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

AGROTÓXICOS EM MILHO: OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO EMPREGANDO GC-MS/MS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JANICE DE FÁTIMA FACCO

Santa Maria - RS, Brasil

2013

AGROTÓXICOS EM MILHO: O TIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO EMPREGANDO GC-MS/MS

por

Janice de Fátima Facco

Dissertação 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
MESTRE EM QUÍMICA

Orientadora: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria – RS, Brasil

2013

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

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

elaborada por

Janice de Fátima Facco

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

Comissão Examinadora

_____

Prof. Dr. Renato Zanella
(Orientador – UFSM)

_____

Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves
(FURG)

_____

Prof. Dr. Osmar Damian Prestes
(UFSM)

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2013.

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista a minha família e a todos

que acreditaram em mim!

Muito obrigado pelo apoio!

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado os dias vividos até hoje, força e coragem para enfrentar as dificuldades e ainda ter colocado pessoas tão especiais as quais não encontro palavras para agradecer todos os momentos que vivi !!!

Ao Professor Dr. Renato Zanella agradeço pela orientação, pelo aprendizado e pelas oportunidades a mim ofertadas. Muito obrigado.

À Professora Dr. Martha B. Adaime, agradeço pela co-orientação, dedicação e comprometimento durante a execução deste trabalho.

Ao Professor Dr. Fábio Ferreira Gonçalves agradeço pela participação na banca examinadora da dissertação e ao Professor Dr. Osmar Damian Prestes agradeço pela participação no exame de qualificação e na banca de defesa e gostaria de agradecer especialmente pelo incentivo, pela paciência e disponibilidade em me ajudar. Que Deus o retribua sempre!!!.

Ao Manoel Leonardo Martins agradeço pela co-orientação no trabalho e participação no exame de qualificação, muito obrigado pela ajuda na complementação deste trabalho.

Aos colegas de LARP pela convivência durante este período e pela troca de conhecimento dos mais variados tipos. Muito obrigada!

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Química, Valéria e Ademir, obrigado pela ajuda recebida durante o curso.

Ao Mateus Pereira, Michele Vicari, Gabriela Zemolin, Franciele Schons e a Marciéli Bovoloni o meu muito obrigado por terem feito parte desta conquista e pela amizade. Não tenho palavras para agradecer, espero contar sempre com a amizade de vocês! Vocês são muito importantes para mim!

À minha prima/irmã Aline por sempre me apoiar e me incentivar em todos os momentos mais difíceis que passei durante esta etapa e ao longo dessa vida. Muito obrigada!

Ao Jamir pela compreensão, apoio e por acreditar em mim. Muito obrigado!

À minha família, a parte mais importante da minha vida e a principal responsável por esta conquista, quero agradecer por tudo. Por mais que eu escrevesse não conseguiria dizer o quanto vocês são importantes para mim. Amo vocês!!!!

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Oração do milho

Senhor, nada valho.
Sou a planta humilde dos quintais pequenos e das lavouras pobres.
Meu grão, perdido por acaso,
Nasce e cresce na terra descuidada.
Ponho folhas e haste e se me ajudardes, Senhor, mesmo planta
De acaso, solitária,
Dou espigas e devolvo em muitos grãos
O grão perdido inicial, salvo por milagre, que a terra fecundou.
Sou a planta primária da lavoura.
Não me pertence a hierarquia tradicional do trigo
E de mim não se faz o pão alvo universal.
O Justo não me consagrou Pão de Vida, nem lugar me foi dado nos altares.
Sou apenas o alimento forte e substancial dos que
Trabalham a terra, onde não vinga o trigo nobre.
Sou de origem obscura e de ascendência pobre,
Alimento de rústicos e animais do jugo.
Quando os deuses da Hélade corriam pelos bosques,
Coroados de rosas e de espigas,
Quando os hebreus iam em longas caravanas
Buscar na terra do Egito o trigo dos faraós,
Quando Rute respigava cantando nas searas do Booz
E Jesus abençoava os trigais maduros,
Eu era apenas o bró nativo das tabas ameríndias.
Fui o angu pesado e constante do escravo na exaustão do eito.
Sou a broa grosseira e modesta do pequeno sitiante.
Sou a farinha econômica do proletário. Sou a polenta do imigrante e a miga dos que
começam a vida em terra estranha.
Alimento de porcos e do triste mu de carga.
O que me planta não levanta comércio, nem avantaja dinheiro.
Sou apenas a fartura generosa e despreocupada dos paióis.
Sou o cocho abastecido donde rumina o gado.
Sou o canto festivo dos galos na glória do dia que amanhece.
Sou o cacarejo alegre das poedeiras à volta dos seus ninhos.
Sou a pobreza vegetal agradecida a Vós, Senhor,
Que me fizestes necessário e humilde.
Sou o milho.

Cora Coralina

RESUMO

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

AGROTÓXICOS EM MILHO: OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO EMPREGANDO GC-MS/MS

AUTOR: JANICE DE FÁTIMA FACCO
ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA
28 de fevereiro de 2013, Santa Maria.

Devido à complexidade da sua matriz, métodos mais eficientes para a determinação de resíduos de agrotóxicos em milho têm sido estudados. O uso do método QuEChERS, juntamente com a técnica de precipitação a baixa temperatura tem apresentado vantagens para a redução de lipídios durante o preparo de amostra de matrizes com alto teor de gordura.

Neste estudo, otimizou-se e validou-se um método multirresíduo para determinação de agrotóxicos em milho empregando QuEChERS e GC-MS/MS. O procedimento de extração, otimizado através de planejamento fatorial, constituiu na pesagem de 2,5 g da amostra, adição de 10 mL de água purificada, seguida de agitação em vórtex por 1 min e posterior adição de 10 mL de acetonitrila seguindo de agitação em agitador pendular por 1 h a 200 rpm. A partição utilizando sais foi realizada com 1 g de NaCl e 6 g de $MgSO_4$ e agitação manual por 1 min, seguida de centrifugação a 3400 rpm por 8 min a 10 ºC. Uma alíquota de 4 mL do extrato foi retirada e transferida para um tubo de 15 mL para a etapa de limpeza do extrato a baixa temperatura por 12 h a aproximadamente -20 ºC. Após, efetuou-se a etapa final de limpeza do extrato com SPE dispersiva onde retirou-se 1 mL deste extrato e transferiu-se para um tubo contendo 150 mg de $MgSO_4$, 50 mg de C18 e 50 mg de PSA, repetindo a agitação por 1 min e centrifugação a 3400 rpm por 8 min. O extrato final foi filtrado e analisado por GC-MS/MS. Os parâmetros analíticos avaliados neste trabalho foram a linearidade da curva analítica, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão, exatidão e efeito matriz para os 12 compostos estudados. O método demonstrou-se eficiente, com resultados de recuperação na faixa de 55,3 a 110,1% nos níveis de fortificação 40, 100 e 200 µg kg^{-1} e com RSD ≤ 20%. Os valores de LOD e LOQ do instrumento foram de 1,5 e 5,0 µg L^{-1}, respectivamente, e o valor de LOQ do método foi de 100 µg kg^{-1}para a maioria dos compostos.

Desta forma, conclui-se que o método otimizado mostrou-se adequado para análise da maioria dos resíduos de agrotóxicos estudados em milho, pois os parâmetros avaliados encontram-se dentro dos limites exigidos para validação de métodos cromatográficos aplicados a análise de resíduos.

Palavras chaves: QuEChERS, GC-MS/MS, agrotóxicos e precipitação a baixa temperatura (PBT).

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Chemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

PESTICES IN MAIZE: OPTIMIZATION AND VALIDATION OF A MULTIRESIDUE METHOD EMPLOYING GC-MS/MS

Author: JANICE DE FÁTIMA FACCO
Advisor: Prof. Dr. RENATO ZANELLA
Santa Maria, February 28th 2013.

Due to the complexity of its matrix, more efficient methods have been studied for the determination of pesticide residues in maize. The use of QuEChERS method coupled to low temperature clean up technique has showed advantages to reduce lipids during sample preparation in matrix with high fat content.

It was optimized and validated in this study a multiresidue method for the determination of pesticides in maize employing QuEChERS and GC-MS/MS.

The extraction procedure was optimized though the factorial design, and consisted in weighing 2.5 g of sample and adding 10 mL of ultrapurified water followed by vortex shaking for 1 min. After this, It was added 10 mL of acetonitrile and the tube was stirred for 1 h in a platform shaker at 200 rpm. Partition step was performed using 1 g of NaCl and 6 g of $MgSO_4$, followed by manual shaking for 1 min and centrifugation at 3400 rpm for 8 min, at 10 ºC. An aliquot of 4 mL of the extract was transferred to a 15 mL tube for clean up step at low temperature for 12 h around -20 ºC. Finally, another clean up stage was realized applying dispersive SPE, 1 mL of the extract was transferred to a tube containing 150 mg of $MgSO_4$, 50 mg of C_{18} and 50 mg of PSA followed by shaking and centrifugation. The final extract was filtered and analyzed by GC-MS/MS. Analytical parameters evaluated in this work were linearity of the analytical curve, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision, accuracy and matrix effect for the 12 compounds studied. The method showed efficient, with recovery results in a range of 55.3 to 110.1% in the spiked levels of concentration of 40, 100 and 200 µg kg^{-1} and RSD ≤ 20%. Values of instrument LOD and LOQ were 1.5 and 5.0 µg L^{-1}, respectively. Method LOQ was 100 µg kg^{-1} for most compounds.

Thereby, It was concluded that the proposed method demonstrated to be adequate for the analysis of most pesticide residues studied in maize, since the parameters evaluated were in according to the limits required for chromatographic methods validation applied in residues analysis.

Keywords: QuEChERS, GC-MS/MS, pesticides and low temperature clean up.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura física e a composição de cada parte do grão. 23
Figura 2 - Composição química do óleo de alguns cereais. 25
Figura 3 - Estrutura dos ácidos (a) linolênico e (b) linoleico. 26
Figura 4 - Percentual da produção de milho por estado do Brasil 29
Figura 5 - Projeção da produção, do consumo e da exportação de milho para os próximos 10 anos. 30
Figura 6 - Ionização Química (CI) 49
Figura 7 - Ionização por elétrons 49
Figura 8 - Esquema de um analisador triplo quadrupolo. 51
Figura 9 - Modo de varredura do íon produto 52
Figura 10 - Modo de varredura do íon precursor 52
Figura 11 - Modo de monitoramento de reações múltiplas 53
Figura 12 - Resultado de interações das variáveis avaliadas no planejamento. 57
Figura 13 - Planejamento fatorial de dois níveis com ponto central. 57
Figura 14 - Gráfico das interações avaliadas no planejamento 2^4. 74
Figura 15 - Cromatogramas de íons totais (TIC) por GC-MS/MS para as soluções analíticas contendo os 12 agrotóxicos (25 µg L^{-1} cada) preparadas: (A) no solvente e (B) no extrato da matriz. 85
Figura 16 - Número de compostos recuperados na faixa de 70 a 120% em cada teste. 89
Figura 17 - Número de compostos com recuperações na faixa de 70 a 120% em cada ensaio, estudado pelo planejamento estrela 90
Figura 18 - Cromatogramas no modo de varredura total de íon de extratos brancos dos ensaios E^*_1, E^*_2, E^*_4, E^*_5, E^*_6, E^*_7, E^*_8, E^*_{10} e E^*_{11} realizados no planejamento estrela. 91
Figura 19 - Resultados do planejamento experimental com ponto central, apresentando o número de compostos recuperados. 92
Figura 20 - Percentual de compostos recuperados entre 70 e 120% nos três níveis de fortificação avaliados. 93
Figura 21 - Cromatograma do extrato branco da matriz do teste 5. 93

Figura 22 - Número de compostos com recuperação na faixa de 70 a 120% obtidos em cada ensaio do planejamento. 94
Figura 23 - Representação do método de preparo de amostra otimizado utilizado para a extração de agrotóxicos em milho..... 96
Figura 24 - Cromatograma obtido a partir da análise em GC-MS/MS (TIC) da amostra “branco” do milho..... 98
Figura 25 - Cromatograma do branco reagente (acetonitrila) com o padrão interno (TPP). 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal da parte comestível do milho..... 24
Tabela 2 - Percentagem dos constituintes do grão de milho..... 25
Tabela 3 - Percentual de participação na produção e no consumo total pelos principais países ou regiões produtoras e consumidoras de milho, na safra 2010/2011..... 27
Tabela 4 - Uso e destino das diferentes partes da planta e do grão de milho.. 28
Tabela 5 - Classificação toxicológica das formulações de agrotóxicos (JARDIM *et al.*, 2009; BARBOSA, 2004)..... 32
Tabela 6 - Limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pela ANVISA (2012) e pela União Européia (2012). 34
Tabela 7 - Variáveis e resultados obtidos no planejamento fatorial 2^4. 55
Tabela 8 - Coeficientes de contraste para calcular os efeitos. 56
Tabela 9 - Relação dos compostos avaliados, com informações sobre a classe, grupo químico, fórmula molecular e massa molar..... 70
Tabela 10 - Condições experimentais do planejamento 24 com o número de compostos recuperados na faixa de 70 a 120% em cada teste e a média de recuperação..... 73
Tabela 11 - Número de ensaios e quantidades de cada sorvente utilizados no planejamento estrela ou de ponto central..... 76
Tabela 12 - Testes iniciais para determinação do melhor procedimento de extração e limpeza. 77
Tabela 13 - Condições empregadas para a análise de cada composto, no sistema cromatográfico GC-MS/MS, com informações sobre: segmentação, tempo de retenção, analito, íon precursor, íon produto e energia de colisão para cada transição monitorada..... 84
Tabela 14 - Parâmetros das curvas analíticas no solvente obtidos por GC-MS/MS, a partir das soluções de 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 µg L^{-1}. 99
Tabela 15 - Parâmetros das curvas analíticas na matriz, obtidos por GC-MS/MS, a partir das soluções de 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 µg L^{-1}. 99

Tabela 16 - Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método para determinação de agrotóxicos em milho. 101
Tabela 17 - Percentuais de recuperação e RSD_{pi} do método de extração de agrotóxicos em milho, na precisão intermediária..... 102
Tabela 18 - Percentual de efeito matriz para os agrotóxicos analisados por GC-MS/MS em milho..... 103

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

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

ASE - Extração acelerada por solvente, do inglês *Accelerated Solvent Extraction*

C18 - Sílica modificada com hidrocarboneto linear C_{18}, octadecilsilano

CI - Ionização Química, do inglês *Chemical Ionization*

CSR-LVI – do inglês *Concurrent Solvent Recondensation-Large Volume Injection*

CV - Coeficiente de variação

d. i. - Diâmetro interno

DIC - Dissociação induzida por colisão, do inglês *collision-induced dissociation*

DL_{50} - Dose letal 50% da população

DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês, *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*

d-SPE - Extração em fase sólida dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*

EI - Ionização por elétrons, do inglês *Electron Ionization*

ELL-PBT - Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura, (do inglês *Liquid-liquid Extraction with the Low Temperature Partition*).

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

EU - União européia, do inglês *European Union*

EUA - Estados Unidos

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

GC - Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

GC-ECD - Cromatografia Gasosa com Detector por Captura de Elétrons, do inglês *Gas Chromatography - Electron Capture Detector*

GC-FPD - Cromatografia Gasosa com Detector Fotométrico de Chama, do inglês *Gas Chromatography* - Flame Photometric Detector

GC-MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*

GC-MS (NCI-SIM) – Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas com ionização química negativa e monitoramento de íons selecionados.

GC-MS/MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Gas Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*

GC-NPD - Cromatografia Gasosa com Detector de Fósforo e Nitrogênio, do inglês *Gas Chromatography - Nitrogen Phosphorus Detector*

GC-TOFMS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas com Analisador por Tempo de Vôo, do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry "time-of-flight analiser"*

GPC - Cromatografia de Permeação em Gel, do inglês *Gel Permeation Chromatography*

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*

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

LARP - Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas

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

LMR - Limite Máximo de Resíduos

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

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

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

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

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

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

M. M. - Massa Molecular

m/z - Razão massa/carga

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

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeCN – Acetonitrila

MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas, do inglês *Multiple Reaction Monitoring.*

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

MS/MS - Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Tandem Mass Spectrometry*

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

n - Número de replicatas

NIST - Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, do inglês *National Institute of Standards and Technology*

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBT - Partição a Baixa Temperatura

PC - Padrão de controle

pH - Potencial hidrogeniônico

PHSE - Extração com Solvente Pressurizado à Quente, do inglês *Pressurized Hot Solvent Extraction*

PI - Padrão Interno

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

PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

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

PTFE - politetrafluoretileno

PTV - Temperatura Programada de Vaporização, do inglês *Programmed Temperature Vaporization*

QqQ - Triplo Quadrupolo

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

r^2 - Coeficiente de determinação

rpm - Rotações por minuto

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

RSD_{pi} - Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

RSD_r - Desvio Padrão Relativo para Repetitividade

S/R - Sinal/ruído

SBSE - Extração Sortiva com Barra Magnética, do inglês *Stir-Bar Sorptive Extraction*

SFE - Extração por Fluido Supercrítico, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*

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

SLE-LTP- Extração Sólido-Líquido com Precipitação a Baixa Temperatura, do inglês *solid-liquid extraction with low temperature purification*

SOX - Extração por Soxhlet, do inglês *Soxhlet Extraction*

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

SPME - Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*

SRM – Monitoramento de Reação Selecionada, do inglês *Selected Reaction Monitoring.*

SSE - Extração com Solvente Supercrítico, do inglês *Subcritical Solvent Extraction*

TPP - Trifenilfosfato

TQ - Triplo Quadrupolo

t_R - Tempo de retenção

UFSM - Universidade Federal de Santa Maria

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

USDA - Departamento da Agricultura dos Estados Unidos, do inglês *United States Department of Agriculture*

v/v - Volume por volume

v/v/v - Volume/volume/ volume

LISTA DE ANEXOS

Anexo A Fórmulas estruturais dos agrotóxicos estudados.....117

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 21
2. REVISÃO BIBLIOGÁFICA 23
2.1. O milho 23
2.2. A cadeia produtiva do milho 26
2.3. O setor do milho 29
2.4. Agrotóxicos e sua definição 30
2.4.1. Classificação e toxicidade dos agrotóxicos 31
2.4.2. O controle e o uso de agrotóxicos na cultura do milho 33
2.5. Métodos de determinação de agrotóxicos em milho 34
2.5.1. Técnicas utilizadas na extração de agrotóxicos em milho 35
2.5.2. Determinação de resíduos de agrotóxicos em milho 41
2.6. Técnicas cromatográficas para determinação de resíduos de agrotóxicos 47
2.6.1. Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas 47
2.6.2. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas 48
2.6.3. Analisadores de massas do tipo triplo quadrupolo 50
2.6.4. Celas de colisão 53
2.7. Planejamento fatorial 54
2.8. Validação de métodos cromatográficos 58
2.8.1. Padrão interno e padrão de controle 58
2.8.2. Seletividade 59
2.8.3. Curva analítica e faixa de trabalho 59
2.8.4. Limite de detecção e quantificação 60
2.8.5. Exatidão 61
2.8.6. Precisão 62
2.8.7. Efeito matriz 63
3. MATERIAIS E MÉTODOS 66
3.1. Instrumentação 66
3.2. Materiais e reagentes utilizados 67
3.3. Processamento da amostra 68
3.4. Seleção do padrão interno e do padrão de controle 68

3.5. Agrotóxicos selecionados **68**
3.6. Preparo das soluções analíticas **69**
3.7. Otimização do sistema GC-MS/MS para a determinação de resíduos de agrotóxicos em milho **70**
3.7.1. Condições cromatográficas para o sistema GC-MS/MS **71**
3.7.2. Condições do sistema de detecção **71**
3.8. Planejamento fatorial experimental **72**
3.9. Otimização do método para determinação de agrotóxicos em milho **76**
3.10. Validação do método para determinação de resíduos de agrotóxicos em milho **78**
3.10.1. Seletividade **78**
3.10.2. Curva analítica e faixa de trabalho **79**
3.10.3. LOD e LOQ do instrumento e do método **79**
3.10.4. Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão **79**
3.10.5. Precisão (repetitividade e precisão intermediária) **81**
3.10.6. Avaliação do efeito matriz **81**
3.11. Aplicação do método **82**
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES **83**
4.1. Otimização do sistema GC-MS/MS para a determinação de resíduos de agrotóxicos em milho **83**
4.2. Otimização do método QuEChERS para análise de agrotóxicos em milho **86**
4.2.1. Testes preliminares **88**
4.2.2. Avaliação da limpeza **89**
4.2.3. Planejamento fatorial **94**
4.2.4. Procedimento otimizado **95**
4.3. Validação do método otimizado **96**
4.3.1. O padrão interno e o padrão de controle escolhidos **97**
4.3.2. Seletividade **97**
4.3.3. Curva analítica e faixa de trabalho **98**
4.3.4. LOD e do LOQ do instrumento e do método **100**
4.3.4. Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão do método **101**
4.3.5. Precisão (repetitividade e precisão intermediária) **102**

4.3.6. Avaliação do efeito matriz em GC-MS/MS **103**
4.4. Aplicação do método em amostras reais **104**
5. CONCLUSÕES **105**
6. PERSPECTIVAS FUTURAS **107**
7. DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS **108**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **109**
ANEXO A.....**117**

1 INTRODUÇÃO

É comum perdas anuais na agricultura provenientes da ação de pragas e doenças, pois estas chegam a somar 1 bilhão de toneladas o que corresponde a redução de 20 a 30% da produção. Com isso os agrotóxicos apresentam grande importância no crescimento da agricultura, pois geram benefícios como o aumento da produtividade bem como uma melhora na qualidade do produto embora a utilização dos mesmos acarrete a contaminação do solo, da água e principalmente dos alimentos (PRESTES *et al.,* 2009).

Os agrotóxicos pertencem a algumas classes de substâncias químicas consideradas potencialmente tóxicas aos seres humanos, principalmente por apresentar hidrofobicidade elevada e reatividade baixa no meio ambiente. Características estas que justificam o acúmulo e a bioconcentração destes compostos nos tecidos dos organismos vivos, que ocorre devido à falta de uma via eficiente para a degradação desses compostos (JARDIM *et al.*, 2009).

O milho é considerado o principal ingrediente na produção de rações e outros alimentos que compõe a mesa do brasileiro e freqüentemente é armazenado antes do consumo. Assim como durante a produção do milho, na estocagem do grão pode ocorrer o ataque de insetos que diminuem a qualidade do grão, causando prejuízos aos produtores. Desta forma, o uso de agrotóxicos que auxiliam no combate de insetos é freqüente e resíduos desses compostos no produto final devem estar de acordo com os limites máximos de resíduos (LMR) permitidos.

Deste modo, a determinação de resíduos de agrotóxicos apresenta grande importância para a estimativa da exposição humana e do meio ambiente, possibilitando avaliar a conformidade da produção agrícola e tomar decisões regulatórias comerciais visando garantir a segurança alimentar da população e também dos animais (PRESTES *et al.,* 2009).

Para isso, técnicas de preparo de amostra e de determinação além de equipamentos mais sofisticados são de extrema importância para garantir resultados rápidos e confiáveis. Com isso, a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em série tem apresentado significativa importância, pois possibilita a análise de amostras muito complexas.

O método QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Saf*e) tem apresentado as características necessárias para este procedimento, como já demonstra sua própria tradução. Devido as diferentes propriedades químicas dos compostos e das matrizes o método deve ser adaptado para que se possa minimizar adversidades, seja com o uso de diferentes solventes extratores ou com diferentes sorventes na etapa de limpeza do extrato a fim de garantir a confiabilidade do resultado.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo otimizar e validar um método analítico para a determinação de resíduos de 12 agrotóxicos (onde dois não são permitidos para cultura e os demais de uso geral e utilizados no armazenamento da produção de grãos de milho) utilizando o método QuEChERS original otimizado com posterior análise em Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em série (GC-MS/MS). Como objetivos específicos, pode-se destacar a realização do planejamento experimental para avaliar as melhores condições de extração dos analitos e de limpeza do extrato.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O milho

Segundo Felippe (2007), *Zea mays* L. é uma espécie originária do México e o seu nome *Zea* vem do grego e quer dizer “semente ou grão”. O mesmo pertence à família das Gramineae/Poaceae (EMBRAPA, 2002). De acordo com registros os primeiros cultivos desta cultura foram feitos a 7300 anos no litoral mexicano, por onde espalhou-se rapidamente e foi domesticado, mas logo foi trazido para outras regiões tropicais (EMBRAPA, 2008).

A cor dos grãos de milho, geralmente é amarela ou branca, mas podem apresentar uma variação desde o preto até o vermelho. Cada grão tem um peso individual que varia de 250 a 300 mg, com composição média em base seca de 72% de amido, 9,5% de proteínas, 9% de fibra e 4% de óleo. O grão é formado por quatro principais estruturas físicas: endosperma, gérmen, pericarpo (casca) e ponta (EMBRAPA, 2006a), como apresentado na Figura 1.

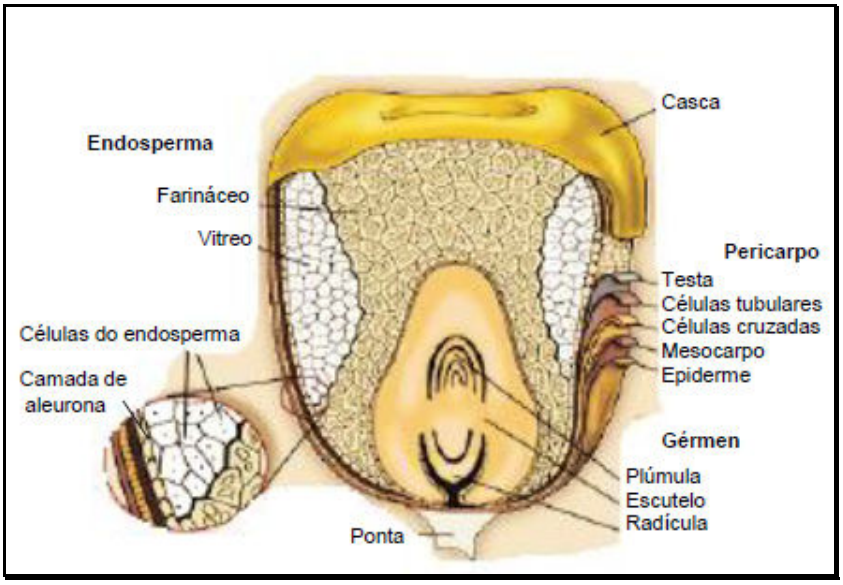


Figura 1 - Estrutura física e a composição de cada parte do grão. Fonte: Adaptado de EMBRAPA, 2006a.

