saneamento Ambiental da UPF, que foi criada no ano de 2004. O setor conta com a Central de Resíduos da FUPF. Esse local é específico para o armazenamento temporário dos resíduos gerados, os quais são acondicionados separadamente e identificados por classe de acordo com a Norma Brasileira (NBR) nº 10.004/2004, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), para posterior transporte, tratamento e destino final, junto a empresas terceirizadas e licenciadas ambientalmente.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Ampliar do escopo de agrotóxicos a serem analisados em amostras de trigo visando atender os princípios ativos autorizados pela cultura, conforme a IN nº 18, de 25 de junho de 2013.
- Avaliar a necessidade da etapa de limpeza dos extratos após a utilização do ultracongelamento na etapa de partição dos analitos.
- Avaliar a utilização de outros solventes ou mistura de solventes a fim de extrair compostos de diferentes polaridades.
- Avaliar a aplicação do método desenvolvido a fim de monitorar a qualidade do trigo, para os princípios ativos validados, comercializado no RS
- Avaliar a aplicação do método desenvolvido nos produtos produzidos a base de trigo, como pão, biscoito e massas.
- Avaliar a aplicação do método em outras matrizes de cereais, frutas e hortaliças.

6 REFERÊNCIAS

AACC - **American Association Of Cereal Chemists**. Approved methods of the AACC. Method 56-11. 11. ed. St Paul, MN, 2000.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro, 43 p, 2005.

ABNT - **Associação Brasileira De Normas Técnicas; Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Guia para a Expressão da Incerteza da Medição (GUM)**. 3. ed. Rio de Janeiro, 2003.

ALDER, L.; GREULICH, K.; KEMPE, G.; VIETH, B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC–MS or LC–MS/MS? **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, p. 838– 865, 2006.

ALI, M. M; SHARMA, S.C. Robustness to nonnormality of the Durbin-Watson test for autocorrelation. **Journal of Econometrics**. V.57, p. 117-136, 1993.

ANNESLEY, T. M. Ion Suppression in Mass Spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 49:7, p. 1041–1044, 2003.

AOAC – **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 19 th edition, Apendiz D, 2012.

ARDREY, R. E.; **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction**, Wiley: Huddersfield, 2003.

ALVES FILHO, J. **Uso de Agrotóxicos no Brasil**. Editora Annablume. São Paulo, 188 p. 2002.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/ partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANDERSSON, A.; PÅLSHEDEN, Comparison of the efficiency of different GLC multi-residue methods on crops containing pesticide residues H.; **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**. v. 339, p. 365-367. 1991.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). 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>. Acesso em 10 jul 2014.

ANVISA. . Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agrotóxicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/monografias/index.htm>. Acesso novembro 2013.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+>

Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias.
Acesso em 10 jul de 2014.

ANVISA. **Guia para Qualidade em Química Analítica**. Brasília. 76 p. 2005.

BALINOVA, A.; MLADENOVA, R.; SHTEREVA, D. Solid-phase extraction on sorbents of different retention mechanisms followed by determination by gas chromatography–mass spectrometric and gas chromatography–electron capture detection of pesticide residues in crops. **Journal of Chromatography A**, v. 1150, p. 136–144, 2007.

BANERJEE, K.; OULKAR, D. P.; DASGUPTA, S.; PATIL, S. B.; PATIL, S. H.; SAVANT, R.; ADSULE, P. G. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1173, p. 98–109, 2007.

BEYER, A.; BIZIUK, M. Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. **Food Chemistry**, v.108, p. 669–680, 2008.

BARIZON, R. R. M; SPADOTTO, C. A.; SOUZA, M. D.; QUEIROZ, S. C. N. FERRACINI, V. L. **Análise das violações encontradas em alimentos nos programas nacionais de monitoramento de agrotóxicos**. Embrapa Meio Ambiente, 18 p. Jaguariúna, SP, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>. Acesso em jul 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de Garantia da Qualidade Analítica. **Secretaria de Defesa Agropecuária**. Brasília: MAPA/ACS, 2011.

BRASIL. Lei nº 7802, de 11 julho de 1989. Lei Federal sobre Agrotóxicos. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos da embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília: **Diário Oficial da União**. DF, 12 de julho de 1989.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento **Instrução Normativa nº 18**, de 25 de junho de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto Federal nº 4074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989. Brasília: **Diário Oficial da União**. DF, 08 de janeiro de 2002.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, p. 529-37. 2000.

CANZIANI, J.R., GUIMARÃES, V.D.A. O trigo no Brasil e no mundo: cadeia de produção, transformação e industrialização. In: CUNHA, G.R. **Oficina sobre trigo no Brasil – Bases para construção de uma nova triticultura brasileira**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, p.29-72, 2009.

CHEMAT, F.; HUMA, Z. KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.18, p. 813–835, 2011.

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.

CHO, S. ABD, EL-ATY, A. M.MA.; PARK, K. H.; PARK, J.; ASSAYED, M.E.; JEONG, Y.; PARK, Y; SHIM, J. Simple multiresidue extraction method for the determination of fungicides and plant growth regulator in bean sprouts using low temperature partitioning and tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1414–1420, 2013.

CODEX ALIMENTARIUS, METHOD VALIDATION, JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME, Codex on Methods of Analysis and Sampling, Budapeste, 2010.

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

CONAB.Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília. v. 1, 2013.

COPTec. Cooperativa de Prestação de Serviços Técnicos. Disponível em: <http://www.coptec.org.br/coptec.html>. Acesso em 10 jul 2014.

COSTA, F. L.F.; ROHLFS, D. B.. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: implicações para saúde pública e meio ambiente. Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Programa de pós-graduação em biociências forenses. Disponível em: <http://www.cpgls.ucg.br/ArquivosUpload/1/File/V%20MOSTRA%20DE%20PROD%20UO%20CIENTIFICA/SAUDE/52.pdf>. Acesso em novembro de 2013

CROTTI, A. E. M; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, p. 287-292, 2006.

DANIEL, J. M.; FRIESS, D.; RAJAGOPALAN, S.; WENDT, S.; ZENOBI, R. Quantitative determination of noncovalent binding interactions using soft ionization mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v 216, p. 1–27, 2002.

De HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry Principles and Applications**. 3 ed. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2007. 489p.

DE VICARI, M. C. **Desenvolvimento de método para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo por UHPLC-MS/MS**. 2013. 216p. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

De SOUZA, S. V. C. **Procedimento para Validação Intralaboratorial de Métodos de Ensaio: Delineamento e Aplicabilidade em Análises de Alimentos**. 2007. 296 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

DONATO, F. F. **Resíduos de agrotóxicos em água potável usando SPE e determinação rápida por LC-MS/MS e GC-MS/MS**. (2012) Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

DONG, F.; Chen, X.; Liu, X.; XU, J.; LI, Y.; SHAN, W.; ZHENG, Y. Simultaneous determination of five pyrazole fungicides in cereals, vegetables and fruits using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1262, p. 98 – 106, 2012.

EC (*European Commission*). *Directorate General for Health & Consumers. Pesticides EU-MRLs: Updated on 11/10/2010*. Disponível em: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm. Acesso em: 11 jul 2014.

EC (*European Commission*). Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, 2002. L 221/8.

EMATER. **Acompanhamento da safra**. Safra 2012 / 2013. Atualizado em 04/03/2013. Porto Alegre, 2013. Disponível em http://www.emater.tche.br/site/arquivos_pdf/safra/safra/Tabela_06032013.pdf. Acesso em 11 jun 2014.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA) Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_40_210200792814.html. Acesso em 11 jun 2014.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). **Normas Técnicas Específicas Para A Produção Integrada De Trigo – NTEPIT**. Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Trigo. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/pit/pdf/normas%20pit%20completa%202013v2.pdf>. Acesso em 11 jun 2014.

EKMAN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, A.; KRAJ, A. **Mass Spectrometry: Instrumentation, interpretation and applications**. 3 ed. Jhon Wiley & Sons, 2009. 388 p.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: **LGC**, 61 p. 1998.

EURACHEM/CITAC. Quantifying uncertainty in analytical measurements. Teddington: LGC. 120 p. 2000

FERRER, C.; LOZANO, A.; AGUERA, A.; GIRON, A. J.; FERNANDEZ-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.

FRAC. Fungicide Resistance Action Committee. Disponível em <http://frac-brasil.org.br/frac/secao.asp?i=10&c=52>. Acesso em 11 jun 2014

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Brasil. Ministério da Saúde. **Controle de Vetores: Procedimentos de Segurança**. Brasília, DF.2001

GONZALEZ-CURBELO, M. A.; HERNANDEZ-BORGES, J.; BORGES-MIQUEL, T. M.; RODRIGUEZ-DELGADO, M. A. Determination of organophosphorus pesticides and metabolites in cereal-based baby foods and wheat flour by means of ultrasound-assisted extraction and hollow-fiber liquid-phase microextraction prior to gas chromatography with nitrogen phosphorus detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1313, p. 166–174, 2013.

GOSETTI, F.; MAZZUCCO, E. GENNARO, M. C. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p. 3929–3937, 2010.

GRANBY, K.; HINGE ANDERSEN, J.; CHRISTENSEN, H. B. Analysis of pesticides in fruit, vegetables and cereals using methanolic extraction and detection by liquid chromatography–tandem mass spectrometry **Analytica Chimica Acta**, v. 520, p. 165–176, 2004.

GRUBBS, F. E. . Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. **Technometrics**. v. 11, p. 1-21. 1969.

HERCEGOVA, A.; DOMOTOROVA, M.; MATISOVA, M.; OTREKALA, M., KIRCHNERA, R.; STEFUCA, V. Fast gas chromatography with solid phase extraction clean-up for ultratrace analysis of pesticide residues in baby food. **Journal of Chromatography A**, v. 1084, p. 46–53, 2005.

HIEMSTRA, M.; KOK, A; Comprehensive mult-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 3-25, 2007.

HERNANDEZ, F.; POZO, O. J.; SANCHO, J .V.; BIJLSMA, L.; BARREDA, M.; PITARCH, E.; Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites indifferent food commodities. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, p. 242-252, 2006.

HORWITR, W. Evaluation of Regulations Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. **Analytical Chemistry**, v. 54. p. 67-76, 1982.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=5&z=t&o=11&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1>. Acesso em: 10 de julho de 2014.

ISO-Guia para a expressão da incerteza de medição. Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM) 100:2008

ISO - International Organization for Standardizations. **ISO 5725-2**. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. Geneva: ISO, 1994. 42 p. (b)

ISO 5725-3:1994(2001). Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Part 3: Intermediate Measures of Precision of a Standard Measurement Method

IPAC -Instituto Português de Acreditação. **Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaios Químicos**. Lisboa. 19 p. 2007

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos: DOQ-CGCRE-008 rev 04**. Rio de Janeiro. 20 p. 2011.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Exemplos de estimativa de incerteza de medição ensaios químicos: DOQ-CGCRE-019 rev 03**. Rio de Janeiro. 28 p. 2013.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Cálculo da incerteza de medição na calibração de medidas materializadas de volume pelo método gravimétrico**. NIE-DIMEL-043 rev 00. 2003.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados**. 1ª ed Luso-Brasileira, JCGM 200:2012

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Avaliação de dados de medição — **Guia para a expressão de incerteza de medição**. JCGM 100:2008

IEA - Instituto de Economia Agrícola. Defensivos Agrícolas: comercialização recorde em 2011 e expectativas de acréscimo nas vendas em 2012. Disponível em <http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=12409>. Acesso em 11 jul 2014.

JEMAL, M.; SCHUSTER, A.; WHIGAN, D. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry methods for quantitation of mevalonic acid in human plasma and urine: method validation, demonstration of using a surrogate analyte, and demonstration of unacceptable matrix effect in spite of use of a stable isotope

analog internal standard **Rapid Commun. Mass Spectrom**, v.17, p.1723–1734, 2003

JUNGESI, A. H., FONTANAI, D. C., MELOI, R. W., Caracterização do cultivo de trigo na região norte do Estado do Rio Grande do Sul através das estimativas oficiais de área cultivada, produção e rendimento de grãos. **Ciência Rural**, v.42, p.41, 2012.

KANG, S.; CHANG, N.; ZHAO, Y.; PAN, C. Development of a Method for the Simultaneous Determination of Six Sulfonylurea Herbicides in Wheat, Rice, and Corn by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 9776–9781, 2011.

KANRAR, K.; MANDAL, S., BHATTACHARYYA, A. Validation and uncertainty analysis of a multiresidue method for 42 pesticides in made tea, tea infusion and spent leaves using ethyl acetate extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1217, p. 1926–1933, 2010.

KAUSHIK, R.; SARAN, S.; ISAR, J.; SAXENA, R.K. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p. 121-126, 2006.