A composição centesimal da parte comestível do milho está apresentada na Tabela 1, bem como a quantidade de vitaminas, minerais, colesterol e outros.

Tabela 1 - Composição centesimal da parte comestível do milho.

Umidade (%)	Energia (kcal)	Energia (kJ)	Proteína (g)	Lipídeos (g)	Colesterol (mg)	Carboidrato (g)	Fibra Alimentar (g)
11,5	353	1479	7,2	1,9	NA	78,9	4,7
Cinzas (g)	**Cálcio (mg)**	**Magnésio (mg)**	**Manganês (mg)**	**Fósforo (mg)**	**Ferro (mg)**	**Sódio (mg)**	**Potássio (mg)**
0,6	3	41	0,34	108	0,9	Tr	168
Cobre (mg)	**Zinco (mg)**	**Retinol (µg)**	**RE (µg)**	**RAE (µg)**	**Tiamina (mg)**	**Riboflavina (mg)**	**Piridoxina (mg)**
0,08	1,1	NA	26	13	0,25	Tr	Tr
Niacina (mg)	**Vitamina C (mg)**						
0,75	Tr						

Tr: Traço; NA: Não aplicável; RAE: Equivalente de atividade de retinol; RE: Equivalente de retinol;

Fonte: Adaptado de TACO, 2011.

É no endosperma que se encontram os carotenóides que são as substâncias que promovem a cor aos grãos de milho. Mas o constituinte do grão que concentra quase a totalidade dos lipídios, dos minerais e quantidades importantes de proteínas e açucares é o gérmen, como pode ser observado pela Tabela 2 (EMBRAPA, 2006a).

Tabela 2 - Percentagem dos constituintes do grão de milho.

Fração	% grão	Amido	Lipídeos	Proteínas	Minerais	Açucares	Fibras ou conteúdo celular
		% da parte (base seca)					
Endosperma	82	98	15,4	74	17,9	28,9	
Gérmen	11	1,3	82,6	26	78,4	69,3	12
Pericarpo	5	0,6	1,3	2,6	2,9	1,2	54
Ponta	2	0,1	0,8	0,9	1	0,8	7

Fonte:Adaptado de EMBRAPA, 2006a.

Como podemos observar o gérmen concentra a maior parte dos lipídeos que são destinados à produção de óleo, pois apresenta um percentual de composição diferencial de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e polinsaturados de outros cereais, conforme mostra a Figura 2. Vale ressaltar que a composição dos ácidos graxos presente neste óleo tem alto valor nutricional que ajuda a prevenir doenças cardiovasculares e problemas como o colesterol, além de ser uma fonte de vitamina E (EMBRAPA, 2006a).

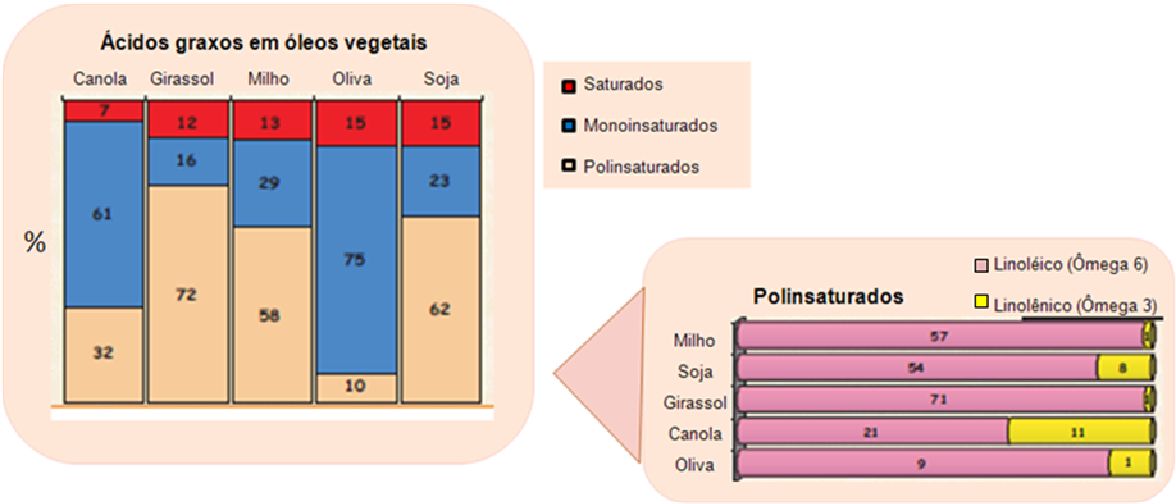


Figura 2 - Composição química do óleo de alguns cereais. Fonte: Adaptado de EMBRAPA (2006a).

A Figura 3 apresentada a estrutura química dos ácidos linolênico (a) e linoleico (b), principais ácidos graxos polinsaturados.

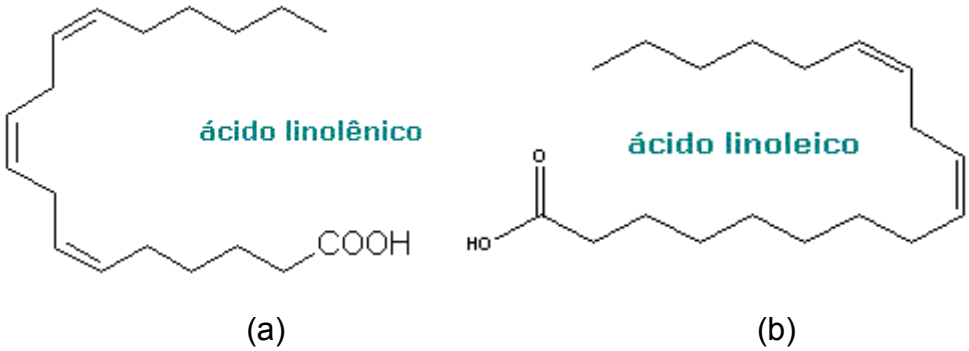


Figura 3 - Estrutura dos ácidos (a) linolênico e (b) linoleico. Fonte: SOUZA; NEVES (2013).

Portador de um rico valor nutricional vale destacar que o milho ajuda a prevenir doenças crônico-degenerativas, pois possui uma substância chamada β-glucano, que protege contra enfermidades cardiovasculares e, além disso, adia o envelhecimento devido à alta quantidade de melatonina que possui propriedades antioxidantes que retardam a degeneração neuronial (FILHO, 2011).

Conforme EMBRAPA (2006a), o milho pode ser classificado, de acordo com o tipo de grão, em dentado, duro, farináceo, pipoca e doce. Esta classificação é obtida pela forma e o tamanho do grão que é definido pela estrutura do endosperma e o tamanho do gérmen.

2.2 A cadeia produtiva do milho

O milho juntamente com o trigo e o arroz, corresponde a um dos mais importantes cereais em grãos no mundo, sendo que 65% da produção são destinados a nutrição animal e 15% a nutrição humana, além de ser utilizado como material básico na produção industrial de combustível (CUNHA; FERNANDES, 2011).

O milho ocupa a segunda colocação quando relacionado ao volume de grãos produzidos, perdendo apenas para o trigo e seguido pelos demais cereais. Segundo as indicações técnicas da FEPAGRO E EMATER/RS-ASCAR (2011) “atualmente os

maiores produtores mundiais de milho são os Estados Unidos, com 38,5% do total (safra 2010/2011), a China, o Brasil, a Comunidade Econômica Européia, o México e a Argentina", como demonstra a Tabela 3.

Tabela 3 - Percentual de participação na produção e no consumo total pelos principais países ou regiões produtoras e consumidoras de milho, na safra 2010/2011.

Principais produtores		**Principais consumidores**	
País/Região	**%**	**País/Região**	**%**
Estados Unidos	38,53	Estados Unidos	34,65
China	21,08	China	20,32
Brasil	6,70	Brasil	5,76
União Européia	6,76	União Européia	7,28
México	2,62	México	3,46
Argentina	2,68	Canadá	1,31
África do Sul	1,46	Japão	1,91
Produção (em milhões t)	820,62	Produção (em milhões t)	846,63

Fonte: Adaptado de FEPAGRO E EMATER/RS-ASCAR (2011)

De acordo com a FEPAGRO E EMATER/RS-ASCAR (2011) a Departamento da Agricultura dos Estados Unidos (USDA) estimou para 2011, que os principais países exportadores de milho seriam os Estados Unidos (53,2%) e a Argentina (16%). Os maiores importadores seriam o Japão (17,7%) e o México e Coréia do Sul, com 8,0% cada. O aumento do seu consumo está diretamente relacionado à produção de álcool e ao maior consumo de ração.

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) "o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho com 53,2 milhões de toneladas na safra 2009/2010". Em princípio o grão é cultivado com a finalidade de atender ao consumo humano, mas o principal destino da safra são as indústrias de rações para animais, conforme o MAPA (2012a). Outros destinos podem ser dados as diferentes partes da planta e ao grão, conforme apresenta a Tabela 4.

Tabela 4 - Uso e destino das diferentes partes da planta e do grão de milho

Destinação	Forma/Produto Final
Uso Animal Direto	Silagem; Rolão; Grãos (inteiro/desintegrado) para aves, suínos e bovinos.
Uso Humano Direto de Preparo Caseiro	Espiga assada ou cozida; Pamonha; Curau; Pipoca; Pães; Bolos; Broas; Cuscuz; Polenta; Angus; Sopas; Farofa.
Indústria de Rações	Rações para aves (corte e postura); outras aves; Suínos; Bovinos (corte e leite); Outros mamíferos.
Indústria de Alimentos Produtos Finais	Amidos; Fubás; Farinhas comuns; Farinha pré-cozidas; Flocadas; Canjicas; Óleo; Creme; Pipocas; Glicose; Dextrose.
Intermediários	Canjicas; Sêmola; Semolina; Moído; Granulado; Farelo de germe.
Xarope de Glucose	Balas duras; Balas mastigáveis; Goma de mascar; Doces em pasta; salsichas; salames; Mortadelas; Hambúrgueres; Outras carnes processadas; Frutas cristalizadas; Compotas; Biscoitos; Xaropes; Sorvetes; Para polimento de arroz.
Xarope de Glucose com alto teor de maltose	Cervejas
Corantes Caramelo	Refrigerantes; Cervejas; Bebidas alcoólicas; Molhos.
Maltodextrinas	Aromas e essências; Sopas desidratadas; Pós para sorvetes; Complexos vitamínicos; Produtos achocolatados.
Amidos Alimentícios	Biscoitos; Melhoradores de farinhas; Pães; Pós para pudins; Fermento em pó; Macarrão; Produtos farmacêuticos; Balas de goma.
Amidos Industriais	Para papel; Papelão ondulado; Adesivos; Fitas Gomadas; Briquetes de carvão; Engomagens de tecidos; Beneficiamento de minérios.
Dextrinas	Adesivos; Tubos e tubetes; Barricas de fibra; lixas; Abrasivos; Sacos de papel; multifolhados; Estampagem de tecidos; Cartonagem; Beneficiamento de minérios.
Pré-Gelatinizados	Fundição de peças de metal.
Adesivos	Rotulagem de garrafas e de latas; Sacos; Tubos e tubetes; Fechamento de caixas de papelão; Colagem de papel; madeira e tecidos.
Ingredientes Protéicos	Rações para bovinos; suínos; aves e cães.

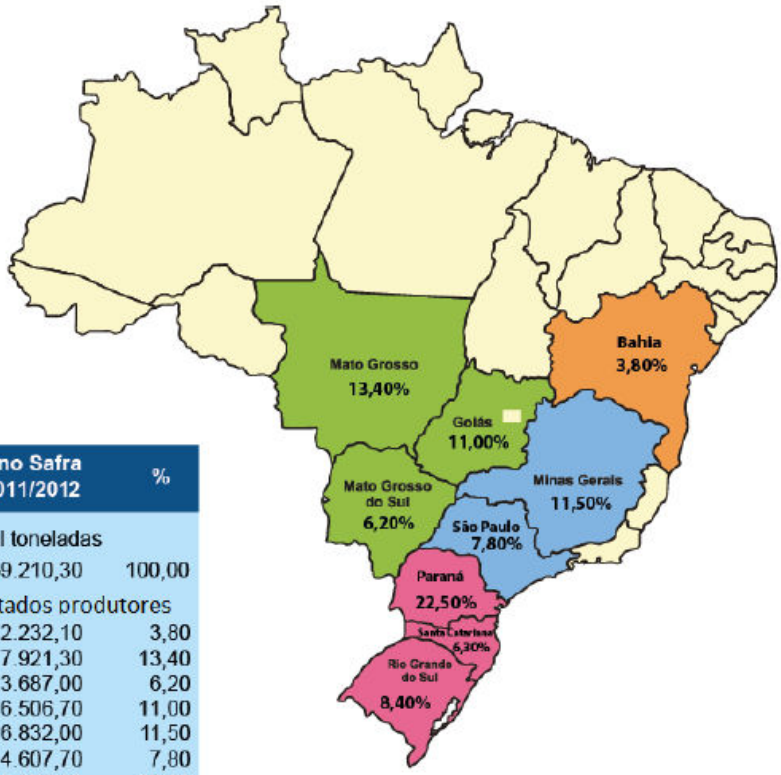
Fonte: Adaptado de EMBRAPA (2006b).

Conforme o MAPA (2012a) a Assessoria de Gestão Estratégica do Mapa realizou um estudo de projeção da produção do cereal, onde indica um aumento de 19,11 milhões de toneladas entre a safra de 2008/2009 e 2019/2020, sendo que no final dessa projeção a produção deverá ser de 70,12 milhões de toneladas e o consumo de 56,20 milhões de toneladas. Este estudo tem como objetivo mostrar

que o Brasil precisa ajustar o seu quadro de suprimentos para que possa garantir o abastecimento do mercado interno e 12,6 milhões de toneladas para a exportação em 2019/2020.

2.3 O setor do milho

De acordo com o MAPA (2012c), as regiões de maior produção de milho no Brasil é a região Sul com 37,2% da produção nacional e o Centro Oeste com 30,6%, como pode ser visualizado na Figura 4.



Milho	Ano Safra 2011/2012	%
	Mil toneladas	
Produção Nacional	59.210,30	100,00
	Principais estados produtores	
BA	2.232,10	3,80
MT	7.921,30	13,40
MS	3.687,00	6,20
GO	6.506,70	11,00
MG	6.832,00	11,50
SP	4.607,70	7,80
PR	13.323,10	22,50
SC	3.705,50	6,30
RS	4.992,90	8,40

FONTE: CONAB - Levantamento: Fev/2012.

Figura 4 - Percentual da produção de milho por estado do Brasil. Fonte: MAPA (2012c)

Novas previsões produtivas indicam que nos próximos anos, cerca de 84% da produção de milho será destinada ao mercado interno, para o consumo humano e fabricação de rações para animais, principalmente suínos e aves. E com isso a

produção tende a aumentar 1,7% ao ano, o consumo 1,8% e a exportação tende a se manter, de acordo com o MAPA (2012c). Esta projeção pode ser observada na Figura 5.

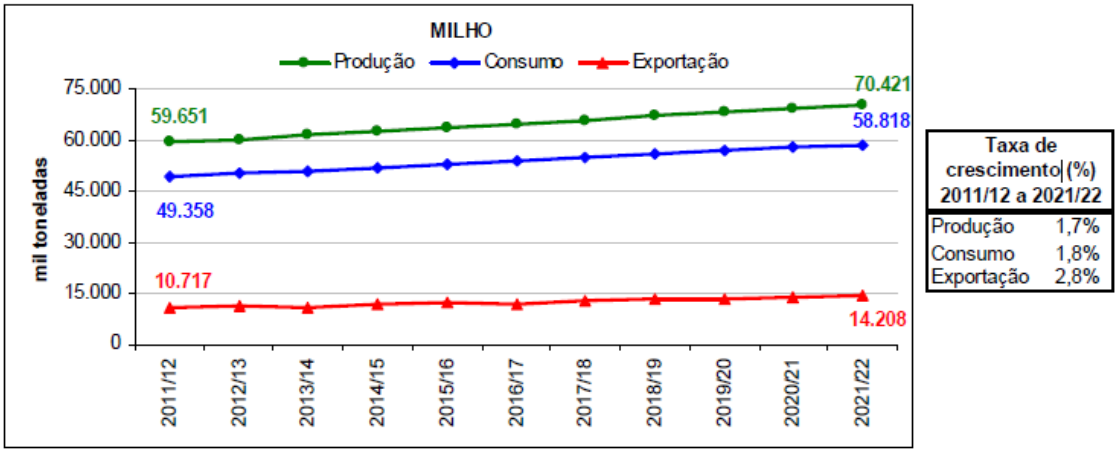


Figura 5 - Projeção da produção, do consumo e da exportação de milho para os próximos 10 anos. Fonte MAPA (2012c).

Como podemos observar o setor produtivo do milho tem ganho espaço e sua tendência é aumentar consolidando a sua importância para a economia do país.

2.4 Agrotóxicos e sua definição

De acordo com o MAPA (2012b), os agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados à produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas, bem como de ambientes urbanos, hídricos e industriais.

Segundo a definição adotada pelo *Codex alimentarius*, agrotóxico, é toda e qualquer substância utilizada com o propósito de prevenir, destruir, atrair, repelir, ou controlar qualquer peste, incluindo espécies indesejáveis de plantas, insetos ou animais, durante as etapas de produção, armazenamento, transporte, distribuição, e processamento do alimento ou ração animal (ou que seja fornecido aos animais para

o controle de ectoparasitas). O termo inclui substâncias utilizadas como reguladoras de crescimento das plantas, desfolhantes, dessecantes ou inibidoras de brotos, e substâncias aplicadas tanto antes como após a colheita, para proteger a mesma da deterioração durante o armazenamento e transporte dos alimentos (FAO, 2005).

Conforme o Decreto Federal Brasileiro nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, compreende-se por agrotóxicos:

> "produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento de plantas" (BRASIL, 2002).

2.4.1 Classificação e toxicidade dos agrotóxicos

Os agrotóxicos têm como principal classificação o seu emprego como: inseticidas (combatem os insetos), herbicidas (combatem as plantas daninhas), fungicidas (combatem os fungos), acaricidas (combatem os ácaros), moluscocidas (combatem os moluscos), rodenticidas (combatem os roedores), bactericidas (combatem as bactérias) entre outros (BAIRD, 2002).

Do ponto de vista da composição química, os agrotóxicos possuem uma enorme diversidade estrutural, mas muitos apresentam alguma característica em comum, sendo assim, classificados dentro de um mesmo grupo. Os grupos mais conhecidos são representados pelos organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretróides. Estes nomes estão relacionados com as características estruturais dos compostos, ou seja, com a natureza dos elementos químicos presentes em sua composição, além da maneira como tais elementos estão ligados entre si (BARBOSA, 2004).

Os agrotóxicos possuem uma classificação quanto à toxicidade, a qual é muito importante para o conhecimento da toxicidade aguda ou crônica dos agrotóxicos, os quais, por sua própria natureza, são compostos potencialmente perigosos para a saúde humana. Entretanto, esse perigo varia muito de um composto para outro, assim como os efeitos que eles, ou qualquer substância

química, podem causar em organismos vivos, incluindo o homem (BARBOSA, 2004).

No Brasil, se expressa à toxicidade aguda em termos de valor da dose letal 50% (*Lethal Dose* 50% ou DL_{50}), que é representada pela relação mássica de miligramas do produto tóxico por quilograma de massa viva (m. v.). A DL_{50} é a dose ingerida ou administrada, pela mesma via que provoca a morte de 50% da população em estudo. O Ministério da Saúde classifica os agrotóxicos em quatro classes toxicológicas, onde cada classe é representada por uma cor, como mostra a Tabela 5 (JARDIM *et al.*, 2009).

Tabela 5 - Classificação toxicológica das formulações de agrotóxicos (JARDIM *et al.*, 2009; BARBOSA, 2004).

Classificação	**Cor da faixa**	**DL_{50}**
Classe I	Faixa Vermelha – Extremamente tóxico	≤ 5 mg kg^{-1}
Classe II	Faixa Amarela – Altamente tóxico	$5 < DL_{50} \leq 50$ mg kg^{-1}
Classe III	Faixa Azul – Medianamente tóxico	$50 < DL_{50} \leq 500$ mg kg^{-1}
Classe IV	Faixa Verde – Pouco tóxico	$DL_{50} > 5000$ mg kg^{-1}

Esta classificação garante a interpretação direta do grau de perigo dos agrotóxicos à saúde humana, facilitando ao agricultor e principalmente ao indivíduo, identificar a dimensão do risco na utilização destes produtos (LEVIGARD, 2001).

Sabemos que o emprego de agrotóxicos na agricultura tem seus benefícios econômicos, uma vez que asseguram o controle e o combate de pragas e doenças, protegendo a qualidade da produção. Por outro lado, os consumidores destes produtos agrícolas podem estar expostos aos agrotóxicos, devido à presença destes nos alimentos. Entre os efeitos nocivos causados ao homem, por estas substâncias, pode-se citar: diversos tipos de câncer, danos ao sistema nervoso central, problemas no sistema reprodutivo e locomotor, deficiência mental, entre outros (PRESTES, 2011).

2.4.2 O controle e o uso de agrotóxicos na cultura do milho

Dibe (2012) publicou uma matéria no jornal CORREIO DO POVO onde diz que:

> "o Brasil consumiu 1 bilhão de litros de agrotóxicos somente na última safra. Diluído em água, este volume de material nocivo ao ambiente e à saúde pública chega a conta de 100 bilhões de litros dispensados na natureza e absorvidos pelas pessoas em alimentos, água, ar e contato com o solo. Entre os vetores da contaminação, estão frutas, hortaliças e até o arroz e o feijão que ocupam o prato dos brasileiros todos os dias".

Segundo Prateano (2012), "o uso de agrotóxicos nas lavouras brasileiras cresceu 42% entre os anos 2002 e 2011, totalizando 852,80 milhões de litros". Sabe-se da necessidade dos agrotóxicos de diferentes classes químicas na cultura e no armazenamento dos grãos de milho visando o controle de pragas e insetos. Entre os mais utilizados pode-se citar os herbicidas, fungicidas, inseticidas, acaricidas.

Com isso, programas internacionais para o controle legal de agrotóxicos foram estabelecidos para prevenir a contaminação de gêneros alimentícios. Desta forma, o controle de resíduos de agrotóxicos em alimentos é um dos mais importantes aspectos de segurança alimentar (PRESTES, 2011).

Órgãos como a FAO/OMS e o *Codex Alimentarius* tem fornecido informações a fim de contribuir no aperfeiçoamento da legislação brasileira em relação aos limites máximos de resíduos de agrotóxicos, tornando-a mais rigorosa e estabelecendo valores menores de LMR (Limite Máximo de Resíduos) para muitos agrotóxicos (BARBOSA, 2004).

De acordo com o MAPA (2012d) a Instrução Normativa SDA Nº 42, de 31 de dezembro de 2008, apresenta o Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal, que tem como função inspecionar e fiscalizar a qualidade dos produtos de origem vegetal produzidos em todo o território nacional, em relação a ocorrência de resíduos de agrotóxicos e contaminantes químicos e biológicos, que são destinados ao mercado interno e a exportação. Além disso, o PNCRC (Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes) investiga produtos não conformes e fiscaliza os ingredientes ativos de uso proibido e não registrados para determinada cultura e também a violação dos limites máximos nacionais a partir das informações obtidas deste monitoramento.

A Tabela 6 apresenta os agrotóxicos estudados juntamente com os limites máximos de resíduos (LMR) permitidos pelas agências regulamentadoras.

Tabela 6 - Limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pela ANVISA (2012) e pela União Européia (2012).

COMPOSTOS	ANVISA (mg kg^{-1})	EU (mg kg^{-1})
Alacloro	0,2	0,2
Bifentrina	0,02	0,05
Clorpirifós etílico	0,1	0,05
Deltametrina	1	2
Esfenvalerato	1	0,02
Fenitrotiona	0,2	0,05
Malationa	8	8
Pirimifós metílico	10	5
Quintozeno	NPC	0,02
Tetradifona	NPC	0,01
Trifloxistrobina	0,05	0,02
Trifluralina	0,05	0,1

EU: União Européia; NPC: Não Permitido para Cultura.

2.5 Métodos de determinação de agrotóxicos em milho

Na determinação de resíduos de agrotóxicos faz-se necessário uma etapa prévia de preparo da amostra, pois os analitos presentes se encontram em concentrações muito baixas em amostras geralmente complexas. Com isso, o preparo da amostra tem como objetivo promover a extração e o enriquecimento dos compostos de interesse e a remoção dos interferentes. Em geral, a complexidade da matriz dificulta a quantificação dos agrotóxicos e para contornar este problema uma alternativa é fazer uma etapa dispersiva com sorventes. Esta etapa é conhecida como limpeza e tem a finalidade de reduzir as interferências e o efeito matriz da amostra a ser analisada. Esta etapa sofre constantes modificações a fim de que se possa melhorar a análise quantitativa (PRESTES *et al.*, 2009).

2.5.1 Técnicas utilizadas na extração de agrotóxicos em milho

Atualmente, muitas técnicas de extração são utilizadas para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras gordurosas, mas algumas demandam muito tempo ou uma grande quantidade de solvente. As técnicas de extração mais conhecidas para esta finalidade são a Extração por Soxhlet (SOX, do inglês *Soxhlet Extraction*), a Extração Líquido-Líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*), a Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*), a Microextração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid-Phase Microextraction*), a Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD, do inglês *Matrix Solid-Phase Dispersion*), a Extração com Fluido Supercrítico, (SFE, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*), a Extração Acelerada com Solvente (ASE, do inglês *Accelerated Solvent Extraction*) e a Extração Assistida por Micro-ondas (MAE, do inglês *Microwave-Assisted Extraction*), a Extração Líquida Pressurizada (PLE, do inglês *Pressurized Lliquid Extraction*) e a Extração Sorptiva com Barra Magnética (SBSE, do inglês *Stir-Bar Sorptive Extraction*) (WU *et al.*, 2011; GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2012).