KMELLÁR, B.; FODOR, P.; PAREJA, L.; FERRER, C.; MARTÍNEZ-UROZ, M. A.; VALVERDE, A.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1215, p. 37–50, 2008.

KMELLAR, B.; ABRANKÓ, P.; FODOR, P.; LEHOTAY, S.J. Routine approach to qualitatively screening 300 pesticides and quantification of those frequently detected in fruit and vegetables using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Food Additives and Contaminants Part A – Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**. v 27 p. 1415-1430, 2010.

KRAEMER, A.F.; MARCHESAN, E.; AVILA, L.A.; MACHADO, S.L.O.; GROHS, M. Destino ambiental dos herbicidas do grupo das imidazolinonas – revisão. **Planta Daninha**, v. 27, p. 629-639, 2009.

KRIEGER, R. (Ed.) **Hayes's Handbook of Pesticide Toxicology**. 3th ed. San Diego, CA, USA: Elsevier Inc., 2010. 522 p.

KOLBERG, D. I., PRESTES, O. D., ADAIME, M. B., ZANELLA, R. Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC–MS. **Food Chemistry**, v.125, p. 1436–1442, 2011.

LACINA, O.; ZACHARIASOVA, M.; URBANOVA, M.; CAJKA, T.; HAJŠLOVA, J. Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds

employing ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1262, p. 8 – 18, 2012.

LANÇAS, F.; McNAIR, H. M. Cromatografia em fase gasosa 1. Teoria elementar. **Química Nova**, p. 6-12. 1983

LEHOTAY, S.; SON, K. A.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U.; FU, W.; MASTOVSKA, K.; HOH, E.; LEEPIPATPIBOON, N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2548–2560, 2010

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

LI, P., YANG, X., MIAOB, H., ZHAO, Y., LIU, W., WU, Y. Simultaneous determination of 19 triazine pesticides and degradation products in processed cereal samples from Chinese total diet study by isotope dilution–high performance liquid chromatography–linear ion trap mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 781, p.63– 71, 2013.

LIU, S.; ZHENG, Z.; WEI, F.; REN, Y.; GUI, W.; WU, G.; ZHU, G. Simultaneous Determination of Seven Neonicotinoid Pesticide Residues in Food by Ultraperformance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58,p. 3271–3278, 2010.

MACIEL, J. L.; N; CHAVES, M. S.. Painel técnico: fungicidas triazóis no controle da ferrugem da folha do trigo. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/rcbptt/2rcbptt/pdf/6%20painel%20tecnico/Painel%20tecnico.pdf>. Acesso em 10 jul 2014.

MARGOUM, C.; GUILLEMAIN, C.; YANG, X. COQUERY, M. Stir bar sorptive extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of pesticides in water samples: Method validation and measurement uncertainty. **Talanta**, V. 116, p. 1–7, 2013.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, p. 1559-1568, 2010.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, p. 214-222, 2009.

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

MASTOVSKA,K. DORWEILER, K. J.; LEHOTAY, S.; WEGSCHEID, J., SZPYLKA, A. Pesticide Multiresidue Analysis in Cereal Grains Using Modified QuEChERS Method Combined with Automated Direct Sample Introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58,p. 5959–5972, 2010.

MARCHI, I.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. Atmospheric pressure photoionization for coupling liquid-chromatography to mass spectrometry: A review. **Talanta** v. 78, p. 1–18, 2009.

MELO, M. M.; OLIVEIRA, N. J. F.; LAGO, L. A. Intoxicações causadas por pesticidas em cães e galos. Parte I. Organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. **Revista de Educação Continuada**, v. 5, p. 188 – 195, 2002.

MOL, H. G. J; VAN DAM, R. C. J.; STEIJGER, O. M. Determination of polar organophosphorus pesticides in vegetables and fruits using liquid chromatography with tandem mass spectrometry: selection of extraction solvent. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, p.119–127, 2003.

MULTIGNER, J.L.. Effets retardés des pesticides sur la santé humaine. **Environnement, Risques & Santé**, v. 4, p. 187–194, 2005.

MULHOLLAND, M.; HIBBERT, D.B. Linearity and the limitations of least squares calibration. **Journal of Chromatography A**, v. 762, p. 73–82, 1997.

MURALIDHAR, R.V.; CHIRUMAMILA, R.R.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, p. 17-23, 2001.

NATA (National Association of Testinf Authorities – Australia). Technical note 17. Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods. NATA, 2013.

NÚÑEZ, O.; GALLART-AYALAA, H.; MARTINS, C. P. B.; LUCCI, P. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1228, p. 298– 323, 2012.

NÚÑEZ, O.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T.; LC–MS/MS analysis of organic toxics in food. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.24, p. 683, 2005.

NOUGADÈRE, A., RENINGER, JEAN-LUC VOLATIER, JEAN-CHARLES LEBLANC. Chronic dietary risk characterization for pesticide residues: A ranking and scoring method integrating agricultural uses and food contamination data. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1484–1510, 2011.

OLIVEIRA, F. A. S. **Validação de um método multirresíduos e multiclases para determinação e quantificação de 140 resíduos de agrotóxicos em leite através da técnica LC-MS/MS**. 2011. 142p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

OLIVEIRA JR. R. S. **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas. Mecanismos de ação de herbicidas**. 2011. Disponível em: <http://omnipax.com.br/livros/2011/BMPD/BMPD-cap7.pdf>. Acesso em 11 jul 2014.

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

PAYÁ, P.; ANASTASSIADES M.; MACK, D.; SIGALOVA, I. TASDELEN, B.; OLIVA, J. BARBA. A. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 1697–1714, 2007.

PAREJA, L.; FERNANDEZ-ALBA, A. R.; CESIO, V.; HEINZEN, H. Analytical methods for pesticide residues in rice. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30 p. 271-291, 2011.

PETTITT, A. N Testing the normality of Several Independent Samples using the Anderson-Darling Statistic. **Journal of the Royal Statistical Society, Series C (Applied Statistics)**, v. 26, p. 156-161, 1977

PINHO, G. P; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E.L.R; SILVÉRIO, F.. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Quimica Nova**, v. 32, p. 987-998, 2009.

PINHO, G. P; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E.L.R; SILVÉRIO, F. Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, v.21, p. 1307–1311, 2010.

PIRES, J. L. F., VARGAS L., CUNHA, G. R. **Trigo no Brasil Bases para produção competitiva e sustentável**. Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, 2011, 488 p.

PAN. Pesticide Action Network Pesticide Database. Chemical Classification. Disponível em http://www.pesticideinfo.org/Docs/ref_general3.html#Phosphonoglycine. Acesso em 11 jul 2014.

PRESTES, O.; 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 à espectrometria de massas. **Quimica Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.

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

RAHMAN, MD. M.; EL-ATY, A.M. A.; SHIM, JAE-HAN. Matrix enhancement effect: A blessing or a curse for gas chromatography?—A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 801, p.14– 21, 2013.

RAZALI, N. M.; WAH, Y.B. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lillefors and Anderson-Darling tests. **Journal of Multivariate Analysis**, v. 2 p. 23-33, 2011.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. **Journal of Chromatography A**, v. 1156, p. 201–205, 2007.

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

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M.C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar Figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p. 164-171, 2008.

ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M.; PRESTES, O. D.; GRIJO, S. L. Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 1477–1485, 2011.

ROGATSKY, E.; STEIN, S. Evaluation of matrix effect and chromatography efficiency: new parameters for validation of method development. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, n.11, p. 1757-1759, 2005

SALSTE, L.; EDWARDSSON, M.; PAGARD, U.; FLYGH, E.; LIEDGREN, A.; REBEDY, J.; PIHLSTÖM, T. **Simplified analysis of pesticide residues in food Matrix: Fruit and vegetables**. 8th European Pesticide Residue Workshop. EPRW. Strasbourg, França. 2010. 330 p.

SANCO, Comission of the European Communities (2003). Document nº SANCO /12571/2013. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 2013. 42 p.

SMALLWOOD, I.M. Handbook of organic solvent properties. 1996. Disponível em <http://env.nankai.edu.cn/>. Acesso em 15 jul 2014.

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides – Uma Visão Geral. **Alimentos e Nutrição**, v.18, p. 339-349, 2007.

SANTOS, A. Fitopatologia. Disponível em http://www.uesb.br/utilitarios/modelos/monta.asp?site=fitopatologia&tex=ii_02_fungicida.html. Acesso em 10 jul 2014.

SMALLWOOD, A. M. **Handbook of organic solvent properties**. Elsevier Ltd. 228 p. 1996.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F. Perdas de agrotóxicos, Embrapa Meio Ambiente. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_39_210200792814.html. Acesso em 10 jul 2014.

SILVA, M. F. O.; COSTA, L. M. A indústria de defensivos agrícolas. BNDES Setorial 35, p. 233 – 276. 2012. Disponível em: http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set3507.pdf. Acesso em 11 jul 2014.

SILVA, G. R. **Níveis de Agrotóxicos Organoclorados e Perfil Alimentar na Cidade Dos Meninos - Duque de Caxias, RJ, Brasil, entre 2003 e 2004.** 2009. 82p. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente)-Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2009.

SILVÉRIO, F. O.; SILVA, J. G. S.; AGUIAR, M. C.S.; CACIQUE, A. P.; PINHO, G. P. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 35, p. 2052-2056, 2012

SINDIVEG. Disponível em: <http://www.sindiveg.org.br/noticia.php?cod=2331>. Acesso em 10 jul 2014.

SINITOX (SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO FARMACOLÓGICAS), 2010. Disponível em: http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/b10.pdf. Acesso em 11 jul 2014.

SIVAPERUMAL, P.; ANAND, P.; RIDDHI, L. Rapid determination of pesticide residues in fruits and vegetables, using ultra-high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 168, p. 356–365, 2015.

SOUZA, L. A.; CUNHA, J. P. R. A.; PAVANIN, L.A. Deposição do herbicida 2,4-D Amina com diferentes volumes e pontas de pulverização em plantas infestantes. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, p. 78-85, 2012.

SOUZA, L. A.F. **Validação de metodologia analítica para determinação de resíduos de ditiocarbamatos em tomate por espectrofotometria.** 2009. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

SOUZA, S. V.C; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares Method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 25–35, 2005.

SOMOGYI, Á. Mass spectrometry instrumentation and techniques. **Medical Applications of Mass Spectrometry**. Ed. K. Vékey, A. Telekes and A. Vertes. Chapter 6. 2008.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; BOCKSTAELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, v.23, p. 535-552, 2004

TENG, Y.; XU, Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3900-3907, 2008.

TERUCHKIN, U. S. As exportações gaúchas pós As exportações gaúchas pós--crise internacional. **Indicadores Econômicos FEE**, v. 40, p. 33-44, 2012.

THAS, O.; OTTOY, J. P. Some generalizations of the Anderson–Darling statistic. **Statistics & Probability Letters**, v.64, p. 255–261, 2003.

THOMPSON, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. **Analyst**, v. 125, p. 385–386, 2000.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R., WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis. **Pure Applied Chemistry**, v. 74, p. 835–855, 2002.

TRAYNHAM T. L.; MYERS, D.ELAND J.; CARRIQUIRY, A. L.; JOHNSON, L. A. Evaluation of Water-Holding Capacity for Wheat–Soy Flour Blends. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 151–155, 2007.

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

VIM. Vocabulário Internacional de Metrologia. Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados. Inmetro, Rio de Janeiro, 2012.

WALKER, C.; CAMPBELL, K. G.; CARTER, B.; KIDWELL, K. Using the Solvent Retention Capacity Test When Breeding Wheat for Diverse Production Environments. **Crop Science Society of America**, v 48, p. 495–506, 2008.

WALORCZYK, S. Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1165, p. 200–212, 2007.

WALORCZYK, S. Validation and use of a QuEChERS-based gas chromatographic–tandem mass spectrometric method for multiresidue pesticide analysis in blackcurrants including studies of matrix effects and estimation of measurement uncertainty. **Talanta**, v. 120, p. 106–113, 2014.

WALORCZYK, S. Development of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry II. Improvement and extension to new analytes. **Journal of Chromatography A**, v.1208, p. 202–214, 2008.

WALORCZYK, S; DROZDYNSKI, D. Improvement and extension to new analytes of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry revisited. **Journal of Chromatography A**, v.1251, p. 219– 231, 2012.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 624-632, 1999.

WHO - World Health Organization. Geneva, 2009a. Disponível em: <http://www.who.int/topics/pesticides/en/>. Acesso em 10 jul 2014.

WILLIAMS, A. Measurement uncertainty in analytical chemistry. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 1, p. 14–17, 1996.