Normalmente antes de uma determinação cromatográfica os resíduos de agrotóxicos são isolados da matriz e enriquecidos e para este fim o procedimento normalmente inclui a extração e a limpeza do extrato antes da determinação cromatográfica (WALORCZYK & DROŻDŻYŃSKI, 2012). Algumas das principais técnicas utilizadas para a extração de resíduos de agrotóxicos em amostras gordurosas serão descritas a seguir.

A técnica de SFE tem a particularidade de ser utilizada somente para amostras sólidas, é seletiva e utiliza pouco solvente (ZANELLA *et al.*, 2012). Além disso, vários solventes podem ser usados no estado supercrítico para extrair analitos de diferentes matrizes (ALBASEER *et al.*, 2010).

Norman; Panton (2001) utilizaram SFE e SPE para a extração de diclorvós, metacrifós, diazinona, etrimfós, z-fosfamidona, clorpirifós metil, fenitrotiona, pirimifós-metil, malationa e clorpirifós-etil em amostras de trigo e milho. Para este estudo os autores avaliaram as técnicas SFE-SPE como procedimento de extração e limpeza da amostra, assim como, uma extração líquido-líquido utilizando acetona:metanol (1:1 v/v) com Cromatografia com Permeação em Gel, LLE-GPC (do inglês *Gel Permeation Chromatography*), ambas com determinação por Cromatografia Gasosa

com Detecção Fotométrica de Chamas, GC-FPD (do inglês *Gas Chromatography with Flame Photometric Detection*) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*).

As técnicas avaliadas apresentaram bons resultados de recuperação, bem como baixo limite de detecção, porém o tempo de análise da técnica SFE-SPE é de 2,5 h e da técnica LLE-GPC é de 9 h, além disso, o uso de solvente na SFE-SPE é bem menor, que para LLE-GPC. Sendo assim, o tempo de uma análise pode ser considerado um fator determinante para a escolha de uma técnica assim como, a quantidade de solventes utilizados embora os resultados sejam satisfatórios.

Já a técnica de extração LLE se fundamenta na partição de compostos orgânicos entre amostras aquosas e um solvente orgânico imiscível para promover a extração dos analitos desejados (ALBASEER *et al.*, 2010).

Mariani; D`Aiuto; Giannetti (2010) compararam três diferentes procedimentos de limpeza para a determinação de 26 resíduos de agrotóxicos organofosforados em amostras de cereais com determinação por Cromatografia Gasosa com Detecção de Nitrogênio e Fósforo, GC-NPD (do inglês *Gas Chromatography with Nitrogen Phosphous Detection*). Este método baseia-se na extração líquido-líquido e limpeza líquido-sólido. Como método de extração utilizou-se 25 g da amostra e transferiu-se para um béquer de 500 mL e adicionou-se 100 mL da solução extratora de éter de petróleo, diclorometano e acetona (2+1+1, v/v/v), onde a mistura foi homogeneizada durante 5 min. Após o extrato foi centrifugado por 3 min e a solução orgânica foi transferida para um frasco volumétrico que foi novamente extraída. O extrato foi filtrado a vácuo com papel filtro para remover resíduos sólidos e após coletado o mesmo foi eluído em uma coluna contendo 20 g de sulfato de sódio anidro para remover a água residual. Adicionou-se 1 mL de tolueno nesta solução e em seguida a mesma foi levada para o rotaevaporador até a secagem completa.

Os procedimentos de limpeza avaliados foram o uso de cartuchos de Extrelut NT-3 e Sep-Pak sílica e Sep-Pak C18, baixa temperatura e colunas de alumina ácida e neutra, sendo que a coluna de alumina ácida desativada com a mistura (6+3+1, v/v/v) de n-hexano, diclorometano e acetato de etila utilizado como solvente de eluição apresentou os melhores resultados. A identificação dos agrotóxicos avaliados foi realizada por GC-NPD ou por GC-FPD, sendo aplicado em 134

amostras comerciais. A curva analítica usada para quantificação foi na faixa de 0,01 a 0,05 mg L^{-1}. As recuperações obtidas para o nível 0,01 mg L^{-1} ficaram na faixa de 75,1 a 120,1% e o Desvio Padrão Relativo, RSD (do inglês *Relative Standard Deviation*) menor que 3% e com valores de LOD na faixa de 0,005 a 0,01 mg L^{-1}.

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica muito utilizada na extração de agrotóxicos em amostras ambientais e de diversos tipos de cereais como milho, trigo e outros derivados. O uso desta técnica é muito explorado e apresenta a possibilidade de combinar com outras técnicas como a PLE ou a MAE melhorando o método de extração (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2012).

Hu; Zhen; Deng (2011) desenvolveram um método simples e rápido para a determinação de acetocloro e propisoclor em amostras de milho e solo, com determinação por Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons, GC-ECD (do inglês *Electron Capture Detection*). A amostra de milho (20 g) foi extraída com 60 mL de acetona em banho ultrassônico por 3 min e depois filtrado. O resíduo foi submetido novamente a banho ultrassônico com 20 mL de acetona e o filtrado foi combinado com o anterior e particionado com diclorometano em três frações de 20 mL na presença de 10 g de cloreto de sódio. O extrato final foi dissolvido com 10 mL de éter de petróleo e destinado para SPE. Para a etapa de SPE utilizou-se um cartucho de Amina Primária Secundária, PSA (n- etilenodiamino propil) que foi ativado com 2 mL de éter de petróleo e o extrato foi percolado pela fase estacionária. Os analitos foram eluídos com 5 mL da solução éter de petróleo: éter acido (95:5, v/v) e o eluente concentrado e redissolvido em 2 mL de hexano e finalmente injetado no sistema GC-ECD. Esta técnica possibilitou resultados de recuperação entre 73,8 e 115,5% para os analitos estudados nas matrizes avaliadas.

A técnica ASE, também conhecida por PLE, assim como, a PHSE (*Pressurized Hot Solvent Extraction*), a SSE (*Subcritical Solvent Extraction*) e a HWE (*Hot Water Extraction*), utiliza solventes para elevar a temperatura e a pressão próxima à região supercrítica e então extrair os analitos da amostra (ZANELLA *et al.*, 2012). Já a GPC é uma técnica de limpeza utilizada principalmente para análise por Cromatografia Gasosa, principalmente para matrizes altamente gordurosas, pois uma pequena quantidade de lipídios pode reduzir o sinal ou causar dano à coluna cromatográfica (KOESUKWIWAT *et al.*, 2010).

Wu *et al.* (2011) desenvolveram um novo método analítico simultâneo para a determinação de 109 agrotóxicos incluindo isômeros em alimento de origem animal utilizando a técnica de ASE para extração e a GPC automatizada para limpeza, com determinação por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em série, GC-MS/MS (do inglês *Gas Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*). Os autores utilizaram acetonitrila como solvente extrator para promover uma extração eficaz dos agrotóxicos das amostras gordurosas. As matrizes avaliadas foram carne de porco, bovina, frango e peixe. O LOD do método obtido foi de 0,3 µg kg^{-1} pra alguns agrotóxicos. A linearidade foi maior ou igual a 0,99 entre 0,05 e 1,5 mg L^{-1}. O método foi validado com três níveis de fortificação nas concentrações de 0,05, 0,1 e 0,2 mg kg^{-1}. As recuperações para a maioria dos agrotóxicos foram de 62,6 a 107,8%, com RSD menor ou igual a 20,5%.

A extração assistida por micro-ondas (MAE) pode ser considerada um processo de preparo da amostra, pois a energia do micro-ondas é explorada como fonte de calor e com isso, as soluções alcançam seus pontos de ebulição rapidamente, aumentando a eficiência em um menor tempo de extração (ALBASEER *et al.*, 2010).

A técnica de extração assistida por micro-ondas (MAE) foi utilizada por Chiremba; Rooney; Beta (2012) para extrair ácidos fenólicos em farelo de trigo e frações de farinha obtidas a partir de oito cultivares de milho e oito de sorgo com diferente dureza, com determinação por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em série, HPLC-MS/MS (do inglês *High Performance Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*). A extração se deu com 200 mg de milho ou sorgo sendo extraída com 5 mL de uma solução 2 M de NaOH em um frasco de 45 mL de capacidade a 190 ºC. As amostras foram digeridas por 45 s e após o pH foi ajustado entre 1,5 e 2 da solução 6 N HCl e extraída três vezes com 15 mL de hexano para remover os lipídeos. A fase orgânica foi removida com um separador e a fase aquosa fenólica extraída com acetato de etila e após a fase orgânica foi desidratada com 1 g de Na_2SO_4 e o extrato coletado foi concentrado e seco em rota evaporador. O concentrado foi redissolvido em 2 mL com 50% de metanol seguido de filtração com filtros de 0,22 µm e injeção no sistema HPLC-MS/MS para análise dos ácidos fenólicos.

Outros métodos de extração têm sido muito utilizados para a extração de diferentes tipos de amostras, como frutas, vegetais, solo, sedimento, cereais e rações, etc. Atualmente o que mais tem se destacado é o método desenvolvido por Anastassiades *et al.* (2003) que é conhecido como QuEChERS sendo que este nome foi adotado devido as características apresentadas por este método. Sua utilização é tão ampla que várias modificações já foram testadas e tem apresentado resultados muito satisfatórios (PRESTES *et al.*, 2009).

Este método foi desenvolvido para a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de frutas e vegetais. O procedimento de extração utiliza 10 g de amostra extraída com 10 mL de acetonitrila e partição com 4 g de sulfato de magnésio anidro e 1 g de cloreto de sódio, sendo que em cada etapa efetua-se agitação por 1 min e centrifugação por 5 min a 5000 rpm. A etapa de limpeza é realizada utilizando 25 mg de PSA e 150 mg de $MgSO_4$ por mL de extrato, seguido de agitação por 30 s e centrifugação 6000 rpm por 1 min. O extrato final é analisado no sistema cromatográfico. Os autores obtiveram recuperações entre 85 e 101% para o método proposto (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Cunha; Fernandes (2011) utilizaram o método QuEChERS modificado combinado com a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, DLLME (do inglês *Dispersive Liquid–Liquid Microextraction*) na determinação de 41 agrotóxicos em amostra de milho com posterior análise por GC-MS. Para a otimização do procedimento de extração pesou-se 2,5 g da amostra processada em tubo de propileno com capacidade de 50 mL e em seguida adicionou-se 50 µL da solução padrão de trifenilfosfato e posteriormente adicionou-se 10 mL de água deionizada e 10 mL de acetonitrila. Os tubos foram agitados por 30 min e após realizou-se a etapa de partição com 4 g de sulfato de magnésio anidro e 1 g de cloreto de sódio seguido de agitação vigorosa por 1 min sendo então submetidos à centrifugação a 5000 rpm durante 4 min. Para o procedimento da DLLME, retirou-se 1 mL do extrato e transferiu-se para um *vial* de capacidade de 4 mL onde, adicionou-se 50 µL da solução do padrão interno e 100 µL de tetracloreto de carbono. Esta mistura foi transferida rapidamente para outro frasco cônico contendo 4 mL de água deionizada, onde após foi agitado durante 30 s e centrifugado a 5000 rpm durante 1 min. Para injeção no sistema GC-MS, transferiu-se 100 µL do volume estável formado para um *vial* e injetou-se 1 µL da amostra.

A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna DB-5MS 30m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme. O gás hélio foi utilizado como gás carreador com pressão inicial de 150 kpa mantida por 1 min e aumentando 2,2 kPa min^{-1} até 367,1 kPa. O modo de injeção utilizado foi o splitless durante 0,5 min e a temperatura do injetor a 280 ºC. A programação da temperatura da coluna foi: 80 ºC mantida por 2 min, aumentando até 180 ºC de 20 ºC min^{-1}, aumentando até 230 ºC de 5 ºC min^{-1}, aumentando até 280 ºC de 20 ºC min^{-1} e finalizando a 300 ºC de 40 ºC min^{-1} e mantido por 6 min. A temperatura da linha de transferência foi mantida em 280 ºC. O tempo total de corrida de 26 min. A temperatura da fonte de ionização foi de 230 ºC e do quadrupolo de 150 ºC. O modo de monitoramento do íon seletivo foi utilizado para esta análise.

O método validado apresentou valores de recuperação, para os dois níveis estudados, na faixa de 70-120% para 82% dos analitos. Boa linearidade e precisão foram obtidas com RSD abaixo de 20 % para todos os agrotóxicos analisados. O limite de detecção obtido foi de 19 µg kg^{-1} para mais de 63% dos compostos avaliados. Um total de dez amostras de milho foram analisadas, mas somente em duas amostras encontrou-se resíduos de lindano, teflutrin, pirimicarb, folpet e bifentrina abaixo dos níveis máximos permitidos.

Outra técnica que tem apresentado vantagem na determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras complexas é a técnica de precipitação a baixa temperatura a qual possibilita uma diminuição do efeito matriz além de diminuir a quantidade de gorduras a serem injetadas no sistema cromatográfico. Koesukwiwat *et al.* (2010) comenta que o método de precipitação de gorduras a baixa temperatura ajuda a eliminar a quantidade de coextrativos de outros solventes relativamente polares.

Marthe *et al.* (2010) avaliaram o uso da técnica MSPD com a precipitação a baixa temperatura para determinação dos piretróides cipermetrina e deltametrina em manteiga, com detecção por GC-ECD. Os parâmetros avaliados foram o tipo de adsorvente, o solvente extrator e a amostra com a proporção de sorvente. Sílica, florisil e C18 foram utilizados como adsorventes onde 0,5 g de cada sorventes foram testados. Para a proporção de amostra e adsorvente foram testadas 0,5; 1,0 e 1,5 g de adsorvente para 0,5 g de amostra. Como solvente extrator avaliou-se as

proporções de 6,5:1,5 e 6:2 mL de acetonitrila e acetato de etila, respectivamente. Para o volume de água testou-se 1 e 2 mL da mesma.

O procedimento de extração 0,5 g de manteiga se deu com 0,5 g de sílica gel condicionada, 2 mL de água, 6 mL de acetonitrila e 2 mL de acetato de etila. Após a mistura foi colocada em banho ultrassônico por 5 min. Terminado este processo a mistura foi levada para o freezer a -20 ºC por no mínimo 6 horas. Após esta etapa observou-se a formação de duas camadas sendo uma sólida e a outra líquida e procedeu-se a filtração desta fase em um funil contendo Na_2SO_4 anidro. O filtrado foi recolhido e o seu volume completado com acetonitrila até o volume de 10 mL.

O método de extração e precipitação foi validado e obteve resultados satisfatórios, com recuperações próximas a 90% e RSD menores que 10%. Os LODs para cipermetrina e deltametrina foram de 82 e 110 µg kg^{-1} e LOQs de 280 e 320 µg kg^{-1}.

O maior desafio para os analistas no desenvolvimento de um método multirresíduo é a obtenção de percentuais satisfatórios de recuperação dos analitos juntamente com a minimização das interferências através do uso de métodos de extração e limpeza apropriados. Nos últimos anos várias foram as aplicações e modificações realizadas no método QuEChERS com a finalidade de se alcançar este objetivo (PRESTES, 2011).

2.5.2 Determinação de resíduos de agrotóxicos em milho

A análise de resíduos de agrotóxicos em matrizes como cereais e rações pode ser considerada uma tarefa muito difícil, pois estas matrizes além de serem muito diversas apresentam alta complexidade devido aos interferentes presentes na matriz e a baixa concentração com que estes compostos estão usualmente presentes. Com isso, muitas vezes encontramos dificuldades na aplicação do método multirresíduo devido à presença de coextrativos que podem complicar a detecção, identificação e quantificação do analito em amostras de cereais e de ração quando comparadas a amostras de frutas e vegetais, pois estas contem um alto teor de água em sua composição (WALORCZYK; DROŻDŻYŃSKI, 2012). Outro fator importante é as diferentes classes e propriedades químicas apresentadas pelos

analitos em estudo, o que dificulta o desenvolvimento de uma metodologia que possa abranger todos os compostos desejados (GILBERT-LÓPEZ; GARCÍA-REYES; MOLINA-DÍAZ, 2009).

Prestes *et al.* (2009) comentam que a técnica GC-MS tem sido aplicada com frequência na determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de alimento e que este fato esta associado a facilidade do acoplamento GC-MS, da disponibilidade de um banco de dados (espectros de massa padrão) obtido no modo de ionização por impacto de elétrons. Isto permite a confirmação e a determinação de um grande número de compostos simultaneamente com baixos limites de detecção.

Devido a sua importância e grande utilização, alguns trabalhos utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, para análise de amostras de milho e outras matrizes gordurosas estão descritos a seguir.

Walorczyk (2007) desenvolveu um método multirresíduo para 122 agrotóxicos em amostras de cereais e de ração, com determinação por GC-MS/MS. Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial do GC acoplado com analisador triplo quadrupolo na sensibilidade e confiança na varredura do grande número de agrotóxicos analisados nestas amostras. Para o procedimento de extração utilizou-se 5 g de amostra, 10 mL de água e 15 mL de acetonitrila, seguido de agitação por 5 min. Para a etapa de partição foram adicionados 4 g de sulfato de magnésio anidro, 1 g de cloreto de sódio, 1 g de citrato de sódio tribásico dihidratado e 0,5 g de hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado, agitação por 1 min e posterior centrifugação a 2500 rpm por 5 min. Para a etapa de limpeza utilizou-se 7,5 mL de sobrenadante com 0,75 g de $MgSO_4$, 0,5 g de C18 e 0,125 g de PSA, seguido de agitação por 0,5 min e centrifugação a 2500 rpm por 5 min. Uma alíquota de 3 mL foi transferida para um tubo de vidro contendo 50 µL de uma solução 5% (v/v) de ácido fórmico em acetonitrila, sendo este extrato evaporado em nitrogênio e redissolvido em 1,5 mL de tolueno para injeção no sistema GC-MS/MS.

O método foi validado e as fortificações realizadas foram nos níveis de 0,01; 0,02 e 0,05 mg kg^{-1}. As recuperações ficaram na faixa de 73 a 129%, com RSD entre 1 e 29%. A faixa linear de trabalho foi de 0,002 a 0,2 mg L^{-1}, com coeficiente de determinação maior que 0,98. Os limites de detecção foram menores ou igual a 0,01 mg kg^{-1} para aproximadamente 68% dos agrotóxicos.

Mastovska *et al.* (2010) utilizaram o método QuEChERS modificado para o preparo da amostra nas matrizes arroz, milho, trigo e aveia. Neste trabalho avaliou-se aproximadamente 180 agrotóxicos com posterior determinação em Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas com Analisador por Tempo de Vôo, GC-TOFMS (do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry with Time-of-Flight Analiser*) e Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em Série, UPLC-MS/MS (do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry*).

O método foi desenvolvido e otimizado da seguinte maneira: às amostras previamente processadas (2,5 g milho, 3,5 g aveia, 5,0 g arroz e 5,0 g de trigo). Adicionou-se 10 mL de água deionizada, com exceção do arroz que se utilizou 15 mL, e também 10 mL de acetonitrila como solvente extrator para todas as amostras. Adicionou-se 200 µL da solução padrão e agitou-se em vórtex durante 1 hora. Para a etapa de partição adicionou-se 4 g de sulfato de magnésio anidro e 1 g de cloreto de sódio seguido de agitação vigorosa durante 1 min para prevenir a formação de aglomerados cristalinos e após centrifugou-se os tubos a 10000 rpm durante 10 min. Posteriormente transferiu-se 1 mL de extrato para tubos de 2 mL de capacidade contendo 150 mg de PSA, 50 mg de C18 e 150 mg de sulfato de magnésio anidro e em seguida submeteu-se agitação por 30 s e após centrifugação por 5 min. Terminado este processo, transferiu-se 300 µL do sobrenadante para um *vial* e adicionou-se 30 µL de uma solução na concentração de 1 µg mL^{-1} e agitou-se. Retirou-se 125 µL do extrato e transferiu-se para *insert* e levou-se para análise no sistema GC-TOFMS e UPLC-MS/MS.

O método foi validado para cada matriz avaliando-se três níveis de fortificação em duplicata, sendo os níveis com a concentração no extrato final de 12,5, 50 e 125 µg L^{-1}, respectivamente. Após a adição da solução padrão aguardou-se o tempo de contato de 30 min antes da extração. As recuperações obtidas ficaram na faixa de 70 a 120%, com RSD <20% para a maioria dos agrotóxicos. Este método apresentou como vantagem o aumento em torno de três vezes nas análises de rotina, redução de 40-50% dos custos do material disponível e de operação e aumento no número de análises em comparação ao método de Luke.

Kolberg *et al.* (2011) desenvolveram um método multirresíduo para a determinação de agrotóxicos em amostras como trigo, farinha e farelo de trigo

utilizando o método QuEChERS. A determinação dos 24 compostos estudados foi realizada por GC-MS com ionização química negativa e monitoramento do íon seletivo (GC-MS (NCI-SIM)). Inicialmente preparou-se o *slurry* das amostras a serem analisadas e deste preparo pesou-se 10 g para análise através do método QuEChERS. Para a etapa de extração adicionou-se 10 mL de acetonitrila a 1% de ácido acético com posterior agitação vigorosa por 1 min. Para a etapa de partição utilizou-se 3 g de sulfato de magnésio anidro, 1,7 g de acetato de sódio anidro e 1 g de citrato de sódio, seguindo de agitação vigorosa por 1 min e posterior centrifugação de 8 min a 4000 rpm. Para a etapa de limpeza retirou-se 4 mL do extrato e adicionou-se 600 mg de sulfato de magnésio e 500 mg de C18, seguida de agitação por 1 min e novamente centrifugação por 8 min a 4000 rpm. Terminado o procedimento procedeu-se a análise da amostra no sistema cromatográfico.

O método foi validado nos seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, efeito matriz, precisão e exatidão. Os autores avaliaram as recuperações nos níveis 5,0, 10,0, 20,0 e 50,0 µg kg^{-1}. As curvas de calibração foram lineares na faixa de 1,0 a 100 µg L^{-1} para o trigo, 2,0 a 200 µg L^{-1} para a farinha e o farelo, com valores de $r^2 > 0,99$. As recuperações obtidas ficaram entre 70 e 120% com RSD <20% para a maioria dos compostos.

Marchis *et al.* (2012) adotaram o método QuEChERS para a análise de diazinona, clorpirifós metílico, parationa-metílica, pirimifós-metílico, malationa, clorpirifós, parationa, pirimifós-etílico, etiona e deltametrina, em amostras de milho cru, com determinação por GC-MS. O procedimento de extração utilizado foi 5 g amostra, 10 mL de acetonitrila e 10 mL de água. Para a etapa de partição utilizou-se 4 g de sulfato de magnésio anidro, 1 g de cloreto de sódio, 1 g de citrato de sódio tribásico dihidratado e 0,5 g de hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado. Cada frasco foi agitado vigorosamente e centrifugado a 3000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi retirado e estocado a -20 ºC durante a noite. Esta etapa foi realizada a fim de promover a precipitação de açucares e gorduras da amostra. Uma alíquota de 6 mL foi submetida a etapa de limpeza com 900 mg de sulfato de magnésio, 150 mg de PSA e 50 mg de C18, seguido de agitação e centrifugação a 3000 rpm por 5 min.

Os autores testaram também 5 mL do extrato sendo tratada com diferentes quantidades de água (3 a 15 mL) e extração com diferentes quantidades de

isooctano (500 a 1500 µL) e também o uso do tampão citrato de pH 5-5,5. Sendo que a porção do isooctano foi transferida para o *vial* para injeção. Para limpeza foi utilizado 5 mL de acetonitrila, 15 mL de água e 1500 µL de isooctano, pois de acordo com os autores quanto mais isooctano, maior é a recuperação. A água foi adicionada antes da partição para facilitar a separação em duas camadas, pois produziu extratos limpos e mais concentrados. A adição de isooctano no extrato final tem a finalidade de evitar possíveis problemas com o grande volume de expansão da acetonitrila no injetor do GC. Recuperações foram obtidas na faixa de 60-105% exceto para a malationa que ficou em 53% e o RSD obtido foi abaixo de 9% para todos os analitos. Os valores do r^2 obtidos ficaram em torno de 0,99. Este método foi aplicado para 45 amostras sendo 21 amostras de milho e 24 amostras de soja.

Walorczyk; Drożdżyński (2012) aprimoraram um método multirresíduo para a determinação de agrotóxicos em amostras de cereais como: trigo, centeio, cevada, grãos de aveia, milho, etc. e vários alimentos animais, onde um total de 167 agrotóxicos foram determinados por GC-MS/MS triplo quadrupolo. Os autores otimizaram o método QuEChERS a fim de aumentar o escopo de agrotóxicos que pudessem ser determinados por este método. O volume de injeção utilizado foi de 5 µL utilizando a técnica de CSR-LVI (do inglês, *Concurrent Solvent Recondensation - Large Volume Injection*). A temperatura do injetor foi mantida inicialmente em 250 ºC por 1 min e aumentando até 300 ºC a 200 ºC min^{-1} e mantida por 20 min. A temperatura da fonte de ionização, da linha de transferência e do *manifold* foi de 270, 290 e 40 ºC, respectivamente. O argônio foi utilizado como gás de colisão no modo MS/MS a pressão de 1,7 mTorr.

Para o procedimento de extração utilizaram 5 g de amostra em um tubo de 50 mL e adição de 25 mL da mistura água/acetonitrila (proporção 2:3 v/v) seguindo de agitação vigorosa por 5 min. Adicionou-se 4 g de sulfato de magnésio anidro, 1 g de cloreto de sódio, 1 g de citrato de sódio tribásico dihidratado e 0,5 g de hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado e agitou-se novamente por 1 min e então se segue para a centrifugação a 4500 rpm por 2,5 min. Uma alíquota de 7,5 mL foi transferida para um tudo de 15 mL onde se procede a etapa de limpeza do extrato com 550 mg de PSA, 375 mg de C18 e 750 mg de sulfato de magnésio anidro e em seguida agitou-se por 30 s e novamente centrifugou-se por 2,5 min a 4500 rpm. Terminado este processo retira-se 3 mL deste extrato e evapora-se em nitrogênio e

reconstitui-se com 1,5 mL de tolueno para análise em GC-MS/MS. Os autores estudaram o uso de congelamento a -26 ºC por 2 horas antes da etapa de limpeza juntamente com diferentes quantidades de PSA (que variaram de 25 a 75 mg por mL) e a quantidade de C18 (50 mg por mL) foi mantida. O melhor resultado para limpeza foi com 75 mg de PSA e 50 mg de C18/1 mL de extrato com o sulfato de magnésio sem o uso de congelamento.