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

YAMASHITA, M. G. N. **Análise de rótulos e bulas de agrotóxicos segundo dados exigidos pela legislação federal de agrotóxicos e afins e de acordo com parâmetros de legibilidade tipográfica**. 2008. Dissertação (Mestrado em Desenho Industrial)-Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2008.

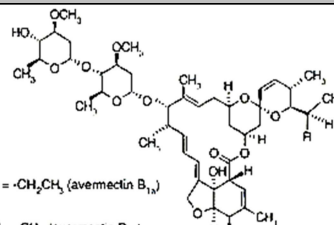
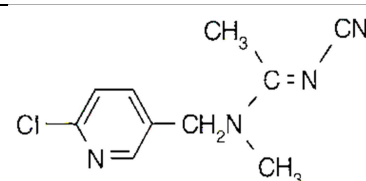
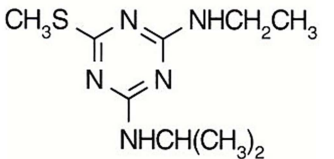
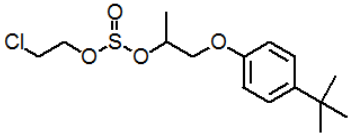
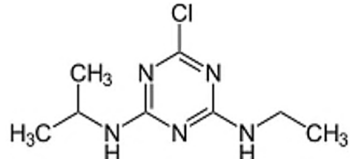
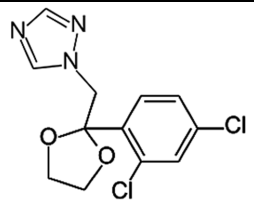
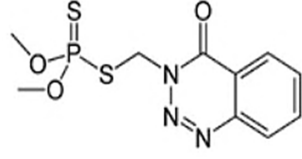
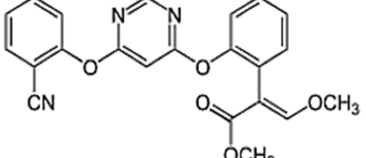
ZHANG, K.; WONG, J. W.; YANG, P.; TECH, K.; DIBENEDETTO, A. L.; LEE, N. S.; HAYWARD, D. G.; MAKOVI, C. M.; KRYNITSKY, A. J.; BANERJEE, K.; JAO, L.; DASGUPTA, S.; SMOKER, M.S.; SIMONDS, R.; SCHREIBER, A. Multiresidue Pesticide Analysis of Agricultural Commodities Using acetonitrile Salt-Out Extraction, Dispersive Solid-Phase Sample Clean-Up, and High-performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p.7636–7646, 2011.

APÊNDICE A

Propriedades químicas dos princípios ativos estudados.

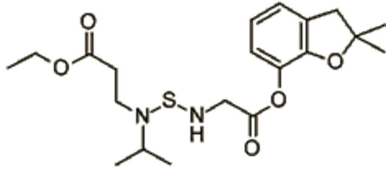
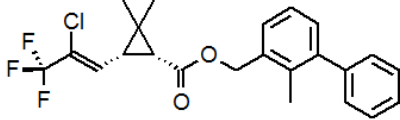
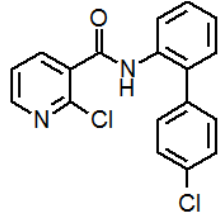
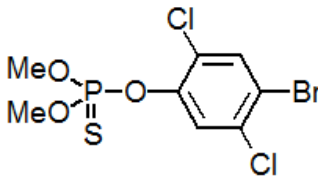
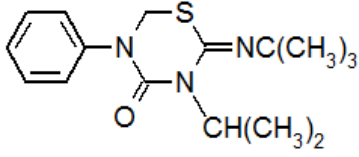
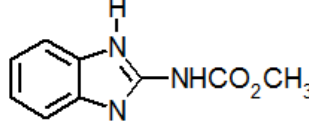
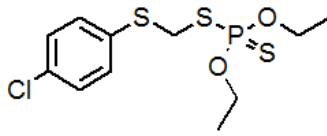
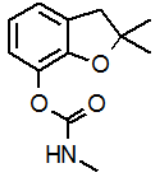
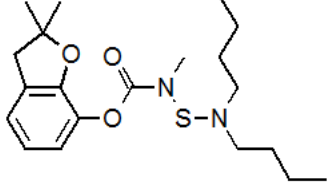
Propriedades químicas dos princípios ativos estudados.

(continua)

Princípio Ativo	Classe/ Grupo Químico	Fórmula Estrutural	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	Massa Molar (g mol ⁻¹)
Abamectina	Inseticida/ Avermectinas	 <p>(i) R = -CH₂CH₃ (avermectin B_{1a}) (ii) R = -CH₃ (avermectin B_{1b})</p>	O produto é emulsificante em água	873,08 (i) 859,05 (ii)
Acetamiprido	Inseticida/ Neonicotinóide		4250	222,7
Ametrina	Herbicida/ Trizina		200	227.3
Aramita	Inseticida/ Ester		0,59	334.87
Atrazina	Herbicida/ Triazina		33,0	215.68
Azaconazol	Inseticida/ Triazol		300	300, 14
Azinfós metílico	Inseticida/ Organofosforado		28	317, 33
Azoxistrobina	Fungicida/ Estrobilurina		6, 7	403, 39

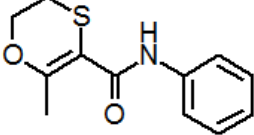
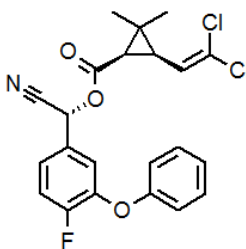
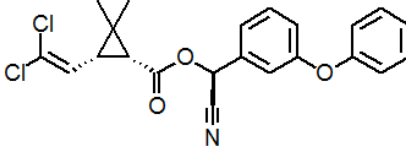
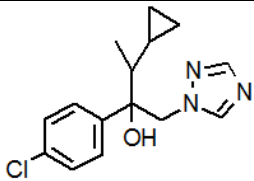
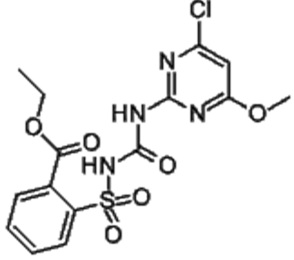
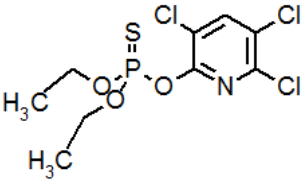
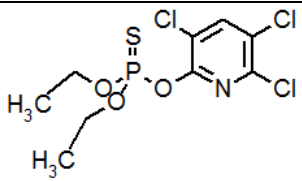
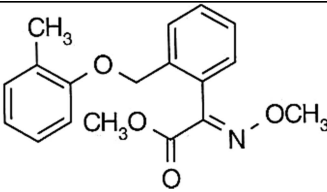
Propriedades químicas dos princípios ativos estudados.