A recuperação avaliada nos níveis de fortificação 0,01, 0,05 e 0,25 mg kg^{-1} ficou na faixa de 96 ± 9% com RSD de 10 ± 4% em média. Os autores destacaram que no nível mais baixo (0,01 mg kg^{-1}) 137 dos 167 agrotóxicos estudados ficaram com a recuperação entre 70 a 120% e com RDS menor ou igual a 20% sendo que o anterior recuperou 93 dos 140 analitos. Este método foi adotado na rotina de 900 amostras reais, aumentando o escopo de matrizes a serem analisadas por este método.

Walorczyk *et al.* (2013) determinaram resíduos de agrotóxicos em diferentes culturas orgânicas entre os anos 2007 e 2010, utilizando como técnica de extração o método QuEChERS e a GC-MS/MS como técnica de determinação. Diferentes tipos de matrizes foram avaliados e entre elas milho.

Para este fim um cromatógrafo a gás modelo CP-3800 acoplado a um triplo quadrupolo 1200 foi utilizado. A coluna usada neste trabalho foi uma DB-5 MS 30 m x 0,25 mm x 0,5 µm. O gás hélio foi utilizado a uma vazão de 1,2 mL min^{-1}. A temperatura da coluna foi programada em 80 ºC e mantida por 3 min, aumentando 30 ºC min^{-1} até 150 ºC, e então aumentando 10 ºC min^{-1} até 300 ºC e mantida por 10 min. O modo de injeção utilizado foi o modo *splitless*. Os íons de interesse foram monitorados através do modo de monitoramento de reações múltiplas, MRM (do inglês *multiple reaction monitoring*). O gás argônio foi utilizado como gás de colisão a uma pressão de 1,7 mTorr. O método de extração utilizou acetonitrila como solvente extrator e sulfato de magnésio anidro juntamente com cloreto de sódio para a etapa de partição. O procedimento de limpeza do extrato utilizou 1 mL de extrato com 20 mg de PSA e 75 mg de C18.

2.6 Técnicas cromatográficas para determinação de resíduos de agrotóxicos

A Espectrometria de Massas Acoplada à Espectrometria de Massas em série utiliza dois MS para promover a separação dos íons de mesma razão m/z gerados na fonte de ionização, onde em um dos MS isola o íon de interesse e no outro é estabelecido uma relação entre o íon isolado e os outros íons gerados da decomposição induzida do analito (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

2.6.1 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

De acordo com Queiroz, Ferracini, Rosa (2012) "muitos agrotóxicos modernos são polares ou iônicos, os quais apresentam menor persistência e toxicidade ao meio ambiente, e não podem ser analisados diretamente por GC, necessitando assim da Cromatografia Líquida".

A Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas apresenta algumas vantagens como a de ser tanto universal como de alta seletividade, boa detectabilidade, permitir a avaliação da pureza do pico e confirmação da presença do composto desejado mediante a informação da massa molar e estrutural, constituindo a característica mais importante (COLLINS; BRAGA, BONATO, 2006).

Um espectrômetro de massas geralmente é constituído de três partes: a fonte de ionização, o analisador de massas e o detector (JARDIM; COLLINS; BONATO, 2006). Em Cromatografia Líquida as fontes de ionização geralmente mais utilizadas são a ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*) e a eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray interface*) (ALDER *et al.,* 2006). De acordo com Lanças (2009), a APCI é empregada na análise de moléculas menores e menos polares e a ESI é utilizada na análise de moléculas de maior polaridade e massa molecular. Isso pode ser explicado pelo fato da fase móvel, contendo o analito de interesse dissolvido na mesma, passar através de um capilar, à pressão atmosférica, que está mantido sob alta voltagem, formar pequenas gotas altamente carregadas ("*spray*") que são dessolvatadas. A dessolvatação ocorre através de um fluxo contínuo de gás seco, geralmente N_2, na

região do "*spray*", onde o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que as forças de repulsão entre as cargas similares ficam maiores que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Ocorre então, a "explosão coulômbica", que produz gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas das quais originaram. Inúmeras explosões então ocorrem até que são produzidos íons do analito a partir destas gotas e estes são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

A ESI permite que os compostos sensíveis à temperatura sejam ionizados sem sofrer degradação, pois a ionização ocorre diretamente na solução. Vale ressaltar também que devido ao modo de obtenção dos íons por esta fonte de ionização, a sua aplicação a compostos ionizáveis em solução e compostos altamente polares que podem ser facilmente ionizados é favorecida (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

2.6.2 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

A Cromatografia pode ser combinada com diferentes sistemas de detecção, tornando-se assim uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). De acordo com Prestes *et al.* (2009), ela permite que a confirmação e a determinação de um grande número de compostos seja feita simultaneamente. Além disso, possibilita obter baixos limites de detecção devido à alta seletividade proveniente de modos como o monitoramento do íon selecionado SIM (do inglês *Selected Ion Monitoring*), diminui o ruído e permite a análise em nível de traços na presença de interferentes da matriz. Esta técnica é aplicada para compostos voláteis e termicamente estáveis as temperaturas empregadas durante a separação cromatográfica (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

A Cromatografia Gasosa possibilita a aplicação de dois diferentes tipos de ionização a ionização: por elétrons, EI (do inglês *Electron Ionization*) e a ionização química, CI (do inglês *Chemical Ionization*), positiva ou negativa. A EI apresenta algumas vantagens como a baixa influência da estrutura molecular na resposta e o

grande número de fragmentos característicos gerados. Embora o modo CI, representada na Figura 6, proporcione uma melhor seletividade para muitos agrotóxicos, esta não é muito usada em métodos multirresíduos por não se tratar de uma técnica de ionização universal, além de, geralmente oferecer menos informações em seus espectros de massa provenientes do pequeno número de fragmentos produzidos pela mesma (ALDER *et al.*, 2006).

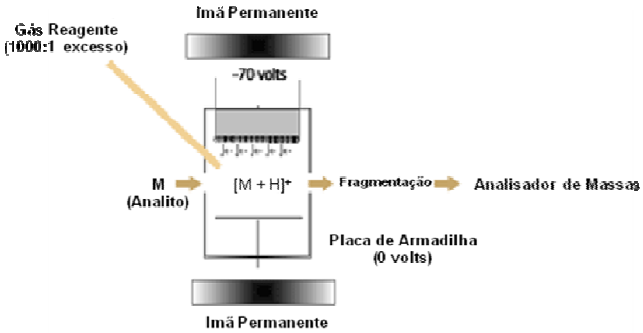


Figura 6 - Ionização Química (CI). Fonte: Adaptado de THE SAMUEL ROBERTS NOBLE FOUNDATION, INC. (2013)

Neste trabalho utilizou-se a ionização por elétrons, também conhecida como ionização por impacto de elétrons, onde este processo ocorre da seguinte maneira: na EI um filamento aquecido emite elétrons que são acelerados por um potencial de 70 eV e se dirigem para a fonte de íons, onde estes interagem com as moléculas do analito e se ionizam conforme a Figura 7.

$$M + \underset{70\ eV}{\bar{e}} \rightarrow \underset{\text{Íon molecular}}{M^+} + \underset{\sim 55\ eV}{\bar{e}} + \underset{0{,}1\ eV}{\bar{e}}$$

Figura 7 - Ionização por elétrons. Fonte HARRIS (2012)

Com a perda de um elétron ocorre à formação do íon molecular e em seguida, aplica-se um pequeno potencial para deslocar os íons até o tubo analisador (HARRIS, 2012).

Segundo Chiaradia; Collins; Jardim (2008), a fragmentação em EI é muito rápida e pode conduzir a não observação do íon molecular no espectro, perdendo-se informações importantes. Embora, seja o modo de ionização mais amplamente utilizado para identificação e quantificação de compostos desconhecidos em misturas complexas, segundo KOLBERG *et al.* (2011).

Neste estudo, utilizou-se o sistema de GC-MS/MS com ionização por elétrons. Utilizando o modo SRM, os compostos de interesse foram identificados e quantificados através de duas transições, uma para quantificação e outra para confirmação.

2.6.3 Analisadores de massas do tipo triplo quadrupolo

A Espectrometria de Massas acoplada à Espectrometria de Massas (MS/MS) é uma técnica que permite a união de dois espectrômetros de massas (MS1 e MS2) a fim de realizar uma análise em duas partes onde no MS1 (ou Q1) tem como finalidade isolar o íon desejado e no MS2 (ou Q3) mostrar a relação do íon de interesse com os outros íons gerados a partir da sua fragmentação (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

São muitos os tipos de analisadores de massas utilizados na Cromatografia Gasosa, como exemplos podemos citar: quadrupolo, triplo quadrupolo, tempo de vôo, armadilha de íons, etc. A seguir está descrito o analisador de massas triplo quadrupolo, já que este foi utilizado neste trabalho.

Triplo Quadrupolo (TQ ou QqQ): este instrumento é composto por três quadrupolos em série, onde o segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons, mas sim como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo (Q1) geralmente por dissociação induzida por colisão (DIC, do inglês *collision-induced dissociation*) com um gás inerte (geralmente Ar, He ou N_2), e também sendo empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo (Q3) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008), como representado na Figura 8:

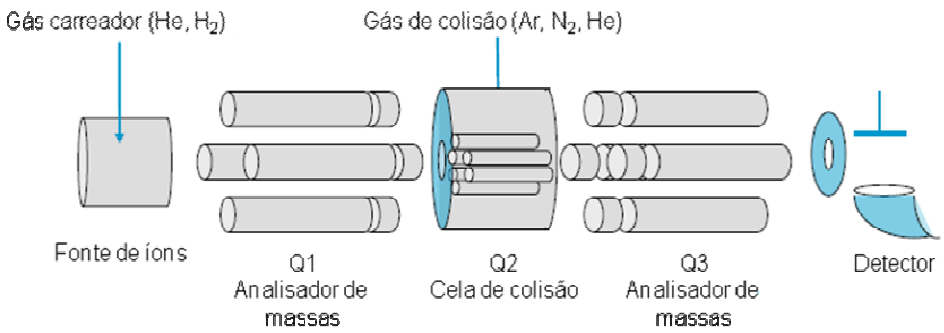


Figura 8 - Esquema de um analisador triplo quadrupolo. Fonte: Adaptado de AGILENT TECNOLOGIES (2012).

De acordo com Chiaradia; Collins; Jardim (2008), “os triplo quadrupolos permitem a obtenção de menores LODs, de forma que podem ser mais adequados em casos de compostos com menores Limites Máximos de Resíduos”. Além disso, o seu uso torna-se apropriado para analises em nível de traços em matrizes muito complexas, com presença de interferentes com é o caso de amostras vegetais, ambientais, entre outros (STASHENKO; MARTINEZ, 2010).

Os analisadores podem operar em diferentes modos na aquisição de dados do espectro de massas em MS/MS, sendo que os principais modos estão descritos abaixo:

a) Varredura Total: este tipo de aquisição é realizado geralmente em analisadores com apenas um MS. No triplo quadrupolo o Q1 faz uma varredura completa e registra o espectro de massas de cada um dos analitos que estão sendo analisados. Os quadrupolos Q2 e Q3 operam no modo de transmissão dos íons (STASHENKO; MARTINEZ, 2010).

b) Varredura dos íons produzidos (do inglês *product-ion scan*): nesta varredura o íon de interesse é isolado no Q1 e em seguida fragmentado no Q2 ou cela de colisão. No Q3 ocorre a varredura dos íons produzidos provenientes da fragmentação, gerando um espectro de massas do íon que foi isolado no Q1(CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008), como demonstrado na Figura 9:

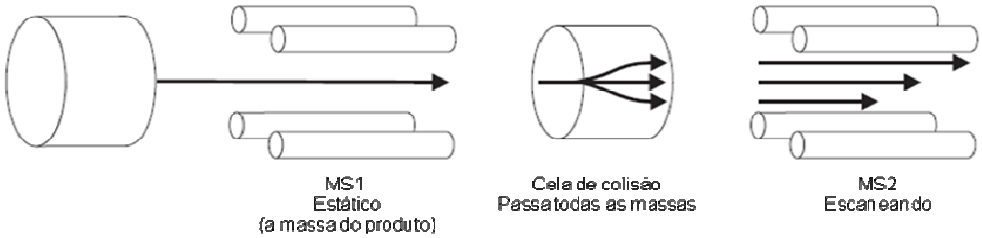


Figura 9 - Modo de varredura do íon produto. Fonte: Adaptado de Waters (2010)

c) Varredura do íon precursor (do inglês *precursor-ion scan*): este tipo de varredura é feita quando o Q1 é ajustado para transmitir íons dentro de um intervalo de m/z de interesse, os quais são fragmentados no Q2 ou cela de colisão, para que em Q3 sejam transmitidos íons de uma única razão m/z, no caso o íon produto selecionado (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008), representado pela Figura 10:

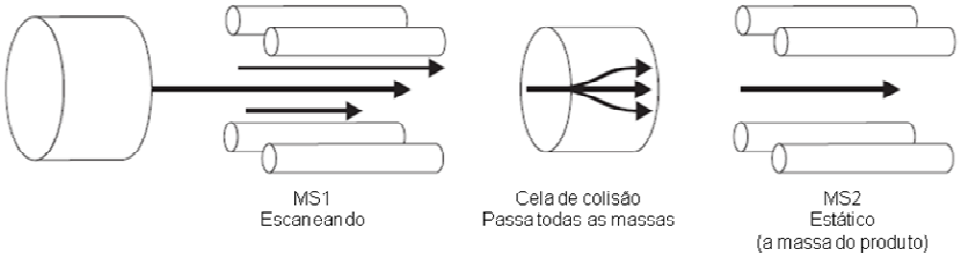


Figura 10 - Modo de varredura do íon precursor. Fonte: Adaptado de Waters (2010)

d) Monitoramento do íon selecionado (SIM do inglês *selected ion monitoring*): neste monitoramento o quadrupolo Q1 deixa passar o íon ou vários íons selecionados, que são característicos do analito alvo desejado, presentes em uma mistura complexa. Os quadrupolos Q2 e Q3 somente transmitem os íons filtrados pelo Q1 (STASHENKO; MARTINEZ, 2010).

e) Monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *multiple reaction monitoring*): possibilita a melhora na seletividade e na razão sinal/ruído em um cromatograma. Neste monitoramento, uma mistura de íons entra no quadrupolo Q1, que libera apenas um íon precursor selecionado para o Q2. Enquanto o íon está no Q2, que é chamado de célula de colisão, o íon precursor colide com moléculas de N_2 ou Ar, sob uma pressão de aproximadamente 10^{-5} a 10^{-3} Torr, e se fragmenta formando os íons produto. O quadrupolo Q3 permite que somente determinados

íons produto passem para o detector, conforme representado pela Figura 11. Este monitoramento caracteriza-se por ser extremamente seletivo para os analitos de interesse (HARRIS, 2012). Stashenko; Martinez (2010) destacam que o uso do triplo quadrupolo no modo MRM é importante para análises de compostos presentes em nível de traços em matrizes muito contaminadas, complexas e com muitas interferências como em análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos, amostras ambientais, biológicas e também na análise de biomarcadores em petróleo.

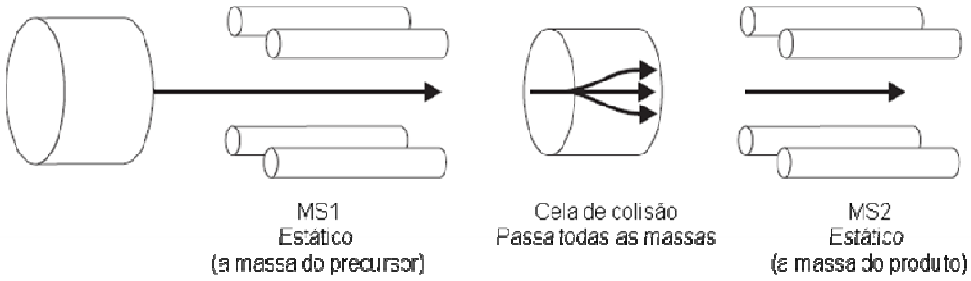


Figura 11 - Modo de monitoramento de reações múltiplas. Fonte: Adaptado de Waters (2010)

2.6.4 Celas de colisão

Em MS/MS vários tipos de celas de colisão são conhecidas e merecem destaque, mas neste trabalho foi utilizada a cela de Dissociação Induzida por Colisão (DIC). Na cela, o íon precursor proveniente do Q1 (MS1) é acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior do Q2, onde sofre repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia (geralmente Ar, He ou N_2), o que leva a um aumento na energia potencial deste íon até ocasionar sua fragmentação, conduzindo à formação dos íons produto (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; STASHENKO; MARTINEZ, 2010). Além das informações estruturais, a DIC pode melhorar a detectabilidade do método quando usada para gerar um íon característico de uma molécula e assim realizar a sua detecção a partir deste íon fragmento quando a molécula de analito de interesse se encontra em presença de

outras moléculas de mesma massa molar nominal, que por sua vez reduz o ruído e aumenta a detectabilidade (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

2.7. Planejamento fatorial

Em um planejamento experimental, segundo Neto; Scarmino; Bruns (2010) “um dos problemas mais comuns para quem faz experimentos é determinar a influência de uma ou mais variáveis sobre uma outra variável de interesse”. Segundo Cunico *et al*.(2008), o planejamento fatorial tem como objetivo identificar quais os fatores que apresentam efeitos na resposta, bem como a variação do efeito de um fator com os níveis de outros fatores e também estabelecer e quantificar as correlações entre os diferentes fatores.

Antes de iniciar o planejamento experimental devem ser definidos os fatores e as respostas de interesse. Ambos podem ser qualitativos ou quantitativos, porém as respostas são as variáveis de saída do sistema, que é o que nos interessa e que poderão ou não ser afetadas pelas modificações provocadas pelos fatores. Definido os fatores e as respostas define-se o objetivo que almejamos conseguir a fim de se escolher o planejamento mais adequado (NETO; SCARMINO; BRUNS, 2010).

Caso o número de variáveis seja quatro, por exemplo, demonina-se este como planejamento fatorial 2^4, onde avalia-se a interação entre quatro variáveis somando um total de 16 ensaios, pois são dois diferentes níveis para quatro fatores. Isso nos permite calcular 15 efeitos sendo quatro efeitos principais, seis interações de dois fatores, quatro interações de três fatores e uma interação de quatro fatores (NETO; SCARMINO; BRUNS, 2010).

Os fatores são codificados com sinal positivo (+) e negativo (-) para que se possa indicar os níveis superiores e inferiores dos mesmos e sua escolha é arbitrária, pois não interfere nos resultados (CUNICO *et al*., 2008; NETO; SCARMINO; BRUNS, 2010). Deve-se ressaltar que em um planejamento fatorial fazer réplicas ou repetições de um experimento tem grande importância para a determinação do erro experimental do resultado (CUNICO *et al*., 2008).

Em geral, neste planejamento não se trabalha com repetições, mas neste caso adotou-se duas fortificações de mesmo nível e utilizou-se a média das repetições para cada teste. As variáveis e os resultados estão representados pelo

exemplo abaixo e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7 (NETO; SCARMINO; BRUNS, 2010).

Tabela 7 - Variáveis e resultados obtidos no planejamento fatorial 2^4.

Fatores			**(-)**	**(+)**
1	Tempo de agitação (min)		15	60
2	Tipo de sorvente		C18	PSA
3	Tempo de resfriamento (h)		6	12
4	Temperatura (ºC)		-10 ºC	-20 ºC
Resposta:	**Rendimento (%)**			
Ensaio	**1**	**2**	**3**	**4**
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+

De acordo com Teófilo; Ferreira (2006) os coeficientes de contrastes são obtidos através do produto dos sinais originais das variáveis envolvidas, como pode ser visualizado na Tabela 8.

Tabela 8 - Coeficientes de contraste para calcular os efeitos.

1	2	3	4	12	13	14	23	24	34	123	124	134	234	1234
-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Segundo NETO, SCARMINO, BRUNS, (2010) a partir dos coeficientes de contrastes constrói-se uma matriz **X** com os elementos -1 ou +1 onde, pode-se calcular os efeitos, através do produto $\mathbf{X}^t\mathbf{y}$, sendo que **y** é o resposta média do ensaio. A estimativa do erro padrão para o modelo foi calculada através da Equação 1 para interpretação dos resultados obtidos.

$$\hat{V}(y) = s^2 = \sum d_i^2 / 2N$$

Equação 1

Onde d_i é a diferença entre as duas observações correspondentes ao i-ésimo ensaio.

Com isso, obtêm-se a Figura 12, que apresenta a significância de cada efeito bem como a sua interação com outro(s) facilitando assim a determinação de quais variáveis são realmente significativas e de maior relevância no experimento.

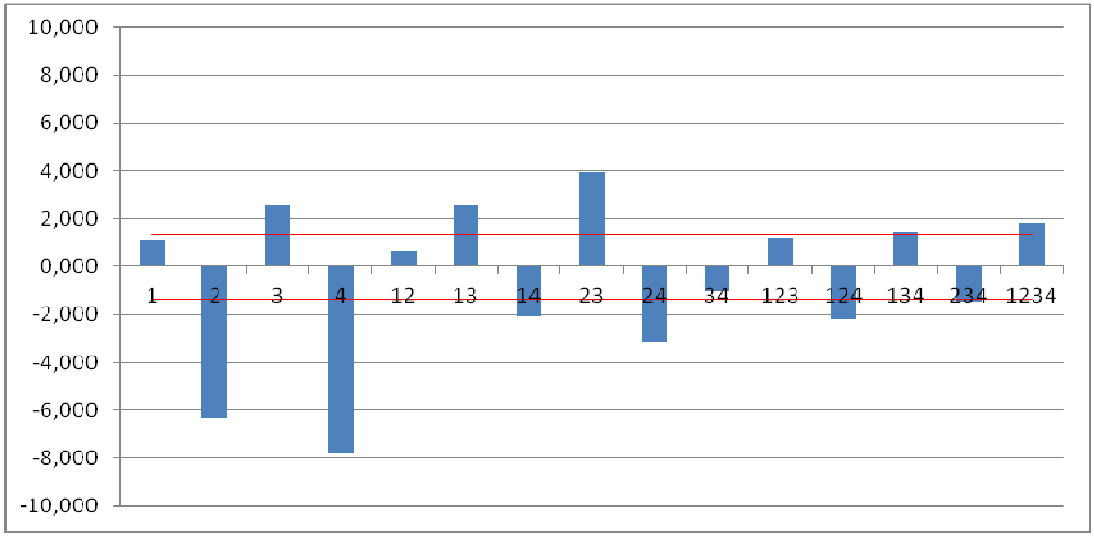


Figura 12 - Resultado de interações das variáveis avaliadas no planejamento.

A fim de se obter um resultado mais confiável, principalmente quando se trata de variáveis quantitativas, pode-se utilizar o planejamento estrela ou também chamado de planejamento fatorial com ponto central. Este planejamento inclui um ponto central com três repetições, representado pela Figura 13, pois isto possibilita avaliar a significância dos efeitos ou coeficientes em metodologias de superfície de resposta e outros tipos de planejamento. Esta metodologia é possível de ser aplicada quando se usa somente variáveis quantitativas (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

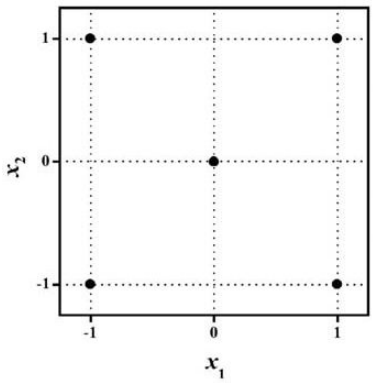


Figura 13 - Planejamento fatorial de dois níveis com ponto central. Fonte: Adaptado de TEÓFILO; FERREIRA (2006).

Ferramentas como estas têm ganhado mais espaço a cada dia, pois além de suas vantagens promovem a redução dos custos, a diminuição de resíduos gerados bem como uma melhor interpretação dos resultados.

2.8 Validação de métodos cromatográficos

Segundo Lanças (2009) a validação de um método analítico envolve um procedimento que comprova que o método oferece os resultados esperados com credibilidade, precisão e exatidão adequados. Este é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de seu desenvolvimento e transferência (RIBANI *et al.* 2004).

O INMETRO sugere que se faça um planejamento da validação obedecendo alguns itens: definir a aplicação, objetivo e escopo do método; definir os parâmetros de validação e os critérios de aceitação; verificar se as características de desempenho do equipamento estão compatíveis com o exigido pelo método em estudo; qualificar os materiais, por exemplo, padrões e reagentes; planejar os experimentos de validação, incluindo o tratamento estatístico, e os experimentos de validação (INMETRO, 2011).

Os parâmetros analíticos a serem validados devem levar em consideração a intenção do uso do método (RIBANI *et al.*, 2004). Apesar de não existir um consenso sobre quais os parâmetros devem ser incluídos no processo de validação (LANÇAS, 2009), o INMETRO tem como parâmetros os itens: precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade), seletividade, tendência/recuperação, robustez, faixa de trabalho e faixa linear, limite de detecção e quantificação (INMETRO, 2011).

2.8.1 Padrão interno e padrão de controle

O padrão interno é um composto que quando adicionado à amostra não interfere na análise. Para isso deve apresentar alguns requisitos como: nunca ser encontrado na amostra; estar disponível em elevado grau de pureza; ser adicionado à amostra em concentrações similares aos compostos a serem analisados; e ser bem resolvido dos outros picos (LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004). Este método é menos sensível a erros de injeção, variações instrumentais, entre outros (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O padrão interno também pode ser utilizado para resolver problemas com o efeito matriz, uma vez que faz-se a comparação de sua área na injeção das soluções padrão e da matriz para verificar se houve ou não variação na área dos analitos vindo do efeito matriz (SILVA; COLLINS, 2011).

Segundo Lanças (2009), este método é muito útil, pois independe de pequenas mudanças em variáveis experimentais, como temperatura da coluna, fluxo da fase móvel e tamanho da amostra.

O padrão de controle ou de substituição (*surrogate*) tem como finalidade comparar a sua área com as áreas das soluções com concentração conhecida. Isto é feito para que após a análise das soluções construa-se um gráfico para relacionar as áreas obtidas com as concentrações, para que se possa calcular a concentração desta substância. O método de padrão de substituição é sensível a erros de preparo de amostras e dos padrões de injeção das soluções padrão e das amostras, segundo RIBANI *et al.* (2004). Atualmente padrões deuterados têm sido introduzidos para exercer esta função.

2.8.2 Seletividade

Segundo Lanças (2009), a seletividade corresponde à capacidade de um método em determinar um analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias suscetíveis de interferirem na determinação.

Desse modo a seletividade tende a garantir que a resposta obtida seja do analito desejado assegurando assim a linearidade, a precisão e a exatidão como relata RIBANI *et al*. (2004).

2.8.3 Curva analítica e faixa de trabalho

A linearidade, segundo Lanças (2009), é a resposta obtida em função da concentração do analito, a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado.

A relação entre o sinal e a massa ou concentração do analito pode ser quantificada através de uma equação da reta chamada curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004), ou seja, relacionar a resposta do equipamento com a concentração do analito desejado através de um gráfico (LANÇAS, 2009).

De acordo com o INMETRO (2011) a equação da reta que relaciona duas variáveis é, representada pela Equação 2:

$$y = a + bx \qquad \text{Equação 2}$$

sendo:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);
x = concentração;
a = interseção com o eixo y, quando x = 0;
b = inclinação da curva analítica = sensibilidade.

Como se pode perceber o método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação (b) (INMETRO, 2011).

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (INMETRO, 2011).

2.8.4 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra. É fundamental assegurar-se de que todas as etapas de processamento do método analítico sejam incluídas na determinação desse limite de detecção. Para a validação de um método analítico, é normalmente suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco/ruído (INMETRO, 2011).

O LOD corresponde a menor quantidade de um analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (LANÇAS, 2009; RIBANI *et al*., 2004). O INMETRO (2011) recomenda um mínimo de 7 replicatas para a determinação do LOD. Este pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al*., 2004).

O LOQ, de acordo com Lanças (2009), corresponde a menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e fidelidade determinada. Para a análise em nível de traços recomenda-se adotar o LOQ como a concentração mais baixa da curva analítica (INMETRO, 2011).

2.8.5 Exatidão

A exatidão é determinada através do uso de uma amostra certificada onde a concentração do analito de interesse é conhecida (Lanças, 2009).

Os processos mais utilizados para se avaliar a exatidão de um método são: uso de materiais de referência certificados (MRC), comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2011).

Estes MRC possuem valor de concentração, ou outra grandeza, para cada parâmetro e uma incerteza associada. Sendo assim é de suma importância o fornecimento destes MRC seja realizado por organismos conhecidos e confiáveis como o INMETRO, NIST, entre outros (INMETRO, 2011; RIBANI *et al*., 2004).

Na comparação interlaboratorial, as análises são realizadas em replicata para o método em desenvolvimento e o método de referência, sobre as mesmas amostras em uma faixa de concentração desejada para validação do mesmo (RIBANI *et al.*, 2004).

A recuperação do analito pode ser estimada através de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito em três diferentes níveis de concentração da faixa de aplicação do método (INMETRO, 2011).

Segundo INMETRO (2011), a recuperação é calculada utilizando a Equação 3:

$$R\,(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \qquad \text{Equação 3}$$

Sendo:

C_1 = concentração do analito na amostra fortificada;

C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada;

C_3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

2.8.6 Precisão

A precisão é a expressão da concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra, conforme LANÇAS (2009). Do mesmo modo para Ribani *et al*. (2004) representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas.

Esta pode ser representada através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV) (RIBANI *et al.*, 2004), expresso pela Equação 4:

$$RSD\,(\%) = \frac{s}{Xm} \times 100 \qquad \text{Equação 4}$$

onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

$s = \{\sum(x_i - x_m)^2 / N - 1\}^{1/2}$

x_i = valores individuais;

x_m = média das medidas em replicatas;

N = número de medidas.

Em métodos de análise de traços ou impurezas é aceito um RSD de até 20%, isso é claro dependendo da complexidade da amostra. (RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade; precisão intermediária; reprodutibilidade (RIBANI *et al.*, 2004).

A repetitividade ou repetibilidade conforme Lanças (2009), expressa a fidelidade obtida nas mesmas condições operacionais (mesmo analista, mesmo equipamento, etc.) aplicadas em um curto intervalo de tempo. Do mesmo modo, a repetitividade pode ser expressa quantitativamente levando-se em consideração a dispersão dos resultados obtidos e pode ser determinada através da análise de padrões, material de referência ou adição dos analitos em amostra branco, em várias concentrações na faixa de trabalho (INMETRO, 2011).

A precisão intermediária tem como finalidade, segundo Ribani *et al.* (2004) indicar o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores, ou seja, tem como objetivo verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados.

A reprodutibilidade de acordo com Lanças (2009) designa a fidelidade entre laboratórios, geralmente obtida em análises colaborativas. É importante salientar que a reprodutibilidade tem como função confirmar se determinada metodologia pode ou não ser transferida de um laboratório para outro, gerando assim, resultados aceitáveis dentro dos critérios estabelecidos (LANÇAS, 2009).

2.8.7 Efeito matriz

De acordo com Pinho *et al*. (2009), o efeito matriz pode causar outras alterações na análise cromatográfica como: *i*) mascaramento do pico do analito de interesse, gerando um resultado falso negativo; *ii*) erro na identificação do analito, pois componentes da matriz podem ser erroneamente identificados como o analito de interesse quando, na verdade, este está ausente, gerando resultado falso positivo; *iii)* aumento no sinal do detector, levando à superestimação do resultado.

O efeito matriz também pode ser definido como o aumento da resposta cromatográfica induzida pela matriz, sendo estudado para explicar as taxas de recuperação de analitos que excedem 100% e também a baixa precisão dos resultados (PINHO *et al*., 2009). Em outras palavras a principal consequência do

efeito matriz é um aumento ou decréscimo do sinal do analito presente na matriz quando comparado ao padrão no solvente (GILBERT-LÓPEZ; GARCÍA-REYES; MOLINA-DÍAZ, 2009).

Na literatura encontram-se relatos de que o efeito matriz é mais pronunciado em amostras mais complexas que apresentam em sua composição grandes quantidades de lipídeos, açúcares, proteínas, etc, características essas que podem influenciar neste efeito.

Na Cromatografia Gasosa o efeito matriz não depende apenas das características dos analitos a serem analisados, mas também de condições cromatográficas do injetor, da coluna e do detector. Altas temperaturas no injetor podem acarretar na redução da adsorção de analitos na superfície do insersor (*liner)* e também acelerar a decomposição de compostos termicamente instáveis (PINHO *et al.* 2009). Além disso, uma variedade de fatores pode influenciar o efeito matriz, entre eles podemos citar: o número e o tipo de sítios ativos no injetor e na coluna de GC, a estrutura química dos analitos, a concentração do analito, a temperatura de injeção, o tempo de interação e do tipo de matriz e de sua concentração (PRESTES *et al.*, 2009; ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

De acordo com Pinho *et al.* (2009), “a intensidade do efeito de matriz para dado agrotóxico é influenciada pela natureza da amostra e pelo tipo de co-extrativos (tamanho das moléculas, polaridade, estabilidade térmica, volatilidade, etc).” Com isso, adota-se o preparo de padrões no extrato “branco” da matriz com o objetivo de se obter um melhor sinal cromatográfico e limites de detecção mais baixos. Embora, tenha-se a dificuldade de se encontrar “brancos”, além do aumento nas manutenções dos equipamentos decorrentes de maiores quantidades de matriz injetada no sistema (PRESTES *et al.*, 2009).

Em GC uma boa maneira de se lidar com esse efeito é com o uso de analitos protetores, que são compostos extremamente polares que são adicionados nos extratos das amostras e nas soluções de calibração para que o analito protetor possa interagir com os sítios ativos no sistema GC (PAYÁ *et al.*, 2007). Este procedimento apresenta alguns benefícios do uso de analitos protetores na quantificação tais como: é um procedimento simples, possibilita baixos limites de quantificação, melhora a quantificação, menos manutenções são necessárias no

sistema cromatográfico e o baixo custo (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Porém, Pinho *et al.* (2009) diz que:

> "a principal limitação desta técnica é que os melhores analitos protetores são muito polares, sendo necessária a utilização de solventes, como acetonitrila ou água, para preparar as soluções-padrão, o que limita sua utilização para análises de agrotóxicos apolares por cromatografia gasosa."

Sendo assim, destaca-se como método mais comum o preparo das soluções-padrão no próprio extrato da matriz a fim de reduzir o efeito matriz (PINHO *et al.*, 2009).

É importante destacar que o efeito matriz pode ser classificado em três categorias de acordo com o seu valor. Com um percentual entre -20 e +20% não é considerado efeito matriz, pois essa variação é próxima dos valores de repetibilidade. Um efeito matriz médio ocorre quando os valores estão entre -50 e -20% ou +20 e +50% e um forte efeito matriz quando os valores estão abaixo de -50% e acima de +50% (FERRER *et al.*, 2011).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O procedimento experimental consistiu na otimização e validação do método QuEChERS original para determinação de resíduos de agrotóxicos em milho por GC-MS/MS.

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

3.1 Instrumentação

A instrumentação utilizada no desenvolvimento deste trabalho está descrita a seguir:

- ✓ Sistema GC-MS/MS: Cromatógrafo a gás Varian 1200-MS equipado com:
  - ➢ Amostrador automático CP 8400 (Varian, EUA);
  - ➢ Injetor modelo 1079, com Programação de Temperatura de Vaporização – PTV, com insersor de vidro silanizado (d. i. de 3.4 mm) contendo cerca de 0,5 cm de carbofrita (Varian, EUA);
  - ➢ Coluna capilar CP-Sil 8 CB LOW BLEED/MS com 30 m x 0,25 mm de d.i. e 0,25 µm de espessura de filme;
  - ➢ Detector de massas triplo quadrupolo 1200, operando no modo SRM (Varian, EUA);
  - ➢ Cromatógrafo a gás CP 3800 (Varian, EUA);
  - ➢ Sistema de aquisição de dados através do *software* MS *Workstation* 6.4 (Varian, EUA);
- ✓ Balança analítica de precisão: AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- ✓ Agitador Vórtex – Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ✓ Balança analítica de precisão AND, modelo SV-200 (Japão);
- ✓ Centrífuga (Centribio, Brasil);
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha e Eppendorf, Canadá);

- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3® (Millipore, Bedford, MA, USA).
- ✓ Balança analítica de precisão UX-420H (Shimadzu, Japão);
- ✓ Mesa agitadora pendular TE-240/1 (TECNAL, Brasil);
- ✓ Centrifuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);

3.2 Materiais e reagentes utilizados

- ✓ Acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3® (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- ✓ Cloreto de sódio p.a. (Sigma-Aldrich, Brasil);
- ✓ Extran® neutro (Merck, Brasil);
- ✓ Filtros de nylon de 13 mm e porosidade de 0,2 µm (Vertical Chromatography, Tailândia);
- ✓ Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 mL;
- ✓ *Inserts* de capacidade de 200 µL (Analítica, Brasil);
- ✓ Gás de colisão: Argônio 99,9992% de pureza (Air Products, Brasil);
- ✓ Gás de arraste: Hélio 99,9997% de pureza (Air Products, Brasil);
- ✓ Acetona grau HPLC (Mallinckrodt, NJ, EUA);
- ✓ Hexano (95% n-hexano) (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Padrões sólidos dos agrotóxicos estudados, conforme Tabela 8.
- ✓ Sorvente Bondesil C18 com tamanho de partícula de 40 µm (Agilent, EUA);
- ✓ Sorvente Bondesil PSA com tamanho de partícula de 40 µm (Agilent, EUA);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro p.a. (J.T. Baker, Japão);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas rosqueáveis, capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ✓ Espátulas;
- ✓ Timers - controladores de tempo;
- ✓ Septos para tampas de vial.
- ✓ Vidraria comum de laboratório;

3.3 Processamento da amostra

As amostras "branco” de grãos de milho foram adquiridas de uma localidade do interior de Nova Palma, no Rio Grande do Sul. Uma porção de 1000 g de amostra foi processada utilizando o moinho até que está adquirisse um aspecto de farelo e em seguida foi armazenada em potes com capacidade de 200 gramas até o momento da sua utilização. Para armazenamento da amostra a mesma foi mantida a temperatura ambiente.

3.4 Seleção do padrão interno e do padrão de controle

Para este trabalho selecionou-se como padrão interno, para avaliação do instrumento, o composto trifenilfosfato (TPP, do inglês *triphenyl phosphate*). Ao extrato final (150 µL) destinado a análise por GC-MS/MS adicionou-se 10 µL de padrão interno na concentração de 10 mg L^{-1}.

Como padrão de substituição selecionou-se o padrão deuterado trifluralina d-14 para verificar a eficiência do procedimento de extração e de limpeza do extrato.

Para todas as amostras de grãos fortificadas (2,5 g) foi adicionado 100 µL da solução do padrão de controle na concentração de 10 mg L^{-1}.

3.5 Agrotóxicos selecionados

Os agrotóxicos utilizados na cultura do milho bem como no armazenamento de grãos da mesma, avaliados neste trabalho, foram selecionados com base na ANVISA e União Européia. Os compostos selecionados para este estudo foram adquiridos da empresa Dr. Ehrenstorfer (Ausburg, Alemanha).

3.6 Preparo das soluções analíticas

O preparo das soluções analíticas estoque de 1000 mg L^{-1} de cada agrotóxico se deu a partir da pesagem da massa do padrão sólido calculada e diluída no solvente adequado. Os solventes mais utilizados são acetonitrila, tolueno e metanol, todos grau HPLC. O cálculo para pesagem é feito levando-se em consideração a pureza do sólido.

Com a solução de 1000 mg L^{-1} de cada composto, preparou-se as misturas dos agrotóxicos em solvente na concentração de 10 mg L^{-1} e após as soluções foram armazenadas em frasco âmbar a - 5 ºC.

A partir da mistura 10 mg L^{-1} realizou-se as fortificações das amostras e também, preparou-se uma mistura 1 mg L^{-1} de todas as soluções para que se pudesse fazer as curvas de trabalho na matriz e no solvente. As soluções analíticas de trabalho foram preparadas em solvente nas concentrações de 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 µg L^{-1}. A Tabela 9 apresenta informações sobre os pesticidas utilizados neste trabalho e suas estruturas encontram-se no anexo A.

Tabela 9 - Relação dos compostos avaliados, com informações sobre a classe, grupo químico, fórmula molecular e massa molar.

Composto	Classe	Grupo Químico	Fórmula Molecular	M. M. (g/mol)
Alacloro	H	Cloroacetanilida	$C_{14}H_{20}ClNO_2$	269,7
Bifentrina	I, F e A	Piretróide	$C_{23}H_{22}ClF_3O_2$	422,9
Clorpirifós etílico	I, F e A	Organofosforado	$C_9H_{11}Cl_3NOPS_3$	350,6
Deltametrina	I e F	Piretróide	$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	505,2
Esfenvalerato	I	Piretróide	$C_{25}H_{22}ClNO_3$	419,9
Fenitrotiona	I e F	Organofosforado	$C_9H_{12}NO_5PS$	277,2
Malationa	I e A	Organofosforado	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	330,3
Pirimifós metílico	I e A	Organofosforado	$C_{11}H_{20}N_3O_3PS$	305,3
Quintozeno	F	Cloroaromático	$C_6Cl_5NO_2$	295,3
Tetradifona	A	Clorodifenilsulfona	$C_{12}H_6Cl_4O_2S$	356,0
Trifenilfostato_PI	I	Organofosforado	$C_{12}H_{15}O_4P$	326,3
Trifloxistrobina	F	Estrobilurina	$C_{20}H_{19}F_3N_2O_4$	408,4
Trifluralina	H	Dinitroanilina	$C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$	335,3
Trifluralina d-14_PS			$C_{13}H_2F_3N_3O_4D_{14}$	348,4

A: acaricida; F: fungicida; H: herbicida; I: inseticida; PI: padrão interno; PC: padrão de controle e M.M: massa molar.
Fonte: Anvisa (2012).

3.7 Otimização do sistema GC-MS/MS para a determinação de resíduos de agrotóxicos em milho

A Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em Série (GC-MS/MS) foi utilizada neste trabalho, devido às vantagens proporcionadas pela mesma como, a possibilidade de eliminação de interferências espectrais, a minimização dos problemas de coeluição de compostos, a utilização de modos que diminuem a possibilidade de identificação equivocada como é o caso do modo SIM e SRM, além de proporcionar maior sensibilidade e seletividade às análises em nível de traços. Na sequência estão descritos os parâmetros do sistema cromatográfico GC-MS/MS otimizados para a análise dos agrotóxicos deste trabalho.

3.7.1 Condições cromatográficas para o sistema GC-MS/MS

A programação da temperatura do forno foi realizada de maneira a obter a melhor separação dos analitos e evitar a coeluição dos mesmos. Também buscou-se promover a melhor segmentação dos compostos, pois um número menor de compostos em um segmento proporciona um aumento da sensibilidade, da detecção do mesmo e consequentemente menores valores de LOD e LOQ.

3.7.2 Condições do sistema de detecção

A otimização das condições cromatográficas do espectrômetro de massas procedeu da seguinte forma: injetou-se 2 µL de soluções individuais de cada agrotóxico na concentração de 1 mg L^{-1}, seguido da seleção do modo de ionização da fonte (EI) e energia de colisão para fragmentar o íon de interesse.

Posteriormente promoveu-se a injeção de 2 µL de uma solução de concentração de 1 mg L^{-1} de cada analito individual no modo de varredura completa, operando na faixa de 50 a 550 m/z, para que se pudesse obter a identificação dos íons pertencentes a cada analito bem como o tempo de retenção de cada pesticida. Posteriormente uma solução, de todos os agrotóxicos, na concentração de 1 mg L^{-1} foi injetada no modo de monitoramento SIM a fim de avaliar informações dos íons selecionados, a sua intensidade e a energia de colisão (esta variando de 5 a 40 eV) para encontrar a melhor condição de detecção para cada composto.

Após otimizar os parâmetros acima, avaliou-se as transições a serem utilizadas para a quantificação e a confirmação dos analitos estudados, através do modo SRM. Com isso, a transição de maior intensidade é utilizada na quantificação e a segunda transição mais intensa como de confirmação. Em todos os compostos analisados em GC-MS/MS, o modo de ionização utilizado foi a ionização por elétrons (EI).

Posteriormente montou-se a tabela de compostos do método com os tempos de retenção, as transições de cada analito, a faixa de integração e a divisão da análise em segmentos para todos os compostos a serem analisados. Após injetou-

se, novamente, 2 µL de uma mistura de 1 mg L^{-1} de todos os analitos destinados a detecção por GC-MS/MS no modo MS/MS para se verificar a separação cromatográfica dos mesmos. Ajustes finais na voltagem da eletromultiplicadora aplicada em cada segmento e nos pontos de leitura foram realizados a fim de promover uma maior sensibilidade e detecção de cada analito.

3.8 Planejamento fatorial experimental

O planejamento fatorial tem como objetivo ajudar a identificar as variáveis que apresentam maior influência dentro de um sistema e assim definir as condições ideais. Sua importância para este trabalho deve ser destacada, pois o mesmo permitiu identificar as partes críticas do método de extração ajudando assim, a definir as condições ideais para cada etapa. Neste trabalho, em um primeiro planejamento, as variáveis estudadas foram: tempo de agitação (30 e 60 min); tipo de sorvente (50 mg de C18 ou 150 mg de PSA por mL de extrato utilizado na etapa de limpeza); tempo de resfriamento (6 e 12 h) e a faixa de temperatura a ser utilizada no resfriamento (-10 a -20 ºC e -20 a -30 ºC), conforme pode ser visualizado na Tabela 10. Este planejamento foi realizado em duplicata com duas fortificações e um padrão na matriz de mesmo nível. O número de compostos recuperados na faixa de 70 a 120% foram substituídos nas colunas R_1 e R_2 e com isso calculou-se a média dos resultados representado pela coluna R média.

Tabela 10 - Condições experimentais do planejamento 24 com o número de compostos recuperados na faixa de 70 a 120% em cada teste e a média de recuperação.

Fatores		(-)	(+)	
1	Tempo de agitação (min)	15	60	
2	Tipo de sorvente	1	2	1 = C18 e 2 = PSA
3	Tempo de resfriamento (h)	6	12	
4	Temperatura (ºC)	1	2	1 = faixa -10 a -20 ºC 2 = faixa -20 a -30 ºC

Resposta:	**Rendimento (%)**						
Ensaio	**1**	**2**	**3**	**4**	**R_1**	**R_2**	**R Média**
1	-	-	-	-	8	10	9
2	+	-	-	-	6	7	7
3	-	+	-	-	9	8	9
4	+	+	-	-	8	7	8
5	-	-	+	-	7	9	8
6	+	-	+	-	10	9	10
7	-	+	+	-	9	10	10
8	+	+	+	-	10	9	10
9	-	-	-	+	10	9	10
10	+	-	-	+	10	11	11
11	-	+	-	+	7	6	7
12	+	+	-	+	6	3	5
13	-	-	+	+	10	9	10
14	+	-	+	+	10	11	11
15	-	+	+	+	4	0	2
16	+	+	+	+	10	11	11

R_1: número de compostos recuperados na fortificação 1; R_2: número de compostos recuperados na fortificação 2; R Média: média das fortificações.

Finalizada a realização dos dezesseis ensaios, analisou-se as condições e interações dos fatores estudados para que pudesse identificar quais apresentariam significância no método de extração, embora esta influência fosse negativa ou positiva. Esta avaliação pode ser observada na Figura 14, que utiliza a média das recuperações obtidas em cada ensaio, apresentadas na Tabela 10, para construir esta relação.

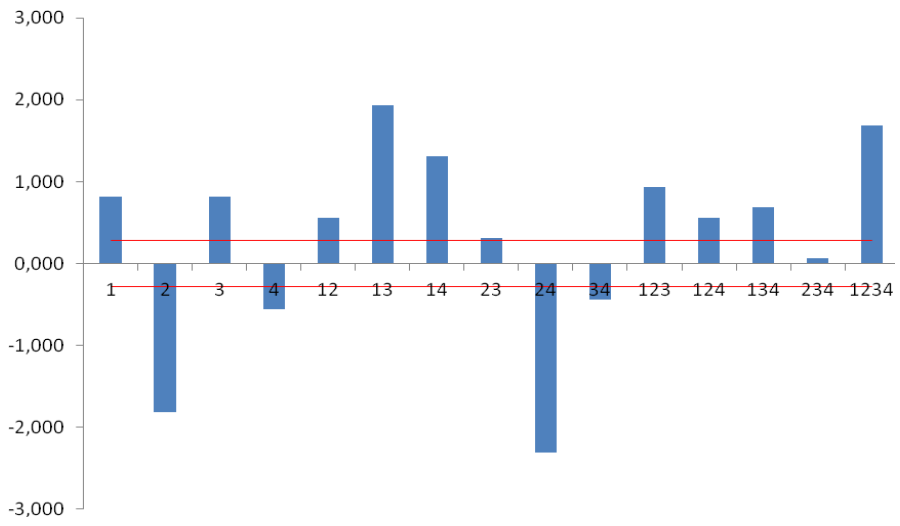


Figura 14 - Gráfico das interações avaliadas no planejamento 2^4.

As barras demonstradas no gráfico acima representam os efeitos (y) causados por um fator ou pela interação de dois ou mais fatores (x). A linha vermelha representa a faixa de erro do planejamento. Portanto, se a coluna estiver entre a linha vermelha e o eixo x, o efeito não é considerado significativo, pois está na faixa de erro. Porém, se ultrapassar a mesma tanto para cima quanto para baixo, a interação ou o fator apresenta efeito significativo positivo ou negativo na recuperação dos compostos. Em um planejamento fatorial como este o que se busca são as condições mais favoráveis para a recuperação dos analitos.

A partir do gráfico da Figura 14, analisou-se os efeitos de cada interação apresentada, onde incialmente observa-se que os fatores 1 (tempo de agitação de 1 h) e 3 (12 h de resfriamento) individuais assim como, a interação entre eles tem efeito positivo significativo no sistema, ou seja, ao se utilizar o tempo de agitação de 1 hora tem-se a melhora no sistema de extração dos compostos. Isso também pode ser observado ao se utilizar o tempo de 12 horas de resfiamento. A interação destes dois fatores tem uma melhora ainda mais significativa no procedimento de extração, ou seja, aumenta o número de compostos recuperados ao se utilizar estas condições.

Já os fatores 2 e 4 individuais bem como a interação entre eles, tem efeito negativo significativo. Portanto, ao utilizar PSA como sorvente na faixa de temperatura de -20 a -30 ºC, um efeito negativo maior acontece no sistema. Em outras palavras, efeitos negativos tendem a diminuir o número de compostos a

serem recuperados durante o procedimento de extração, o que não é desejado. A partir destes dois fatores pode-se concluir que o uso de PSA na faixa de -20 a -30 ºC não é conveniente para o método de extração, pois observa-se um efeito ainda mais negativo o que tende a reduzir no número de compostos a serem recuperados ao se adotar estas condições.

Analisando-se as interações com três e quatro fatores observa-se que os efeitos das interações foram positivos, com exceção da interação 234 que não teve efeito significativo. Uma avaliação mais segura pode ser observada quando avalia-se cada fator individual ou no máximo com apenas uma interação.

Após avaliar os resultados apresentados na Figura 14 definiu-se as condições que foram adotadas: tempo de agitação de 1 h, tempo de resfriamento de 12 h e faixa de temperatura de -10 a -20 ºC. Isso foi concluído através dos efeitos obtidos para cada fator, bem como a interação entre eles, onde levou-se em consideração os efeitos positivos que tendem a aumentar o número de compostos recuperados. Porém, para a etapa de limpeza optou-se por realizar um planejamento estrela a fim de obter uma condição ótima com uma quantidade maior de compostos recuperados na faixa desejada.

No planejamento estrela, otimizou-se as quantidades dos sorventes PSA e C18 a serem utilizadas por mL de extrato. Um total de onze testes foram realizados, sendo um ponto central foi repetido três vezes. As quantidades de cada sorvente podem ser visualizadas na Tabela 11. Todos os ensaios contaram com a extração de uma fortificação no nível 100 µg kg^{-1} e um branco para cada teste, com exceção do planejamento fatorial que contou com duplicatas nas fortificações e o resultado se fundamentou na média de compostos recuperados na faixa de 70 a 120%.

Tabela 11 - Número de ensaios e quantidades de cada sorvente utilizados no planejamento estrela ou de ponto central.