(continuação)

Princípio Ativo	Classe/ Grupo Químico	Fórmula Estrutural	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	Massa Molar (g mol ⁻¹)
Benfluracarbe	Inseticida/ Carbamato		8,4	410,53
Bifentrina	Inseticida/ Piretróide		0,1	422,87
Boscalida	Fungicida/ Anilida		4,6	343.21
Bromofós etílico	Inseticida/ Acaricida		40	366.0
Buprofenzina	Inseticida/ Triazina		0,46	305,44
Carbendazin	Fungicida/ Carbamato		8	191,2
Cabofenotion	Inseticida/ Organofosforado		< 1	342.87
Carbofurano	Inseticida/ Carbamato		320	221.25
Carbosulfano	Inseticida/ Metilicocarbamato de benzofuranila		0,3	380.54

Propriedades químicas dos princípios ativos estudados.

(continuação)

Princípio Ativo	Classe/ Grupo Químico	Fórmula Estrutural	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	Massa Molar (g mol ⁻¹)
Carboxina	Fungicida/ Anilina		195	235.3
Ciflutrina	Inseticida/ Piretróide		2,0	434.29
Cipermetrina	Inseticida/ Piretróide		0,009	416.29
Ciproconazol	Fungicida/ Triazol		108	291.8
Clorimuron etílico	Herbicida/ Sulfoniluréia		1200	414,82
Clorpirifós etílico	Inseticida/ Organofosforado		2,74	322,53
Clorpirifós metílico	Inseticida/ Organofosforado		2,74	322,53
Cresoxin metílico	Fungicida/ Estrobilurina		2,0	313.8

Propriedades químicas dos princípios ativos estudados.

(continuação)

Princípio Ativo	Classe/ Grupo Químico	Fórmula Estrutural	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	Massa Molar (g mol ⁻¹)
Diclofluanida	Fungicida/ Sulfamida		13,0	333,23
Dicrotofós	Inseticida/ Organofosforado		100000	237,19
Diflubenzuron	Inseticida/ Benzoilureia		0,2	310,7
Dimeoato	Inseticida/ Organofosforado	$\text{CH}_3\text{NHCOCH}_2\text{SP}(\text{OCH}_3)_2$	2500	229,3
Dimetenamida-p	Herbicida/ Cloroacetamida		1450	275,8
Diurom	Herbicida/ Feniluréia		35,6	233,09
Epoxiconazol	Fungicida/ Triazol		8,42	329,76
Etiprole	Inseticida/ Fenilpirazol		9,2	397,20

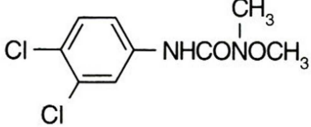
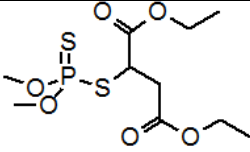
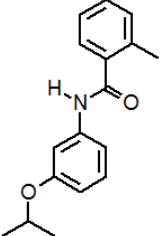
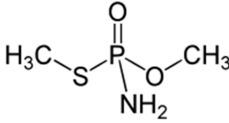
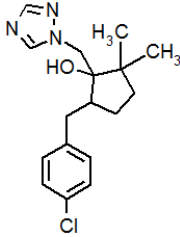
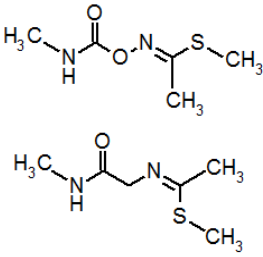
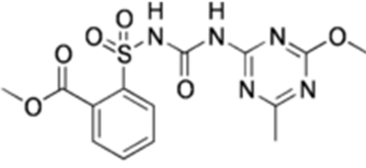
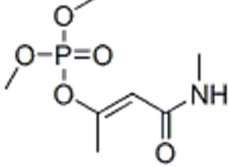
Propriedades químicas dos princípios ativos estudados.

(continuação)

Princípio Ativo	Classe/ Grupo Químico	Fórmula Estrutural	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	Massa Molar (g mol ⁻¹)
Etoprofós	Inseticida/ Organofosforado		1300	242,3
Febuconazol	Fungicida/ Triazol		0,2	336,8
Fenvalerato	Inseticida/ Piretróide		0,002	419,9
Flutriafol	Fungicida/ Triazol		130	301,3
Finarimol	Fungicida/ Pirimidinil carbinol		13,7	331,2
Forato	Inseticida/ Organofosforado		50	260,4
Imidacloprido	Inseticida/ Neonicotinóide		510	255,7
Indoxacarbe	Inseticida/ Oxadiazina		2,0	527,8
Iprodiona	Fungicida/ Dicarboximida		12,0	330,17

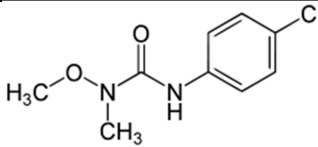
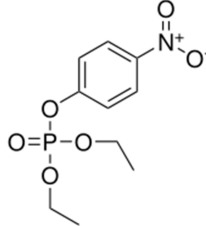
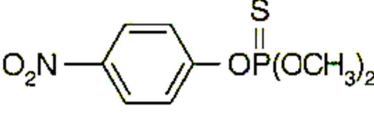
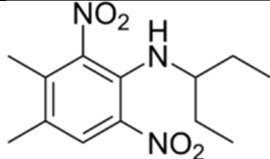
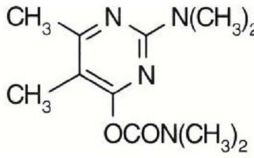
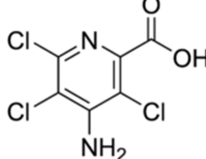
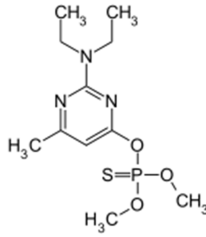
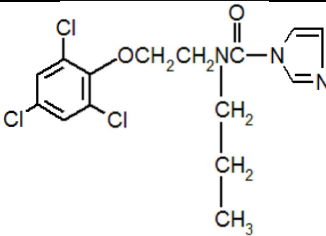
Propriedades químicas dos princípios ativos estudados.