Ensaio	mg C18	mg PSA
1	26	26
2	150	26
3	26	150
4	150	150
5	88	88
6	88	88
7	88	88
8	0	88
9	88	176
10	176	88
11	88	0

Com este planejamento obteve-se um quadro que pode ser visualizado na Figura 19 do item 4.2.2, onde a modelagem quadrática relaciona o percentual de compostos recuperados com a quantidade de cada adsorvente utilizada em cada ensaio do planejamento estrela.

3.9 Otimização do método para determinação de agrotóxicos em milho

Inicialmente se estabeleceu a quantidade de matriz a ser utilizada, baseando-se no trabalho de Cunha, Fernandes (2011) e Mastovska *et al.* (2010). Outros testes com diferentes quantidades de água, de solvente extrator (acetonitrila) foram avaliados, como mostra a Tabela 11, a fim de determinar qual a melhor proporção a ser utilizada. Para melhorar o processo de extração adotou-se o uso da mesa agitadora para promover esta hidratação/extração ao mesmo tempo. O uso da técnica de precipitação a baixa temperatura (PBT) foi adotado com base em trabalhos publicados por Pinho *et al.* (2010), e Marthe *et al.* (2010) em uma faixa de temperatura entre -20 e -30 ºC por 12 horas. Inicialmente foram realizados os testes apresentados na Tabela 12, onde para cada teste avaliou-se as quantidades de 4 e 6 g de sulfato de magnésio anidro, com exceção do teste 3 que somente utilizou 4 g de sulfato de magnésio.

Tabela 12 - Testes iniciais para determinação do melhor procedimento de extração e limpeza.

Teste	Extração	Extração	Limpeza
1	2,5 g amostra + 10 mL de água purificada + 20 mL de MeCN Agitação de 15 min a 200 rpm 4 g $MgSO_4$ + 1 g NaCl Agita 1 min. cetrifuga a 3400 rpm/ 8min a 10 ºC 4 mL de extrato são transferidos para precipitação entre -10 e -20 ºC	2,5 g amostra + 10 mL de água purificada + 20 mL de MeCN Agitação de 15 min a 200 rpm 6 g $MgSO_4$ + 1 g NaCl Agita 1 min. cetrifuga a 3400 rpm/ 8min a 10 ºC 4 mL de extrato são transferidos para precipitação entre -10 e -20 ºC	Para 1 mL de extrato: 150 mg de $MgSO_4$ 300 mg de C18 150 mg de PSA
2	2,5 g amostra + 7,5 mL de água purificada + 15 mL de MeCN Agitação de 15 min a 200 rpm 4 g $MgSO_4$ + 1 g NaCl Agita 1 min. cetrifuga a 3400 rpm/ 8min a 10 ºC 4 mL de extrato são transferidos para precipitação entre -10 e -20 ºC	2,5 g amostra + 7,5 mL de água purificada + 15 mL de MeCN Agitação de 15 min a 200 rpm 6 g $MgSO_4$ + 1 g NaCl Agita 1 min./cetrifuga a 3400 rpm/ 8min a 10 ºC 4 mL de extrato são transferidos para precipitação entre -10 e -20 ºC	Para 1 mL de extrato: 150 mg de $MgSO_4$ 300 mg de C18 150 mg de PSA
3	2,5 g amostra + 5 mL de água purificada + 10 mL de MeCN Agitação de 15 min a 200 rpm 4 g $MgSO_4$ + 1 g NaCl Agita 1 min. cetrifuga a 3400 rpm/ 8min a 10 ºC 4 mL de extrato são transferidos para precipitação entre -10 e -20 ºC	-	Para 1 mL de extrato: 150 mg de $MgSO_4$ 300 mg de C18 150 mg de PSA
4	2,5 g amostra + 10 mL de água purificada + 10 mL de MeCN Agitação de 15 min a 200 rpm 4 g $MgSO_4$ + 1 g NaCl Agita 1 min. cetrifuga a 3400 rpm/ 8min a 10 ºC 4 mL de extrato são transferidos para precipitação entre -10 e -20 ºC	2,5 g amostra + 10 mL de água purificada + 10 mL de MeCN Agitação de 15 min a 200 rpm 6 g $MgSO_4$ + 1 g NaCl Agita 1 min. cetrifuga a 3400 rpm/ 8min a 10 ºC 4 mL de extrato são transferidos para precipitação entre -10 e -20 ºC	Para 1 mL de extrato: 150 mg de $MgSO_4$ 50 mg de C18 150 mg de PSA

Definido a melhor limpeza seguiu-se para o planejamento fatorial 2^4, onde se definiu as variáveis que poderiam ter influência no método de extração e de determinação dos resíduos de agrotóxicos estudados. Para este planejamento avaliou-se as variáveis descritas no item 3.8, Tabela 10. Um segundo planejamento com repetição do ponto central foi realizado, a fim de avaliar a melhor limpeza para o método utilizado, que está descrito no item 3.8, Tabela 11.

A etapa de limpeza teve como objetivo avaliar a condição que pudesse promover a diminuição do sinal dos interferentes presentes na amostra. Estes ensaios foram realizados no sistema GC-MS/MS e a avaliação do melhor resultado foi efetuada observando-se a injeção do extrato branco de cada ensaio no modo de varredura total para avaliar a intensidade dos interferentes.

3.10 Validação do método para determinação de resíduos de agrotóxicos em milho

Após definir a melhor condição cromatográfica de separação dos compostos desejados e a otimização mais adequada para o método QuEChERS original, realizou-se a validação do método proposto para os seguintes parâmetros: seletividade, curva analítica e faixa de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão (recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e efeito matriz.

3.10.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada através da comparação da injeção de extratos da matriz "branco" e matriz fortificada no sistema GC-MS/MS. Este procedimento tem como objetivo avaliar a ocorrência de coeluição entre os compostos de interesse e os interferentes da matriz.

3.10.2 Curva analítica e faixa de trabalho

A curva analítica foi avaliada a partir das soluções preparadas conforme o item 3.5 nas concentrações 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 µg L^{-1}. As curvas foram preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz de milho obtido com o método proposto. As curvas na matriz e no solvente foram injetadas quatro vezes e os dados da regressão linear foram obtidos com o auxilio do programa Microsoft Excel®.

Após a injeção das mesmas foi calculado a média das áreas, o RSD (%), o coeficiente de determinação (r^2) e a faixa de linearidade, através da regressão linear, para cada composto analisado por GC-MS/MS. As curvas analíticas foram obtidas através do programa Microsoft Excel®.

3.10.3 LOD e LOQ do instrumento e do método

Para avaliação do LOQ e LOD, segundo Ribani *et al.* (2004), o LOQ corresponde a concentração do analito que produz uma relação sinal ruído maior que 10, ou seja, LOQ = 10S/R. Já o LOD corresponde a concentração do analito que tem uma relação sinal ruído de 3, ou seja, LOD = 3S/R. Esta relação sinal ruído foi obtida através de software MS *Workstation* 6.4 do equipamento.

Os valores de LOQ_i e LOD_i foram expressos em µg L^{-1} e o LOQ_m e o LOD_m foram expressos em µg kg^{-1}. O LOQ_m foi adotado como o menor nível de fortificação que apresentou recuperações entre 70 e 120%, com RSD < 20% (SANCO, 2011).

3.10.4 Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão

Para avaliar a exatidão do método foi realizado ensaios de fortificação em três níveis para avaliar a recuperação dos analitos. Os níveis avaliados foram: 40, 100 e 200 µg kg^{-1} para GC-MS/MS. Para cada nível de fortificação foi feito sete replicatas reais (n=7), totalizando 21 análises.

A exatidão foi calculada de acordo com a equação presente no item 2.6.4, sendo o seu resultado expresso em percentagem de recuperação (INMETRO, 2011). Os resultados obtidos devem estar em uma margem de 70 a 120% de recuperação e ter um RSD menor ou igual a 20% para serem aceitos como satisfatórios, segundo SANCO, (2011).

O ensaio de extração das amostras fortificadas foi realizado a partir da utilização de amostra branco, ou seja, amostra sem a presença dos compostos a serem determinados. Primeiramente pesou-se 2,5 g da amostra "branco", previamente processada, em tubos de polipropileno com tampa rosqueada de capacidade de 50 mL. Em seguida realizou-se a fortificação nos níveis 40; 100 e 200 µg kg^{-1}. Foi adotado um tempo de contato de uma hora entre os analitos e a amostra branco. Após realizou-se a hidratação com 10 mL de água purificada e agitou-se vigorosamente por 1 min em vórtex. Posteriormente adicionou-se 10 mL de acetonitrila e levou-se a amostra para agitação em mesa agitadora a 200 rpm durante 1 hora. Em seguida adicionaram-se os sais nas seguintes quantidades: 6 g de sulfato de magnésio anidro e 1 g de cloreto de sódio. Agitou-se novamente por mais 1 min, porém manualmente. E após realizou-se a etapa de centrifugação a 3400 rpm durante 8 min a uma temperatura de 10 ºC.

Em seguida retirou-se uma alíquota de 4 mL de extrato e transferiu-se para um tudo de polipropileno de capacidade de 15 mL. Este foi submetido a resfriamento de 12 horas a uma temperatura entre - 10 e -20 ºC. Decorrido este tempo procedeu-se a etapa de limpeza dispersiva do extrato, onde transferiu-se 1 mL de extrato para um outro tubo de polipropileno, com capacidade de 15 mL, contendo 150 mg de sulfato de magnésio anidro, 50 mg de PSA e 50 mg de C_{18}, sendo novamente agitados durante 1 min em vórtex e após centrifugados a 3400 rpm durante 8 min. Logo após, procedeu-se a filtração do extrato com filtros de 0,22 µm e transferiu-se o extrato para o *vial* de capacidade de 2 mL. A seringa utilizada para filtrar os extratos foi submetida a uma lavagem de três vezes com hexano, seguida de mais três vezes com acetona. Do extrato obtido retirou-se uma alíquota de 150 µL e transferiu-se para um vial contendo *insert* e adicionou-se 10 µL de padrão interno em para a análise por GC-MS/MS.

3.10.5 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

A precisão foi calculada através do cálculo do RSD, expresso pela Equação 5:

$$RSD\,(\%) = \frac{s}{Xm} \times 100 \qquad \text{Equação 5}$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

$s = \{\sum(Xi - X_m)^2/N\text{-}1\}^{1/2}$;

Xm= média das medidas em replicatas;

n = número de medidas.

A precisão do instrumento foi estudada injetando-se, no sistema GC-MS/MS, três vezes cada nível de concentração da solução preparada no extrato da matriz.

Para avaliar a precisão do método, através do RSD_r, injetou-se uma vez cada uma das sete amostras de cada nível fortificado. Para a precisão intermediária (RSD_{pi}) do método avaliou-se as respostas das fortificações no nível de 100 µg kg^{-1} em diferentes dias.

3.10.6 Avaliação do efeito matriz

A avaliação do efeito matriz dos extratos obtidos realizou-se através da comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas em acetonitrila e das soluções preparadas no extrato da matriz milho. O cálculo foi efetuado através da Equação 6 (PIZZUTTI *et al.* 2009).

$$EfeitoMatriz(\%) = \frac{X_1 - X_2}{X_2}\, x\, 100 \qquad \text{Equação 6}$$

Onde:

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

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

Como já mencionado, a variação de -20 a 20% não é considerada efeito matriz considerável (FERRER *et al*., 2011). Estes limites foram adotados neste estudo.

3.11 Aplicação do método

O método desenvolvido e validado foi aplicado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em grãos de milho e em amostras comerciais de farinha de milho que foram adquiridos de mercados e agropecuárias da região de Santa Maria no Rio Grande do Sul em 2013.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Otimização do sistema GC-MS/MS para a determinação de resíduos de agrotóxicos em milho

Neste estudo foi utilizada a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em série com coluna CP-Sil 8 CB LOW BLEED/MS (30 m x 0,25 mm de d.i. e 0,25 µm) e as condições do sistema GC-MS/MS na determinação de agrotóxicos em grão de milho foram baseadas nas condições adotadas por DONATO (2012) sendo apresentadas abaixo:

- Vazão do gás de arraste (Hélio) constante em 1,2 mL min^{-1};
- Volume de injeção de 2 µL no modo *splitless*;
- Temperatura do injetor: 280 ºC;
- Programação da temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 45 ºC (1,0 min), com incremento de temperatura de 30 ºC min^{-1} até 280 ºC (4,17 min), em seguida um incremento de 20 ºC até 300 ºC;
- Tempo total de corrida de 17 min.

Para o espectrômetro de massas no modo de ionização EI:

- Temperatura da fonte de ionização: 210 ºC;
- Temperatura da linha de transferência: 250 ºC;
- Modo de aquisição MS/MS: SRM
- Pressão de Argônio na cela de colisão (CID): 2 mTorr.

As condições de análise para cada analito estão representadas na Tabela 13. Para cada agrotóxico estudado, adotou-se duas transições características, sendo uma destinada para a quantificação, geralmente a mais intensa, e a outra para a confirmação dos mesmos.

Tabela 13 - Condições empregadas para a análise de cada composto, no sistema cromatográfico GC-MS/MS, com informações sobre: segmentação, tempo de retenção, analito, íon precursor, íon produto e energia de colisão para cada transição monitorada.

			1ª Transição Quantificação			**2ª Transição Confirmação**	
seg	t_r(min)	Composto	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (ev)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (ev)
1	7,13	Trifluralina deuterada- (PC)	315	267	8	209	10
	7,14	Trifluralina	306	264	10	206	15
2	7,66	Quintozeno	295	237	10	265	10
3	8,08	Alaclor	188	130	40	160	10
	8,18	Pirimifós metílico	290	151	15	180	10
	8,26	Fenitrotiona	277	109	25	260	10
	8,27	Malationa	173	99	15	127	10
	8,35	Clorpirifós etílico	314	258	15	286	15
4	9,47	Trifloxistrobina	222	162	10	190	5
	9,87	Trifenilfosfato-(PI)	325	169	18	226	18
	10,08	Bifentrina	181	165	20	166	10
	10,62	Tetradifona	229	201	15	199	15
5	13,87	Esfenvalerato	225	91	25	147	10
	14,56	Deltametrina	253	174	10	172	5

Seg: segmento; t_r: tempo de retenção

A Figura 15 A apresenta um cromatograma da solução analítica no solvente com todos os compostos estudados. Observa-se a presença da permetrina,

cipermetrina e da ciflutrina nos tempos de 11 a 13 min, que mesmo não sendo estudadas foram mantidas na solução analítica.

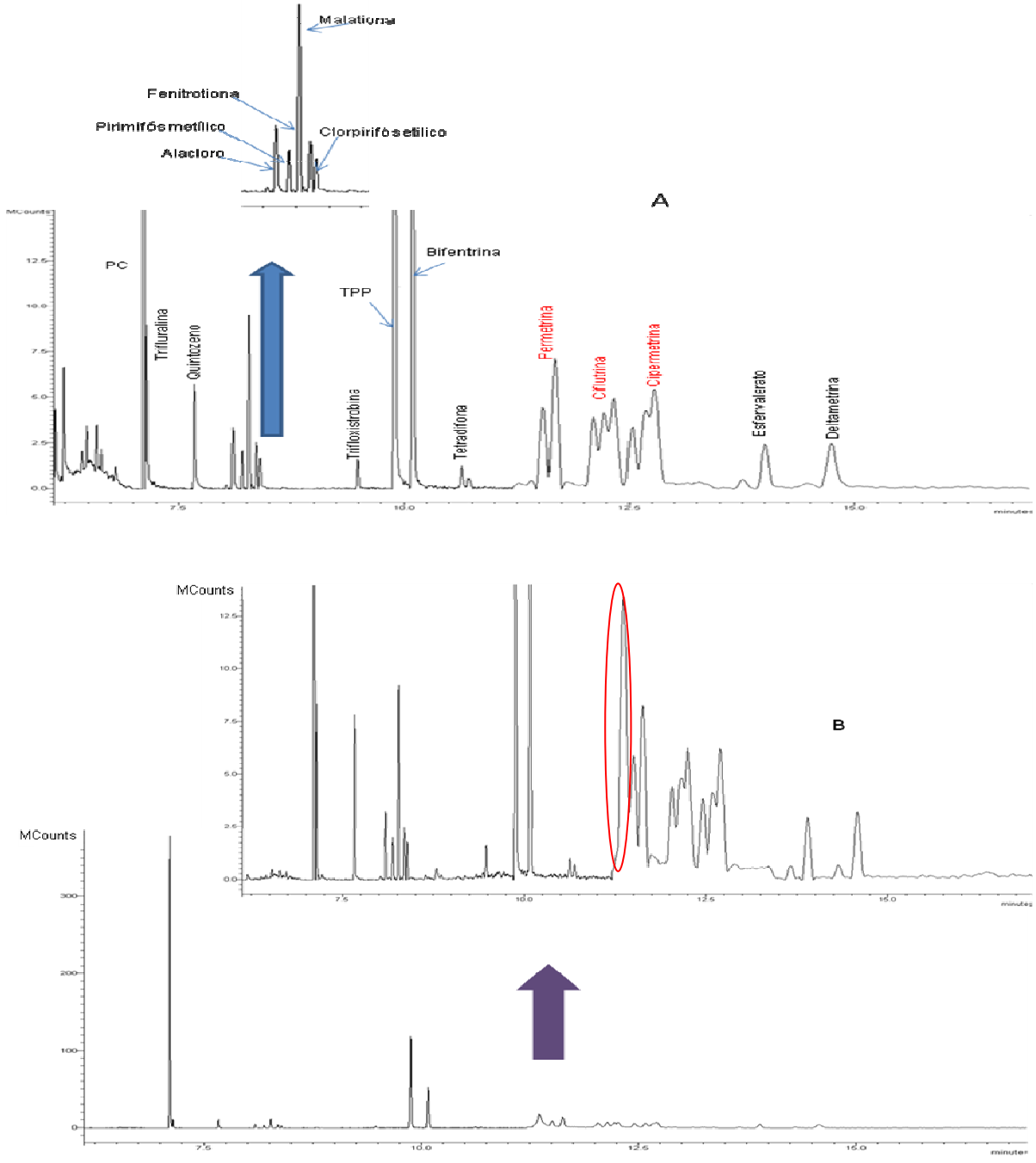


Figura 15 - Cromatogramas de íons totais (TIC) por GC-MS/MS para as soluções analíticas contendo os 12 agrotóxicos (25 µg L^{-1} cada) preparadas: (A) no solvente e (B) no extrato da matriz.

Na Figura 15 A observa-se a presença da permetrina, da cipermetrina e da ciflutrina que inicialmente seriam estudados, porém observa-se que além destes agrotóxicos há presença de um interferente da matriz (Figura 15 B), destacado em circulo, que não foi removido durante a etapa de limpeza. Além disso, este interferente apresentou como transição de identificação o íon 91,0 que também estava selecionado como uma das transições para estes três agrotóxicos, sendo assim, nenhum composto foi determinado neste intervalo de tempo, embora estivesse utilizando o modo SRM, este fato impossibilitou a quantificação com clareza destes compostos. Para os demais compostos estudados observou-se que os mesmos não sofreram interferência da matriz e que puderam ser identificados e quantificados com segurança.

4.2 Otimização do método QuEChERS para análise de agrotóxicos em milho

O método de extração QuEChERS otimizado neste trabalho foi baseado no trabalho de Mastovska *et al.* (2010) para a determinação de resíduos de agrotóxicos em grãos de milho com determinação por GC-MS/MS.

Neste estudo utilizou-se o método QuEChERS original otimizado para a determinação dos agrotóxicos desejados. Os testes iniciais que foram avaliados encontram-se na Tabela 12 do item 3.9. A partir destes definiu-se que o teste que utilizava 10 mL de acetonitrila e 10 mL de água purificada seria o melhor método de extração, como também foi adotado por Mastovska *et al.* (2010). A adição de água é efetuada a matriz milho ter um baixo percentual de água. A mesma é adicionada com a finalidade de tornar mais acessível a extração dos compostos pelo solvente (WALORCZYK; DROŻDŻYŃSKI, 2012). A acetonitrila foi utilizada como solvente extrator, pois apresenta as vantagens de ser miscível com água e de proporcionar a extração da matriz em apenas uma única fase, além disso, a mesma não necessita da adição de solventes apolares, mas somente da adição de sais para promover a separação (PRESTES *et al.*, 2009) e por apresentar uma boa compatibilidade tanto com GC como LC (PAYÁ *et al.*, 2007). Outras vantagens do uso da acetonitrila é a possibilidade de extração de uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades e a menor quantidade de compostos lipofílicos extraídos da matriz,

como pigmentos, gorduras, etc (PRESTES *et al.*, 2009). Além do mais, uma extração eficiente depende do solvente orgânico utilizado, da natureza da amostra e das propriedades químicas dos resíduos de agrotóxicos (CUNHA; FERNANDES, 2011).

Durante a etapa de extração da amostra inicialmente trabalhou-se com o tempo de hidratação/extração de 15 min, porém avaliando os trabalhos publicados na literatura optou-se estudar o tempo de 15 min e 1 h para os testes do planejamento. O planejamento experimental 2^4 apresentou o tempo de 1 h como mais eficaz na extração da matriz e proporcionar mais compostos recuperados. Além disso, Mastovska *et al.* (2010) adicionaram a acetonitrila juntamente com a água para que se pudesse prevenir a degradação enzimática da malationa e de alguns outros pesticidas susceptíveis durante o processo de hidratação da matriz. Entre as etapas de adição da água e da acetonitrila aplicou-se o tempo de agitação de 1 min e após introduziu-se a acetonitrila o que não mostrou diferença para a malationa, pois bons resultados de recuperação foram obtidos na validação da mesma.

Ainda na Figura 14 observa-se a partir das interações, o tempo de limpeza do extrato a baixa temperatura tem apresentado resultados significativos para o tempo de 12 horas a uma temperatura mais alta na faixa de -10 a -20 ºC.

Quanto a etapa de partição com sais, o teste contendo 6 g de sulfato de magnésio anidro e 1 g de cloreto de sódio foi definido como ideal, pois a quantidade de água residual foi menor, onde os extratos não congelaram. A adição de uma maior quantidade de sal neste método pode ser justificada de acordo com Prestes *et al.* (2009) que comenta que “a adição de sal tende a diminuir a solubilidade dos compostos na fase aquosa, assim como a quantidade de água presente na fase orgânica”, promovendo a migração dos analitos para a fase orgânica (acetonitrila) favorecendo o procedimento de extração através da separação das fases. Deve-se ressaltar que na etapa de partição com sais ocorre uma reação exotérmica, onde uma temperatura de 40 a 45 ºC é atingida favorecendo a extração principalmente de compostos apolares (PRESTES *et al.*, 2009, ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

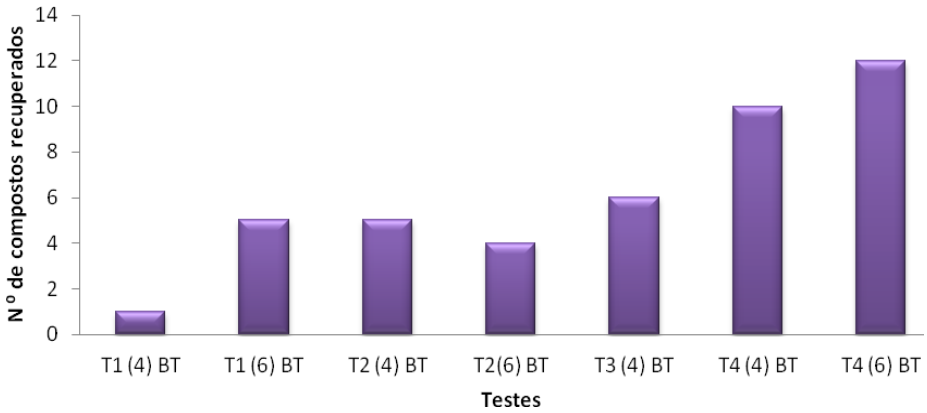
A fim de melhorar o procedimento de limpeza do extrato adotou-se a técnica de precipitação a baixa temperatura (PBT), proposta por Pinho *et al.* (2010) e Marthe *et al.* (2010). De acordo com Cabrera *et al*. (2012) a técnica de limpeza utilizando baixa temperatura tem como objetivo a redução de coextrativos lipídicos e um menor consumo de sorventes a serem utilizados na etapa de limpeza do extrato. Para esta

técnica estudou-se o uso de freezers com temperatura de -20 ºC. Como o laboratório não possuía freezers com temperatura programada adotou-se, nos primeiros ensaios, uma faixa de -20 a -30 ºC. Como a temperatura utilizada para esta etapa de precipitação foi considerada um fator de importância para a eficiência do método, avaliou-se o uso de temperatura na faixa de -10 a -20 ºC, como pode ser observado no planejamento fatorial 2^4 do item 3.8 na Tabela 10.

O uso de freezer na faixa de -10 a -20 ºC foi adotado, pois embora ambas as temperaturas promovam a deposição de gordura no interior do tudo, um número maior de compostos foram recuperados na temperatura de -10 a -20 ºC.

4.2.1 Testes preliminares

Os testes preliminares estão descritos no item 3.9, apresentados na Tabela 12. Realizou-se os testes utilizando 4 g sulfato de magnésio anidro e 6 g do mesmo. Todos estes testes foram efetuados testando-se o uso do resfriamento entre -20 e -30 ºC e também sem esta etapa de precipitação a baixa temperatura, ou seja, após a centrifugação procedia-se com a etapa de limpeza. Os testes foram injetados no sistema GC-MS/MS no modo SRM. O nível de fortificação avaliado foi de 100 µg kg^{-1}, com comparação a um padrão na matriz de concentração correspondente. Com isso observou-se que o melhor teste foi o teste 4 com 6 g de $MgSO_4$, pois apresentou o maior número de compostos recuperados na faixa de 70 a 120%, como pode ser observado na Figura 16.



(4) ou (6) representa a quantidade, em gramas, de sulfato de magnésio utilizada.
BT: precipitação a baixa temperatura.

Figura 16 - Número de compostos recuperados na faixa de 70 a 120% em cada teste.