(continuação)

Princípio Ativo	Classe/ Grupo Químico	Fórmula Estrutural	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	Massa Molar (g mol ⁻¹)
Linurom	Herbicida/ Ureia		63,8	249,09
Malationa	Inseticida/ Organofosforado		145	330.36
Mepronil	Fungicida/ Anilide		12,7	269.33
Metamidofós	Inseticida/ Organofosforado		2000000	141,1
Metconazol	Fungicida/ Triazol		30,4	319,83
Metomil	Inseticida/ Carbamato		55000	162,21
Metsulfuron- metílico	Herbicida/ Sulfoniluréia		548	381.36
Monocrotofós	Inseticida/ Organofosforado		1000	223.16

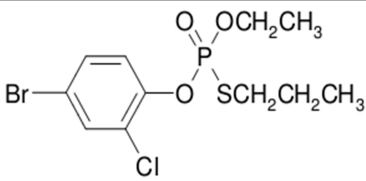
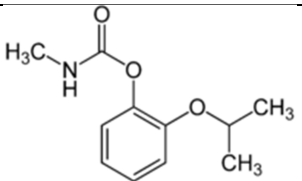
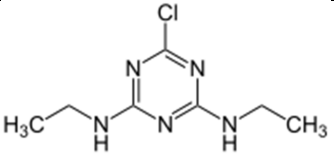
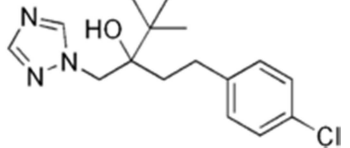
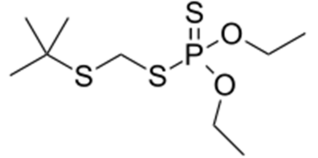
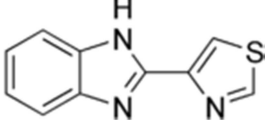
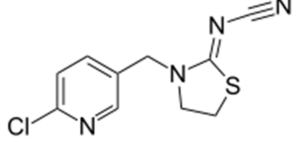
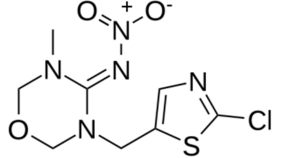
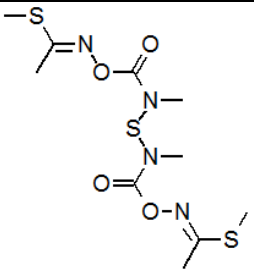
Propriedades químicas dos princípios ativos estudados.

(continuação)

Princípio Ativo	Classe/ Grupo Químico	Fórmula Estrutural	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	Massa Molar (g mol ⁻¹)
Monolinurom	Herbicida/ Ureia		0,74	214.65
Omeoato	Inseticida/ Organofosforado		3640	275.19
Parationa metílica	Herbicida/ Organofosforado		55-60	263,23
Pendimentalina	Herbicida Dinitroanilina		0,275	281.31
Pirimicarbe	Inseticida/ Dimetílicocarbamato		2700	238,28
Picloram	Herbicida/ Piridina		420	241.46
Pirimifós metílico	Inseticida/ Organofosforado		5,0	305.33
Procloraz	Fungicida/ Imidazolilcarboxamida		24,9	376.7

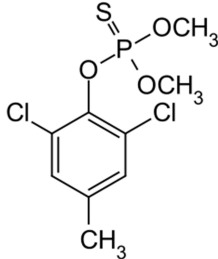
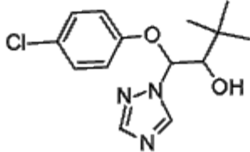
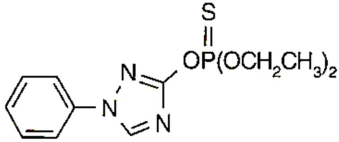
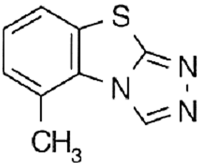
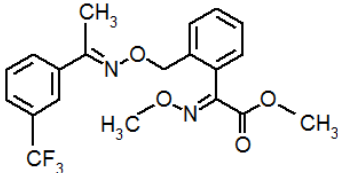
Propriedades químicas dos princípios ativos estudados.

(continuação)

Princípio Ativo	Classe/ Grupo Químico	Fórmula Estrutural	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	Massa Molar (g mol ⁻¹)
Profenofós	Inseticida/ Organofosforado		28	373.6
Propoxur	Inseticida/ Carbamato		2000	209.24
Simazina	Herbicida/ Triazina		5,0	201.66
Tebuconazol	Fungicida/ Triazol		32	307.81
Terbufós	Inseticida/ Organofosforado		5,0	288.43
Tiabendazol	Fungicida/ Benzimidazol		3840	201.25
Tiacloprido	Inseticida/ Neonicotinóide		185	252.72
Tiametoxan	Inseticida/ Neonicotinóides		4000	291.71
Tiodicarbe	Inseticida/ Carbamato		35	354.5

Propriedades químicas dos princípios ativos estudados.

(continuação)

Princípio Ativo	Classe/ Grupo Químico	Fórmula Estrutural	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	Massa Molar (g mol ⁻¹)
Tolclofós metílico	Fungicida/ Organofosforado		1,1	301,13
Triadimenol	Fungicida/ Triazol		95	295.76
Triazofós	Inseticida/ Organofosforado		35	313.3
Triciclazole	Fungicida/ Azole		596	189,24
Trifloxistrobina	Fungicida/ Estrobilurina		0,61	408.4

APÊNDICE B

Condições ótimas para extração para as amostras de trigo

Condições ótimas para extração de herbicidas em amostras de trigo

Princípio Ativo	Grupo Químico	Solvente	Agitação	Partição	Limpeza
Abamectina	Avermectina	AC ET	US	UC	C18
Acetamiprido	Neocotinóide	AC ET	US	NaCl	PSA
Ametrina	Triazina	AC ET	US	NaCl	C18
Aramita	Éster sulfito	AC ET	US	UC	C18
Atrazina	Triazina	AC ET	US	NaCl	C18
Azaconazol	Triazol	AC ET	US	UC	C18
Azametifós	Organofosforado	AC ET	US	UC	C18
Azifós metílico	Organofosforado	AC ET	US	UC	C18
Azoxistrobina	Estrobilurina	AC ET	US	NaCl	C18
Benfluracarbe	Carbamato	AC ET	US	UC	C18
Bifentrina	Piretróide	AC ET	US	UC	C18
Boscalida	Anilida	AC ET	US	UC	C18
Bromofós etílico	Anilida	AC ET	VORTEX	UC	C18
Buprofezina	Triazina	AC ET	US	UC	C18
Carbendazin	Benzimidazole carbamato	AC ET	US	UC	C18
Carbofenotion	Organofosforado	AC ET	US	UC	C18
Carbofurano	Carbamato	AC ET	US	NaCl	C18
Carbosulfano	Metilicocarbamato	AC ET	US	UC	C18
Carboxina	Anilina	AC ET	US	NaCl	C18
Ciflutrina	Piretróide	AC ET	US	UC	C18
Cipermetrina	Piretróide	AC ET	US	UC	C18
Ciproconazol	Triazol	AC ET	US	UC	C18
Clorimuron etílico	Sulfoniluréia	AC ET	US	UC	PSA
Clorpirifós etílico	Organofosforado	AC ET	US	UC	C18
Clorpirifós metílico	Organofosforado	AC ET	US	UC	C18
Cresoxin metílico	Estrobilurina	AC ET	US	UC	C18
Diclofluanida	Sulfamida	AC ET	US	UC	C18
Dicrotofós	Organofosforado	AC ET	US	NaCl	C18
Diflubenzuron	Benzoilureia	AC ET	US	UC	C18
Dimeoato	Organofosforado	AC ET	VORTEX	NaCl	C18
Dimetenamida-p	Cloroacetamida	AC ET	US	NaCl	C18
Diurrom	Feniluréia	AC ET	VORTEX	NaCl	C18
Epoxiconazol	Triazol	AC ET	US	NaCl	C18
Etiprole	Fenilpirazol	AC ET	US	NaCl	PSA
Etoprofós	Organofosforado	AC ET	US	UC	C18
Fenbuconazole	Triazol	AC ET	US	UC	C18
Fenvalerato	Piretróide	AC ET	US	UC	C18
Flutriafol	Triazol	AC ET	US	UC	C18

Condições ótimas para extração de herbicidas em amostras de trigo

Princípio Ativo	Grupo Químico	Solvente	Agitação	Partição	Limpeza
Forato	Organofosforado	AC ET	US	NaCl	C18
Imidacloprido	Neocotinóide	AC ET	US	NaCl	C18
Indoxacarbe	Oxadiazina	AC ET	US	UC	C18
Iprodiona	Dicarboximida	AC ET	US	UC	C18
Linurom	Ureia	AC ET	US	UC	C18
Malationa	Organofosforado	AC ET	VORTEX	NaCl	C18
Mepronil	Anilide	AC ET	US	UC	C18
Metamidofós	Organofosforado	AC ET	VORTEX	NaCl	C18
Metconazol	Sulfoniluréia	AC ET	US	UC	C18
Metomil	Carbamato	AC ET	US	UC	C18
Metsulfuron metílico	Sulfoniluréia	AC ET	US	UC	C18
Monocrotofós	Organofosforado	AC ET	US	NaCl	PSA
Monolinurom	Ureia	AC ET	US	UC	C18
Omeoato	Organofosforado	AC ET	US	NaCl	C18
Parationa metílica	Organofosforado	AC ET	US	UC	C18
Pendimentalina	Anilinopirimidina	AC ET	US	UC	C18
Picloram	Piridina	AC ET	US	UC	C18
Pirazofós	Fosforotioato de heterociclo	AC ET	US	UC	C18
Pirimetanil	Anilinopirimidina	AC ET	US	UC	C18
Pirimicarbe	Dimetílicocarbamato	AC ET	US	UC	PSA
Pirimifós metílico	Organofosforado	AC ET	US	NaCl	C18
Procloraz	Piridina	AC ET	US	UC	C18
Profenofós	Estrobilurina	AC ET	US	UC	C18
Propoxur	Carbamato	AC ET	VORTEX	NaCl	C18
Simazina	Triazina	AC ET	US	NaCl	C18
Tebuconazol	Triazol	AC ET	US	UC	C18
Terbufós	Organofosforado	AC ET	US	UC	C18
Tiabendazol	Benzimidazol	AC ET	US	NaCl	PSA
Tiacloprido	Neocotinóide	AC ET	US	UC	C18
Tiametoxan	Neonicotinoides	AC ET	US	UC	C18
Tiodicarbe	Carbamato	AC ET	US	UC	C18
Tolcofós metílico	Organofosforado	AC ET	US	UC	C18
Triadimenol	Triazol	AC ET	VORTEX	NaCl	C18
Triazofós	Organofosforado	AC ET	VORTEX	UC	C18
Trifloxistrobina	Estrobilurina	AC ET	US	UC	C18
Triflumizol	Azole	AC ET	US	UC	C18
Triflumurom	Benzoiluréia	AC ET	US	UC	C18
Triticonazol	Triazol	AC ET	US	UC	C18

ANEXO 1

Valores críticos para o teste de Cochran, com Nível de significância de 5%

ANEXO 2

Valores Críticos para o Teste de Grubbs

Valores Críticos para o teste de Grubbs

n	g_{crit} $\alpha=0,05$	g_{crit} $\alpha=0,01$	n	g_{crit} $\alpha=0,05$	g_{crit} $\alpha=0,01$	n	g_{crit} $\alpha=0,05$	g_{crit} $\alpha=0,01$
3	1,1543	1,1547	15	2,5483	2,8061	80	3,3061	3,6729
4	1,4812	1,4962	16	2,5857	2,8521	90	3,3477	3,7163
5	1,7150	1,7637	17	2,6200	2,8940	100	3,3841	3,7540
6	1,8871	1,9728	18	2,6516	2,9325	120	3,4451	3,8167
7	2,0200	2,1391	19	2,6809	2,9680	140	3,4951	3,8673
8	2,2166	2,2744	20	2,7082	3,0008	160	3,5373	3,9097
9	2,2150	2,3868	25	2,8217	3,1353	180	3,5736	3,9460
10	2,2900	2,4821	30	2,9085	3,2361	200	3,6055	3,9777
11	2,3547	2,5641	40	3,0361	3,3808	300	3,7236	4,0935
12	2,4116	2,6357	50	3,1282	3,4825	400	3,8032	4,1707
13	2,4620	2,6990	60	3,1997	3,5599	500	3,8631	4,2283
14	2,5073	2,7554	70	3,2576	3,6217	600	3,9109	4,2740