Observa-se que o teste 4 utilizando 6 g (T_4(6)) de sal secante e o teste 4 com 4 g (T_4(4)) de sal e precipitação a baixa temperatura, apresentaram um bom número de compostos recuperados, porém o teste com menor quantidade de sal foi descartado e adotou-se o teste 4 contendo 6 g de $MgSO_4$ que obteve o maior número de compostos recuperados. Este resultado está relacionado com a quantidade de sal secante adicionado, pois para a matriz milho, este proporcionou uma melhor extração dos agrotóxicos ao remover ainda mais água do sistema e promover a migração dos analitos para a fase extratora, como já comentado anteriormente. Além disso, o teste 4 contendo 6 g de $MgSO_4$ utilizou as quantidades de sorventes estabelecidas por Mastovska *et al.* (2010) para a etapa de limpeza do extrato.

4.2.2 Avaliação da limpeza

Para o procedimento de limpeza outros testes foram realizados na etapa de resfriamento utilizando gelo seco com objetivo de diminuir este tempo, porém os resultados obtidos não foram satisfatórios. Testaram-se os tempos de 1 e 5 min de contato entre o tubo de polipropileno contendo o extrato e o gelo seco. Nos testes

com gelo seco os extratos congelam, provavelmente por causa da grande quantidade de água adicionada, e não se observou a precipitação dos componentes da amostra, além de ser muito rápido este processo atinge a temperatura de -50 ºC, congelando também a acetonitrila.

A avaliação da limpeza pode ser observada no planejamento estrela, descrito no item 3.8, na Tabela 11, que foi aplicado para que se pudesse determinar a melhor condição de limpeza do extrato e garantir a boa recuperação dos compostos analisados. Os resultados obtidos deste planejamento podem ser visualizados na Figura 17.

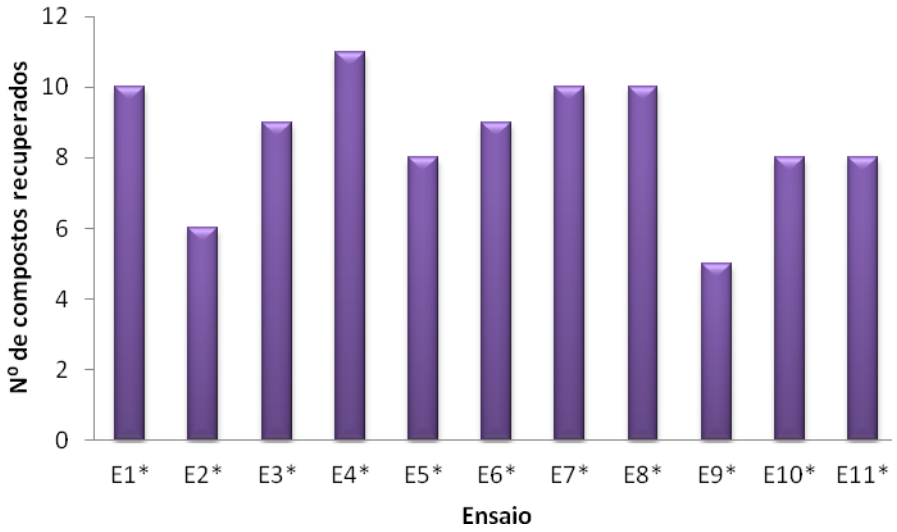


Figura 17 - Número de compostos com recuperações na faixa de 70 a 120% em cada ensaio, estudado pelo planejamento estrela.

Para alguns ensaios foi efetuada a injeção do extrato no GC-MS/MS no modo de varredura total de íon para verificar a eficiência do procedimento de limpeza realizado durante os ensaios. A Figura 18 apresenta os cromatogramas no modo de varredura total de íon de alguns ensaios realizados no planejamento estrela.

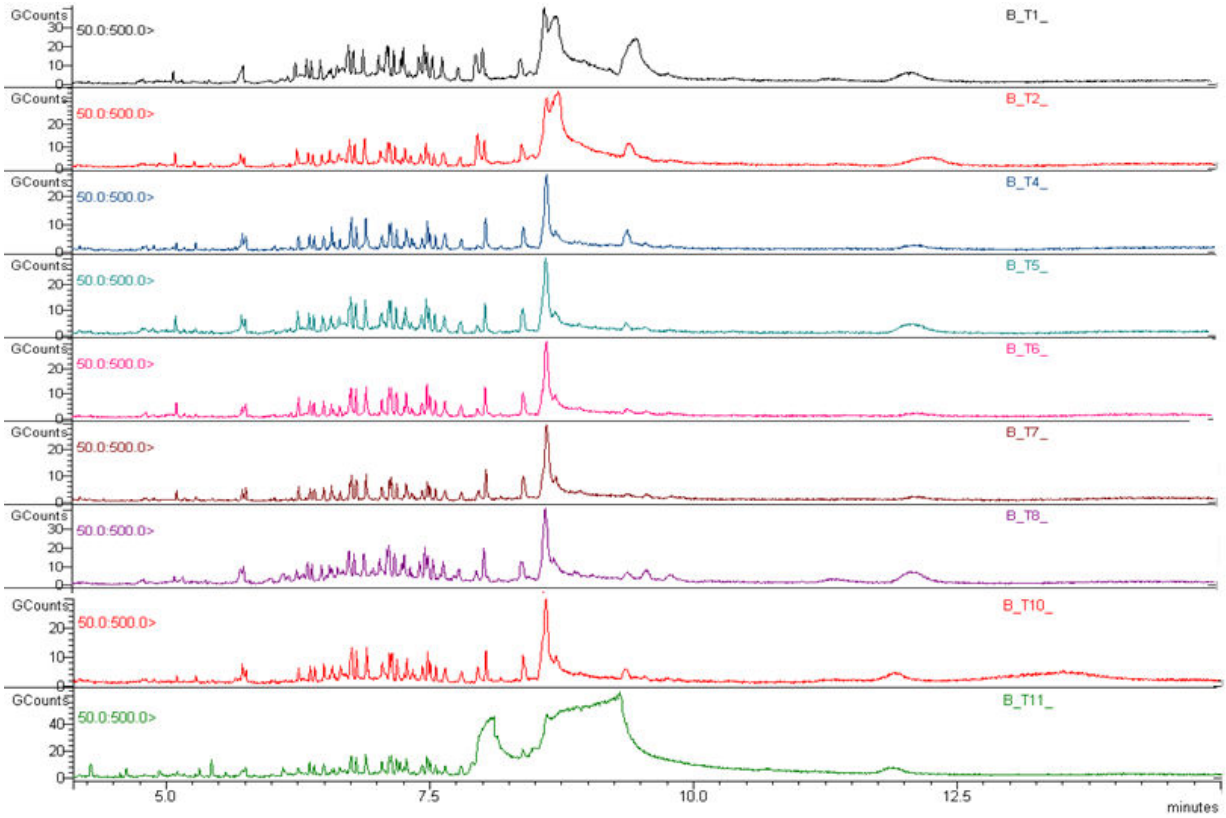


Figura 18 - Cromatogramas no modo de varredura total de íon de extratos brancos dos ensaios E^*_1, E^*_2, E^*_4, E^*_5, E^*_6, E^*_7, E^*_8, E^*_{10} e E^*_{11} realizados no planejamento estrela.

Com a injeção dos extratos “brancos” dos ensaios 1, 2 e 11, pode-se observar a não separação dos coextrativos presentes na matriz e a alta intensidade dos mesmos. Já para os demais extratos a separação foi melhor, porém não eficiente e o que pode-se observar também é a formação de caudas e picos intensos. Sendo assim, optou-se por não adotar o ensaio com maior percentual de compostos recuperados (E^*_4) e sim realizar dois novos ensaios a partir da modelagem gráfica construída com os resultados dos ensaios do planejamento estrela.

As interações estudadas no planejamento estrela podem ser observadas na modelagem gráfica, apresentada na Figura 19, que relaciona o número de compostos recuperados com as quantidades de sorvente utilizadas. Ao analisar esta relação podemos perceber que o número de compostos recuperados está diretamente relacionado com a quantidade de sorvente utilizado na limpeza, pois testes que utilizaram baixas quantidades dos dois sorventes ou de apenas um deles apresentaram um maior número de compostos recuperados.

Com isso, uma avaliação mais minuciosa foi realizada e dois novos testes foram realizados a fim de se encontrar uma condição mais ideal para os compostos analisados. Cabe ressaltar que, assim como os ensaios realizado no planejamento estrela foram pontuais, onde uma fortificação foi comparada a uma padrão na matriz com a mesma concentração, o mesmo foi realizado para os teste 5 e 6.

mg PSA x2 \ mg C18 x1	176	167	158	149	141	132	123	114	106	97	88	79	70	62	53	44	35	27	18	9	0
176	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	7
167	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
158	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
149	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
141	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
132	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
123	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
114	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
106	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	10
97	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	10	10	10
88	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	10	10	10	10
79	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	10	10	10	10	10
70	8	8	8	8	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	10	10	10	10	10
62	8	8	8	8	8	8	9	9	9	9	9	9	9	9	9	10	10	10	10	10	10
53	8	8	8	8	8	8	8	9	9	9	9	9	9	9	9	10	10	10	10	10	10
44	8	8	8	8	8	8	8	8	9	9	9	9	9	9	9	10	10	10	10	10	10
35	7	8	8	8	8	8	8	8	8	9	9	9	9	9	9	10	10	10	10	10	10
27	7	7	7	8	8	8	8	8	8	8	9	9	9	9	9	9	10	10	10	10	11
18	7	7	7	7	7	8	8	8	8	8	8	9	9	9	9	9	10	10	10	10	11
9	7	7	7	7	7	7	8	8	8	8	8	8	9	9	9	9	10	10	10	10	11
0	6	6	7	7	7	7	7	7	8	8	8	8	9	9	9	9	9	10	10	10	11

Figura 19 - Resultados do planejamento experimental com ponto central, apresentando o número de compostos recuperados.

Os novos testes foram denominados teste 5 (50 mg de C18 e 50 mg de PSA) e teste 6 (30 mg de C18 e 70 mg de PSA) e foram avaliados nos níveis de fortificação adotados na validação do método. Os resultados estão apresentados na Figura 20. O teste 5 apresentou um maior percentual de recuperação para todos os agrotóxicos nos três níveis de recuperação testados. Isso demonstra a importância do uso de C18 juntamente com PSA e $MgSO_4$ na remoção de lipídeos, pois este conjunto permite um aumentando da sensibilidade dos analitos e diminui a quantidade de compostos interferentes no extrato (CUNHA; FERNANDES, 2011). Além disso, mostrou que uma quantidade menor e proporcional de sorvente proporciona um número maior de compostos recuperados quando comparado ao ensaio E4* do planejamento estrela. Já o teste 6 não recuperou nenhum dos agrotóxicos estudados na faixa de 70 a 120% para o nível de fortificação mais baixo.

Este fato pode estar relacionado com a menor quantidade de PSA avaliada neste teste, pois na d-SPE este atua removendo componentes ácidos, pigmentos, gorduras, açucares e outros compostos lipofílicos (PAYÁ *et al.*, 2007; CUNHA; FERNANDES *et al.*, 2011).

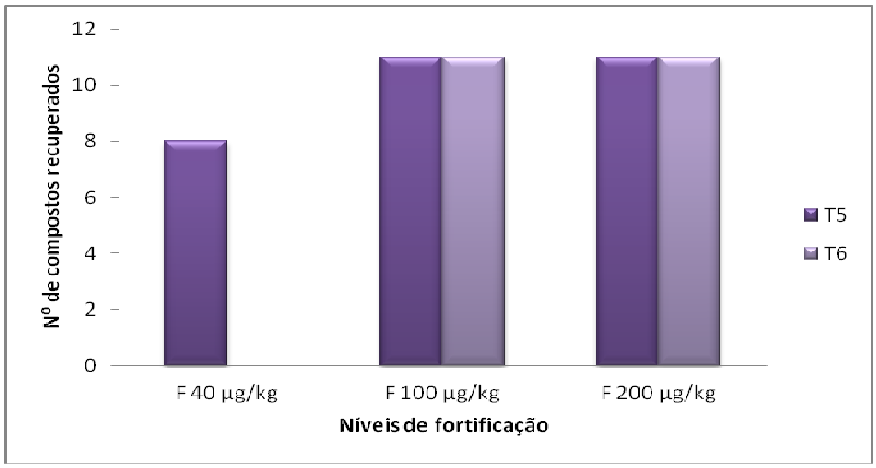


Figura 20 - Percentual de compostos recuperados entre 70 e 120% nos três níveis de fortificação avaliados.

A Figura 21 apresenta o cromatograma no modo de varredura total de íons do extrato branco da matriz do teste 5 que foi utilizado na validação do método proposto.

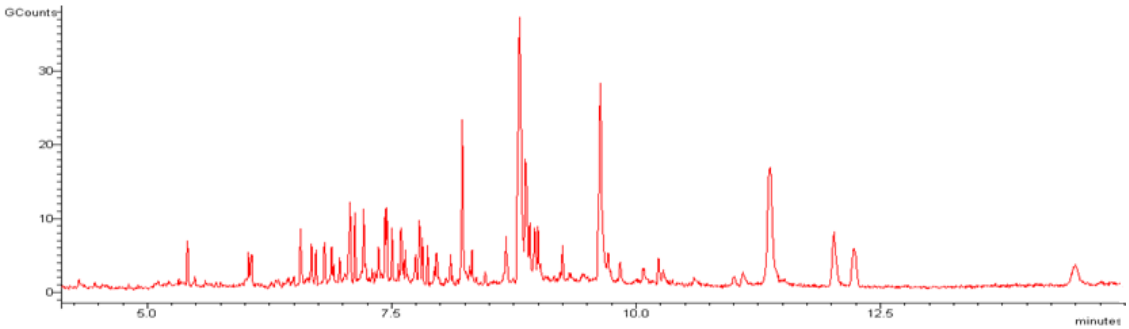


Figura 21 - Cromatograma do extrato branco da matriz do teste 5.

Ao analisar o cromatograma obtido do teste 5 e comparar com os cromatogramas da Figura 18, observa-se uma intensidade de sinal próxima entre os mesmos, porém a separação cromatográfica dos coextrativos da matriz é muito mais eficiente possibilitando uma melhor identificação destes interferentes.

Com os resultados obtidos definiu-se o melhor procedimento de limpeza do extrato, o qual foi incrementado as condições pré-definidas para o método analítico utilizado neste trabalho.

4.2.3 Planejamento fatorial

Após a realização dos dezesseis ensaios, onde todos foram realizados em duplicata e com um padrão na matriz de mesma concentração, analisou-se as condições e interações que apresentaram significância tanto negativas, quanto positivas. Esta avaliação pode ser observada através da Figura 14 do item 3.8, que utiliza a média das recuperações obtidas para construir esta relação. O número de compostos recuperados na faixa de 70 a 120% para cada ensaio deste planejamento está representado na Figura 22.

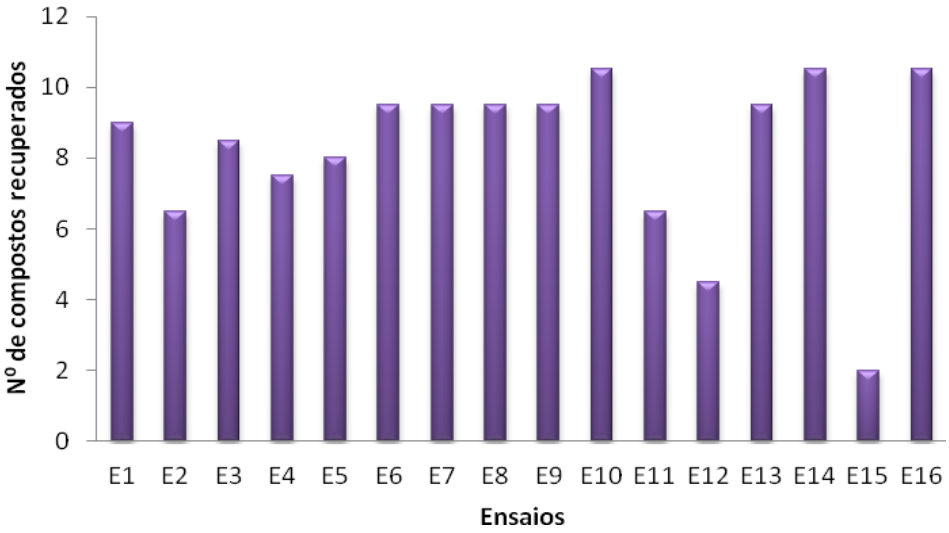


Figura 22 - Número de compostos com recuperação na faixa de 70 a 120% obtidos em cada ensaio do planejamento.

Após avaliar o resultado obtido através da Figura 14, definiu-se as condições que foram adotadas como: tempo de agitacão de 1 h, tempo de resfriamento de 12 h e faixa de temperatura de -10 a -20 ºC.

Para a etapa de limpeza optou-se por realizar um planejamento estrela descrito no item 3.8, na Tabela 11, a fim de definir uma condição ideal com uma quantidade maior de compostos recuperados. Um total de onze testes foram realizados com três pontos centrais repetidos, onde o número de agrotóxicos recuperados em cada teste pode ser visualizado na Figura 17 do item 4.2.2.

Estes planejamentos possibilitaram a determinação das condições mais próximas do ideal para a determinação dos agrotóxicos em amostras de milho. CUNICO *et al.* (2008), comenta que “o planejamento não determina valores ótimos em uma única etapa, porém índica de modo satisfatório o caminho a ser tomado para que se possa atingir o objetivo proposto”.

4.2.4 Procedimento otimizado

A partir dos testes anteriores apresentados, estabeleceu-se o procedimento de extração otimizado e após validou-se o método proposto para determinação de resíduos de agrotóxicos em milho.

O procedimento de extração otimizado está representado na Figura 23. O método envolve uma etapa de extração com água e acetonitrila, seguida de uma etapa de agitação durante 1 h e posteriormente a etapa de partição com a adição dos sais de sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio. Uma etapa de precipitação a baixa temperatura (-10 e -20 ºC) durante 12 h, seguida da limpeza por d-SPE com 150 mg de sulfato de magnésio anidro, 50 mg de PSA e 50 mg de C18. O uso de sais como o sulfato de magnésio na etapa de limpeza tem a finalidade de remover a água que possa ter sido transferida para esta etapa e com isso, facilitar a precipitação de coextrativos polares, diminuindo a polaridade do extrato final (PRESTES *et al.*, 2009).

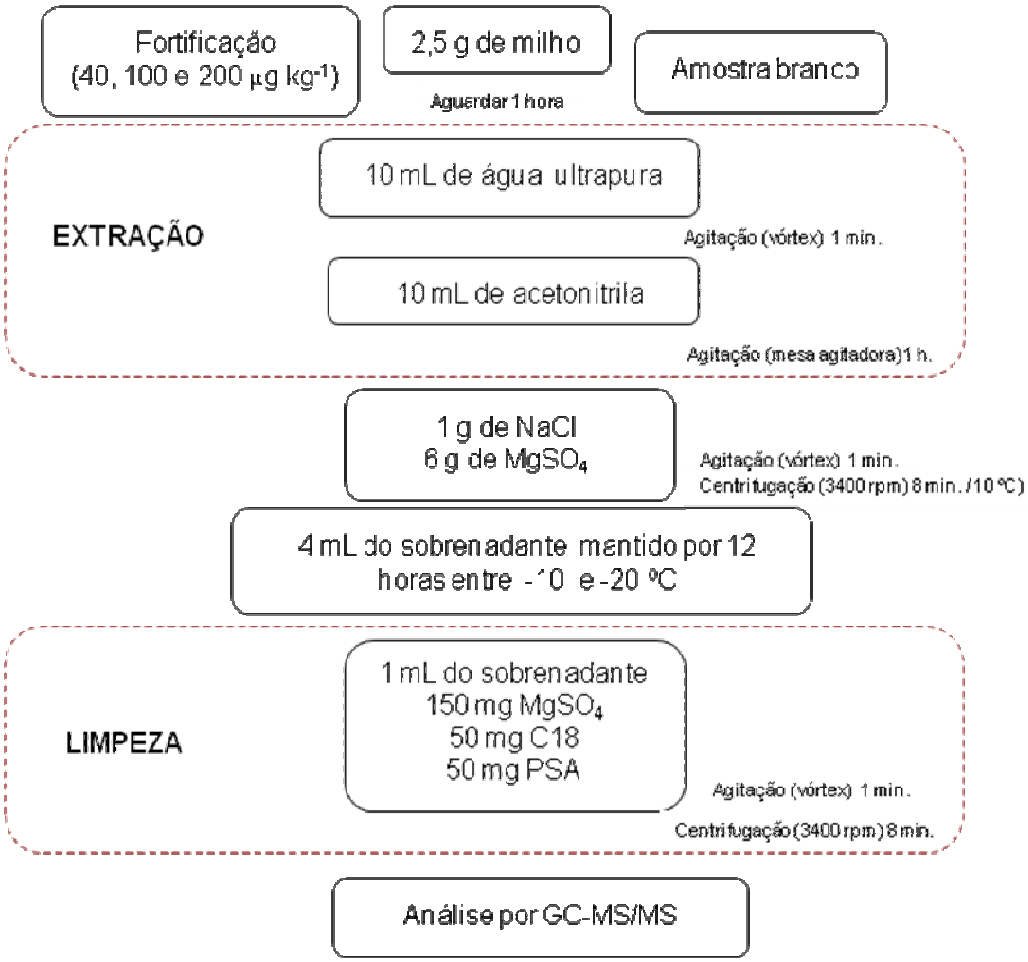


Figura 23 - Representação do método de preparo de amostra otimizado utilizado para a extração de agrotóxicos em milho.

4.3 Validação do método otimizado

Para a validação do método otimizado utilizado neste estudo, amostras branco de milho foram fortificadas nos níveis 40, 100 e 200 µg kg^{-1}.

Neste trabalho todas as soluções foram preparadas em solvente (acetonitrila) e nos extratos da matriz (milho), obtidos a partir do extrato branco da matriz extraída pelo método QuEChERS otimizado e determinação por GC-MS/MS. Com isso, foi possível avaliar o efeito matriz na determinação do LOD e LOQ do método e na

linearidade das curvas analíticas, pois o mesmo depende dos compostos estudados e da técnica cromatográfica empregada.

4.3.1 O padrão interno e o padrão de controle escolhidos

Para este trabalho selecionou-se como padrão interno, para avaliação do instrumento, o composto trifenilfosfato (TPP). Sua utilização foi efetuada pelo fato de ter sido utilizado no método QuEChERS desenvolvido por ANASTASSIADES *et al.*, (2003) e seu comportamento nas análises por GC é considerado estável.

Como padrão de controle selecionou-se a trifluralina d-14 para análise em GC-MS/MS, por ser um composto deuterado tem o mesmo comportamento que o agrotóxico trifluralina na etapa de extração e cromatográfica, e não é um composto que possa ocorrer na amostra branco ou nas amostras de milho que serão analisadas. O padrão interno foi utilizado para o controle do instrumento e o padrão de controle para identificar se houve problemas no procedimento de preparo de amostra.

4.3.2 Seletividade

A seletividade do método foi garantida pela ausência de interferentes com os mesmos íons de quantificação e identificação no tempo de retenção dos agrotóxicos estudados, conforme pode ser visualizado na Figura 24. Como na matriz não se identificou a presença de nenhum resíduo de agrotóxico acima do LOD do método, as amostras avaliadas foram utilizadas na confecção da curva analítica na matriz e nos ensaios de fortificação.

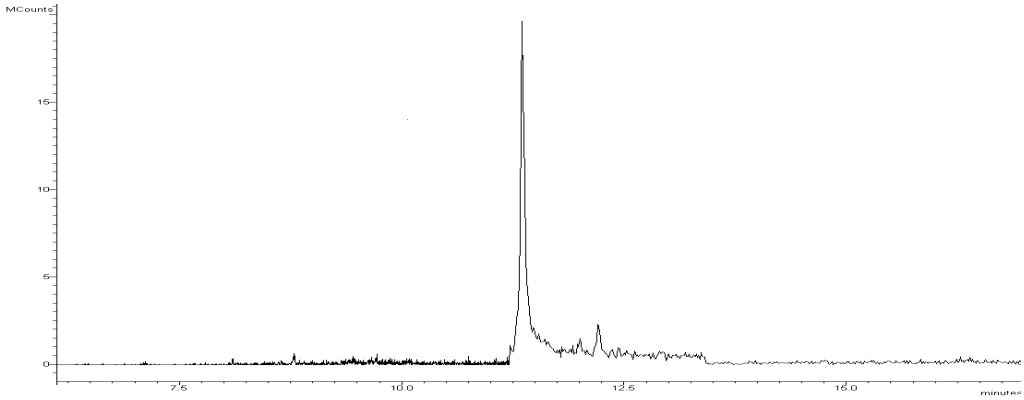


Figura 24 - Cromatograma obtido a partir da análise em GC-MS/MS (TIC) da amostra “branco” do milho.

A Figura 25 mostra o cromatograma obtido a partir da injeção da acetonitrila utilizada como solvente extrator e sua injeção foi realizada para garantir que a mesma não exerceu influência na determinação dos compostos estudados.

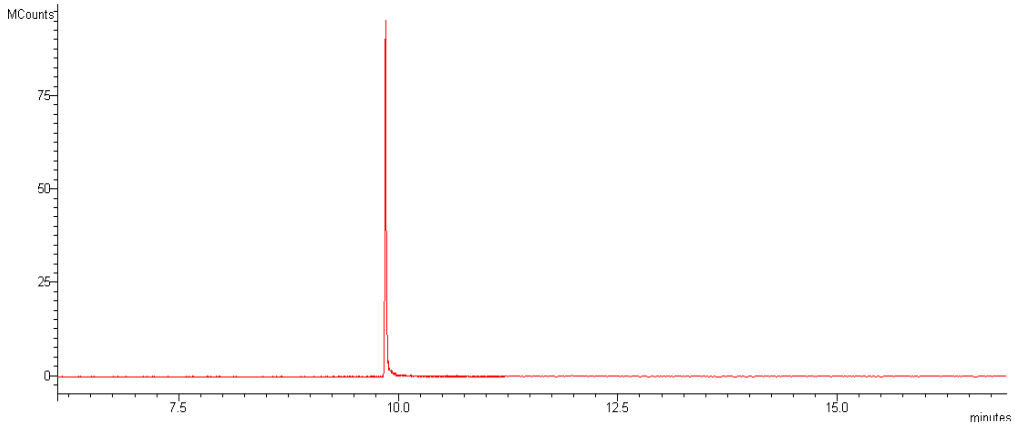


Figura 25 - Cromatograma do branco reagente (acetonitrila) com o padrão interno (TPP).

4.3.3 Curva analítica e faixa de trabalho

Nas Tabelas 14 e 15 estão apresentados os valores de coeficiente de determinação (r^2) para as equações das curvas analíticas em solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz para os agrotóxicos estudados.

Tabela 14 - Parâmetros das curvas analíticas no solvente obtidos por GC-MS/MS, a partir das soluções de 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 µg L^{-1}.

Agrotóxico	a	B	r^2	Faixa linear (µg L^{-1})
Alacloro	328300370,4	83266402,1	0,9992	5-200
Bifentrina	6017464619	24199053763	0,9935	5-200
Clorpirifós etílico	485979824,2	-302260398,5	0,9998	5-200
Deltametrina	584718530,5	1317700282	0,9988	5-200
Esfenvalerato	660925742,4	2669441820	0,9998	5-200
Fenitrotiona	176908124,1	-803989558,4	0,9994	5-200
Malationa	1707228742	-2015542840	0,9996	5-200
Pirimifós metílico	342221556,6	-437984511	0,9997	5-200
Quintozeno	201984390,7	-91889362,52	0,9989	5-200
Tetradifona	243758576,5	121311571,9	0,9997	5-200
Trifloxistrobina	166267877,3	122752746	0,9959	5-200
Trifluralina	431330879,8	-850134173,9	0,9992	5-200

a: coeficiente linear; b: coeficiente angular e r^2: coeficiente de determinação.

Tabela 15 - Parâmetros das curvas analíticas na matriz, obtidos por GC-MS/MS, a partir das soluções de 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 µg L^{-1}.

Agrotóxico	a	b	r^2	Faixa linear (µg L^{-1})
Alacloro	308297670,3	799206989,2	0,9988	5-200
Bifentrina	6267301075	12761818996	0,9992	5-200
Clorpirifós etílico	453603464,8	1810330346	0,9984	5-200
Deltametrina	682296654,7	3676300777	0,9976	5-200
Esfenvalerato	672162783,8	5938585723	0,9987	5-200
Fenitrotiona	161835812,4	828672192,4	0,9948	5-200
Malationa	1543063023	6418125747	0,9967	5-200
Pirimifós metílico	303274970,1	614015830,3	0,9921	5-200
Quintozeno	182629510,2	866109617,7	0,9938	5-200
Tetradifona	223414844,7	1090187873	0,9963	5-200
Trifloxistrobina	153259378,7	353057049	0,9978	5-200
Trifluralina	371128853	1326707885	0,9953	5-200

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o método apresenta r^2 de no mínimo 0,99 tanto para a curva analítica preparada no solvente quanto na matriz, atendendo os parâmetros da ANVISA e do INMETRO (2011). Todos os compostos apresentaram faixa linear entre 5,0-200,0 µg L^{-1}, tanto para a curva no solvente quanto da matriz.

4.3.4 LOD e do LOQ do instrumento e do método

Os valores dos limites de detecção e quantificação foram obtidos de acordo com as equações apresentadas no item 3.9.3, onde o menor ponto da curva foi adotado como valor do LOQ_i e o mesmo dividido por 3,33 resultou no LOD_i. Os valores de área foram obtidos através das injeções, que foram realizadas na curva do solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz (milho).

Os valores do LOD_i e LOQ_i foram estabelecidos tanto nas soluções preparadas no solvente, como nos extratos obtidos a partir da matriz. Os valores obtidos para o LOD_i e LOQ_i foram de 1,5 e 5,0 µg L^{-1}, respectivamente.

O LOD_m e o LOQ_m foram avaliados conforme SANCO (2011). Para os compostos alacloro, esfenvalerato, malationa, pirimifós metílico e trifloxistrobina o LOQ_m foi considerado 40 µg kg^{-1}, pois todos estes compostos tiveram recuperações na faixa de 70 a 120%, com RSD <20% e o LOD_m de 12 µg kg^{-1}. Já os compostos bifentrina, clorpirifós etílico, deltametrina, fenitritiona, quintozeno, tetradifona e trifluralina obtiveram como LOQm 100 µg kg^{-1} e LODm de 30 µg kg^{-1}, isso pode ser observado na Tabela 15.

Analisando os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método obtidos para cada composto observou-se que para a maioria dos agrotóxicos atingiu o valor de LMR estabelecido pela ANVISA, exceto para a bifentrina e a trifluralina, como está representado na Tabela 6. Portanto, os resultados são considerados satisfatórios para o método otimizado e validado, considerando a complexidade da matriz avaliada.

4.3.4 Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão do método

Os resultados das recuperações médias percentuais (n=7) e os valores de RSD% nos níveis de fortificação de 40, 100 e 200 µg kg^{-1} que foram extraídas pelo método de extração QuEChERS otimizado, estão apresentadas na Tabela 16.

Os valores de recuperação foram calculados através das curvas analíticas preparadas na matriz, obtidas conforme o método otimizado. Para este estudo seguiu-se as recomendações da SANCO (2011) que recomenda um percentual de 70 a 120% de recuperação para validação de método cromatográfico para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

Tabela 16 - Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método para determinação de agrotóxicos em milho.

Compostos	**Níveis de Fortificação (µg kg^{-1})**					
	40		**100**		**200**	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
Alaclor	94,7	17,8	114,4	16,0	99,5	16,8
Bifentrina	68,1	5,9	88,0	12,4	75,0	5,1
Clorpirifós etílico	62,4	5,9	90,1	13,7	77,5	10,6
Deltametrina	59,9	8,0	99,1	11,9	94,4	18,1
Esfenvalerato	71,3	8,8	104,0	13,2	94,0	16,7
Fenitrotiona	61,6	9,4	107,3	16,8	93,1	9,1
Malationa	74,9	9,0	106,8	12,8	97,2	9,4
Pirimifós metílico	91,9	13,8	106,1	16,9	95,9	7,0
Quintozeno	55,3	6,0	87,0	12,5	90,1	18,3
Tetradifona	61,1	7,5	92,3	15,6	75,1	6,3
Trifloxistrobina	93,9	18,0	110,1	14,1	90,2	6,4
Trifluralina	65,8	5,8	102,5	13,0	102,3	17,3

Ao analisar piretróides e organofosforados encontram-se dificuldades principalmente para os agrotóxicos deltametrina, esfenvalerato e bifentrina, pois geralmente apresentam resultados de recuperação baixos devido a adsorção de forma irreversível destes compostos na carbofrita utilizada no insersor do injetor (LEHOTAY *et al.*, 2005).

Os valores de recuperação média obtida no ensaio de precisão intermediária estão apresentados na Tabela 16 e variaram entre 73,6 e 101,4%. Estes valores são considerados adequados para a finalidade do método.

4.3.5 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

A precisão do método de determinação de resíduos de pesticidas em milho foi avaliada em função da repetitividade e da precisão intermediária, obtidas pelo RSD das recuperações. A precisão intermediária foi realizada em diferentes dias em relação ao estudo de repetitividade e os resultados da RSD_r e RSD_{pi} podem ser visualizado na Tabela 17. Para validação de método recomenda-se um RSD% menor ou igual a 20% (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2011).

Tabela 17 - Percentuais de recuperação e RSD_{pi} do método de extração de agrotóxicos em milho, na precisão intermediária.

	Nível de fortificação 100 µg kg^{-1}	
Compostos	**Rec. Média (%)**	**RSD (%)**
Trifluralina	91	5,2
Alaclor	101,4	7,1
Bifentrina	75,6	8,7
Clorpirifós etílico	89,3	10,3
Deltametrina	89,5	8,3
Esfenvalerato	79,7	6,2
Fenitrotiona	97,8	20
Malationa	96	5,9
Pirimifós metílico	78,7	13,7
Quintozeno	77,5	4,0
Tetradifona	73,6	5,5
Trifloxistrobina	98,7	11,2

Os valores para o estudo da repetitividade e precisão intermediária dos agrotóxicos determinados em milho foram menores que 20% para a maioria dos compostos avaliados.

4.3.6 Avaliação do efeito matriz em GC-MS/MS

Assim como na Cromatografia Líquida a Cromatografia Gasosa apresenta problemas com o efeito matriz nas amostras e a origem é comum: a existência de interferentes da matriz no extrato a ser analisado (SOARES; NETO, 2012). Com isso, estes interferentes podem afetar a quantificação dos compostos de interesse e também a taxa de recuperação pode não ser satisfatória (PRESTES, 2011). O efeito matriz está diretamente relacionado com a concentração do agrotóxico presente no extrato, principalmente nas concentrações mais baixas ou no caso de a relação de componentes da matriz/analito ser muito alta (PINHO *et al.*, 2009). A Tabela 18 apresenta o efeito matriz calculado para cada agrotóxico estudado neste trabalho.

Tabela 18 - Percentual de efeito matriz para os agrotóxicos analisados por GC-MS/MS em milho.

Analitos	**Efeito Matriz (%)**
Trifluralina	-14,0
Quintozeno	-9,6
Alaclor	-6,1
Pirimifós metílico	-11,4
Fenitrotiona	-8,5
Malationa	-9,6
Clorpirifós etílico	-6,7
Trifloxistrobina	-7,8
Bifentrina	4,2
Tetradifona	-8,3
Esfenvalerato	1,7
Deltametrina	16,7

Avaliando-se os resultados obtidos, conclui-se de acordo com Ferrer *et al.* (2011) que os valores percentuais de efeito matriz obtido na determinação de resíduos de agrotóxicos em milho não foram significativos, pois não exerceram variação maior que 20% para mais ou para menos. Isso mostra que o procedimento de extração e limpeza otimizado e validado neste trabalho pode ser considerado satisfatório. Porém, pode-se observar de acordo com a Tabela 18, que a maioria dos

compostos sofreu um efeito negativo no efeito matriz caracterizando uma supressão de sinal dos analitos por parte da matriz. A supressão do sinal provém do efeito matriz causado pela complexidade da amostra e da grande quantidade de co-extrativos da matriz (WALORCZYK; DROŻDŻYŃSKI, 2012). Para evitar este problema o efeito matriz deve ser constantemente avaliado principalmente na etapa de desenvolvimento do método como na aplicação do mesmo para análises de rotina (PRESTES, 2007).

Cabe ressaltar que o emprego das curvas preparadas na matriz tem por finalidade compensar este efeito.

4.4 Aplicação do método em amostras reais

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em 8 amostras de farinha de milho e 3 amostras de milho adquiridas em agropecuárias e supermercados de Santa Maria (RS). Das amostras analisadas duas apresentaram pirimifós-metílico abaixo do LOQ_m e uma apresentou uma concentração de 80 $\mu g\ kg^{-1}$, bem abaixo dos LMRs estabelecidos pela ANVISA e EU, respectivamente 10 e 5 $mg\ kg^{-1}$. As demais amostras não apresentaram resíduos dos compostos estudados.

5 CONCLUSÕES

O método QuEChERS otimizado empregando limpeza a baixa temperatura e por d-SPE seguido de análise por GC-MS/MS mostrou-se eficiente para a determinação dos agrotóxicos estudados em milho. O uso do GC-MS/MS foi adequado para a determinação dos agrotóxicos estudados, pois possibilitou uma análise quantitativa e qualitativa muito eficiente através do modo SRM, além disso, permitiu a identificação de compostos interferentes presentes na matriz.

A realização dos planejamentos fatoriais permitiu encontrar as melhores condições de extração e limpeza do extrato, além de diminuir o número de ensaios tornando o processo de otimização do método mais rápido e com menor consumo de reagentes.

O método otimizado e validado apresentou resultados de recuperação na faixa de 55,3 a 110,1%, com RDS ≤ 20%. Os valores de LOD e LOQ do instrumento foram de 1,5 e 5,0 µg L^{-1}, respectivamente. O LOQ do método, considerando os valores de recuperação entre 70 e 120% e RSD ≤ 20%, foi de 40 µg kg^{-1} para os compostos alacloro, esfenvalerato, malationa, pirimifós metílico e trifloxistrobina e para os agrotóxicos bifentrina, clorpirifós etílico, deltametrina, fenitrotiona, quintozeno, tetradifona e trifluralina foi de 100 µg kg^{-1}. A linearidade da curva analítica foi obtida entre 5,0 e 200,0 µg L^{-1}, com valores de coeficiente de determinação (r^2) > 0,99 para todos os compostos preparados no extrato da matriz.

A etapa de limpeza a baixa temperatura, seguida de d-SPE, mostrou-se adequada para a redução de gorduras, o que pode ser verificado ao longo dos ensaios e testes realizados durante a otimização do método validado. Esta etapa é considerada de fundamental importância para a realização das análises de resíduos em alimentos.

O método QuEChERS otimizado e validado apresenta como desvantagem a grande quantidade de sulfato de magnésio anidro utilizada e o tempo maior para o procedimento de limpeza do extrato, porém apresenta vantagens como a redução de coextrativos devido a menor quantidade de amostra, a eficiência da técnica de precipitação a baixa temperatura e o uso de pequenas quantidades de sorventes na etapa de limpeza, demonstrando resultados satisfatórios para os compostos estudados.

Portanto, a partir dos resultados obtidos pode-se concluir que os objetivos deste trabalho foram atingidos e que o método proposto empregando QuEChERS e GC-MS/MS para a determinação de resíduos de agrotóxicos em milho mostrou-se adequado e pode ser aplicado para análises de rotina.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Ampliação do escopo de agrotóxicos a serem analisados na matriz utilizada neste estudo;

- Verificar a eficiência do preparo de amostra proposto empregando a determinação por LC-MS/MS para outros compostos;

- Avaliar modificações no método QuEChERS, como diferentes tipos de solventes extratores, como hexano, acetona, metanol, entre outros, diferentes sorventes na etapa de limpeza do extrato para que se possa melhorar esta etapa a fim de remover uma maior quantidade de co-extrativos da matriz sem afetar a recuperação dos compostos;

- Avaliar a possibilidade de utilização de técnicas de extração e limpeza diferentes para a determinação dos analitos desejados.

7 DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS

Durante uma atividade laboratorial, resíduos líquidos e sólidos são gerados a partir dos procedimentos realizados, os quais devem ser devidamente tratados e descartados de forma correta.

Os resíduos líquidos são classificados em halogenados e não halogenados e dependendo da composição do resíduo é classificado e recolhido em recipientes devidamente identificados. Já os resíduos sólidos são descartados em um saco plástico devidamente identificado. Ambos os resíduos são encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da UFSM para posterior tratamento e descarte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGILENT TECNOLOGIES. **Conceitos, Aplicações e Novidades das técnicas de GC-MS e GC-MS/MS**, UFPEL, 29/08/12.

ALBASEER, S. S.; RAO, R. N.; SWAMY, Y. V.; MUKKANTI, K. An overview of sample preparation and extraction os synthetic pyrethroids from water, sediment and soil. **Journal of Chromatography A,** v. 1217, p. 5537-5554, 2010.

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.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.**;** ŠTAJNBAHER, 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, 2003.

ANVISA, Agrotóxicos e Toxicologia. **Monografias Autorizadas**. 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 out. 2012.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2ª. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622 p.

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

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7802/1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 jan 2002. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm >. Acesso em: 11 nov. 2012.

CABRERA, L. C.; MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Extração em fase sólida dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica** v. 4, n. 2, p 1-14, 2012.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimento. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHIREMBA, C.; ROONEY, L. W., BETA, T. Microwave-Assisted extraction of bound phenolic acids in bran and flour fractions from sorghum and maize cultivars varying in vardness. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 60, p. 4735−4742, 2012.

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

CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Multipesticide residue analysis in maize combining acetonitrila-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7748–7757, 2011.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**. Curitiba, v. 9, n. 1, ISSN 1518-5192, 2008.

DIBE, L. S. Congresso debate agrotóxicos. **CORREIO DO POVO**. Porto Alegre, n. 49, ano 118, p. 13, 18 nov. 2012.

DONATO, F. F. **Resíduos de agrotóxicos em água potável usando SPE e determinação rápida por LC-MS/MS E GC-MS/MS**. 2012. 148f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

EMBRAPA, Aspectos econômicos da produção e utilização do milho. **Circular Técnica 74**, Minas Gerais, ISSN 1679-1150, (2006b). Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/producaoutilmilho_000fghw1d5602wyiv80drauenaku42b6.pdf> Acesso em: 10 out. 2012.

EMBRAPA, Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. **Circular Técnica 75**, (2006a). Disponível em: < http://ag20.cnptia.embrapa.br/Repositorio/fisquitecnolmilho_000fghw39ut02wyiv80drauen1rteuta.pdf>, ISSN 1679-1150, Acesso em: 10 out. 2012.

EMBRAPA, FISIOLOGIA DO MILHO, **Circular técnica 22**. Minas Gerais, 2002. Disponível em: < http://alexandrecastro.com.br/Arquivos%20NOTEBOOK/Disco%20C/Downloads/Circ_22.pdf> Acesso em: 23 fev. 2013.

EMBRAPA. Milho: história e arte**.** Grão em Grão. **Jornal Eletrônico da Embrapa Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, Minas Gerais, Ano 02, ed. 07, 2008. Disponível em: http://www.cnpms.embrapa.br/grao/7_edicao/grao_em_grao_materia_03.htm. Acesso em: 16 fev. 2013.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), 2005. Disponível em: < http:// faostat.fao.org/site/379/DesktopDefault.aspx?PageID=379> Acesso em: 03 nov. 2011.

FELIPPE, G. **Grãos e sementes: a vida encapsulada**. Editora: Senac, São Paulo, 2007.

FEPAGRO E EMATER/RS-ASCAR. **Indicações Técnicas para o cultivo de Milho e Sorgo no RS, 2011**. Ijuí, RS. Disponível em: http://www.fepagro.rs.gov.br/upload/20120727094341indicacoes_tecnicas_milho_e_sorgo_2011.pdf . Acesso em: 02 out. 2012.

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

FILHO, D. R. Conheça o valor nutricional do milho, **Yoga Jornal**. Edição de outubro/novembro, 2011. Disponível em: <yogajournal.terra.com.br/show_yoga.php?id=325>. Acesso em: 10 out. 2012.

GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J. F.; MOLINA-DÍAZ, A. Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: a review, **Talanta**, v. 79, p. 109-128, 2009.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. A.; HERRERA-HERRERA, A. V.; RAVELO-PÉREZ L.; M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J. Sample-preparation methods for pesticide-residue analysis in cereals and derivates. **Trends in Analytical Chemistry**. V. 38, p. 32-51, 2012.

HARRYS, D. C., **Análise Química Quantitativa**, 8ª edição, Editora: LTC, Rio de Janeiro, 2012. 898p.

Hu J.-Y.; Zhen Z.-H.; Deng Z.-B. Simultaneous determination of acetochlor and aropisochlor residues in corn and soil by solid phase extraction and gas chromatography with electron capture detection. **Bull Environ Contam Toxicol.** v.86, p. 95–100, 2011.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZACÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Orientacões sobre validação de métodos de ensaios químicos, **DOQ-CGCRE-008**, ver.4, 2011.

JARDIN, I. C. S. F; ANDRADE, J. A.; QUEIROZ, S. C. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Química Nova***,* v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

KOESUKWIWAT, U.; LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; DORWEILER, K. J.; LEEPIPATPIBOON, N. Extension of the QuEChERS method for pesticide residues in cereals to flaxseeds, peanuts and doughs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, p. 5950-5958, 2010.

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.

LANÇAS, F. M. ,**Cromatografia Líquida Moderna:** HPLC/CLAE. São Paulo, Editora: Átomo, 2009. 382p.

LANCAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. 6ª ed., São Carlos, Editora RiMa, 2004. 62p.

LEHOTAY S. J., KOK A., HIEMSTRA M., BODEGRAVEN P. V., Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. **Journal of AOAC INTERNATIONAL.** v. 88, p. 595-614, 2005.

LEVIGARD, Y. **A interpretação dos profissionais de saúde acerca das queixas do nervoso no meio rural:** uma aproximação ao problema das intoxicações por

agrotóxicos. 2001. 91 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), ENSP, FIOCRUZ Rio de Janeiro, 2001.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Milho.** Disponível em: <www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho> . (2012a), Acesso em: 03 out. 2012.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO), **Agrotóxicos**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/agrotoxicos>. (2012b), Acesso em: 03 out. 2012.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO), **BRASIL PROJEÇÕES DO AGRONEGÓCIO 2011/2012 a 2021/2022**, Brasília, disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projecoes%20do%20Agronegocio%20Brasil%202011-20012%20a%202021-2022%20%282%29%281%29.pdf> (2012c). Acesso em: 15 fev. 2013.

MAPA(MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO), **Resíduos e Contaminantes -** Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/qualidade-seguranca-alimentos-bebidas/alimentos/residuos-e-contaminantes.> (2012d) Acesso em: 29 out. 2012.

MARCHIS, D.; FERRO, G. L.; BRIZIO, P.; SQUADRONE, S.; ABETE, M. C. Detection of pesticides in crops: A modified QuEChERS approach. **Food Control**. v. 25, p. 270-273, 2012.

MARIANI, M. B.; D`AIUTO, V.; GIANNETTI, V. Multiresidue method for the determination of organophosphorus pesticides in cereal matrixes. **Journal of AOAC International**. v. 93, n. 3, 2010.

MARTHE, D. B.; BITTENCOURT, L. M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A. Desenvolvimento de metodologia para determinação de piretroides em manteiga. **Química Nova**. v. 33, n. 6, São Paulo, p. 1389-1393, 2010.

MASTOVSKA, K.; DORWEILER, K. J.; LEHOTAY, S. J.; WEGSCHEID, J. S.; SZPYLKA, K. 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.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos.** 4ª ed., Editora: Bookman, 2010.

NORMAN, K. N. T.; PANTON, S. H. W. Supercritical fluid extraction and quantitative determination of organophosphorus pesticide residues in wheat and maize using gas chromatography with flame photometric and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**. v. 907, p. 247–255, 2001.

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 gás and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. **Anal Bioanal Chem**. v. 389, p. 1697-1714, 2007.

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

PINHO, G. P.; NEVES A. A.; QUEIROZ M. E. L. R.; SILVÉRIO F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**. v. 32, n. 4, p. 987-995, 2009.

PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O.; NEVES A. A.; QUEIROZ M. E. L. R.; STARLING M. A. V. M. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. **Química Nova**. v. 33, n. 4, p. 909-913, 2010.

PIZZUTTI, I. R.; KOK, A.; HIEMSTRA, M.; WICKERT, C.; PRESTES, O. D. Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A.** 1216, p. 4539–4552, 2009.

PRATEANO, V. F., O Brasil é negligente no controle de agrotóxicos, **GAZETA DO POVO**, 14/10/2012, Meio Ambiente. Disponível em: < http://www.gazetadopovo.com.br/vidaecidadania/conteudo.phtml?id=1307493&tit=Brasil-e-negligente-no-controle-de-agrotoxicos> Acesso em: 22 fev. 2013.

PRESTES, O. D., **Método rápido para determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por LC-MS/MS**. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS- Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**. v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI V. L.; ROSA M. A. Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando QuEChERS e UPLC-MS/MS. **Química Nova**. v. 35, n.1, p. 185-192, 2012.

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, n. 5, p. 771-780, 2004.

SANCO (EUROPEAN COMMISSION), METHOD VALIDATION AND QUALITY CONTROL PROCEDURES FOR PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS IN FOOD AND FEED. Documento Nº SANCO/**12495/2011**, 01/01/2012.

SILVA, C.G. A; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**. v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

SOARES, L. C. T.; NETO, A. J. S. Protetores de analitos e efeito de matriz em GC. **Scientia Chromatographica**. v. 4, n. 2, p. 139-152, 2012.

STASHENKO E.; MARTINEZ J. GC-MS: Más de un analizador de masas, ¿para qué?, **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 4, p. 27- 48, 2010.

SOUZA K. A. F. D., NEVES V. A., Experimentos de Bioquímica, **Lipídios**. Disponível em: http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/introducao_lipidios/introducao_lipidios.htm. Acesso em: 20 mar 2013.

TACO, **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**, Campinas - SP, 4ª Edição Revisada e Ampliada, 2011. Disponível em: http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf. Acesso em: 20 mar 2013.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**. v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

THE SAMUEL ROBERTS NOBLE FOUNDATION, INC. **Sumner Group: Ionization Technique**. disponível em: http://www.noble.org/plantbio/sumner/ionization-technique/. Acesso em: 13 fev. 2013.

WATERS, W. X. **TQ MS Operator's Overview and Maintenance Guide**, Revision C, 2010.

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.; DROŻDŻYŃSKI, 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.

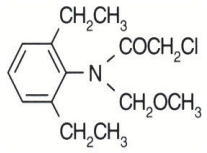
WALORCZYK, S.; DROŻDŻYŃSKI, D.; KOWALSKA, J.; REMLEIN-STAROSTA D.; ZIÓLKOWSKI, A.; PRZEWOŻNIAK, M.; GNUSOWSKI; B. Pesticide residues determination in Polish organic crops in 2007-2010 applying gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry. **Food Chemistry**. V. 139, p. 482-487, 2013.

WU, G.; BAO, X.; ZHAO, S.; WU, J.; HAN, A. YE, Q. Analysis of multi-pesticide residues in the foods of animal origin by GC–MS coupled with accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography cleanup. **Food Chemistry.** v. 126, p. 646–654, 2011.

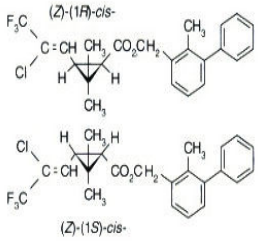
UNIÃO EUROPÉIA, **EU Pesticides database.** Disponível em: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=commodity.resultat. Acesso em: 10 mar. 2012.

ZANELLA, R.; PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; MARTINS, M. L; ADAIME, M. B. **An overview about recent advances in sample preparation techniques for pesticide residues analysis in cereals and feedstuffs**. 2012, Cap.8, p. 149-170.

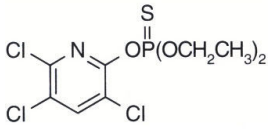
ANEXO A



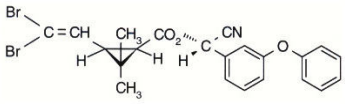
Alacloro



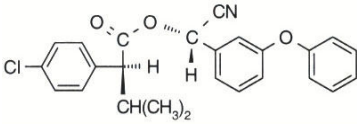
Bifentrina



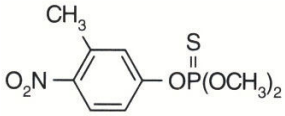
Clorpirifós-etílico



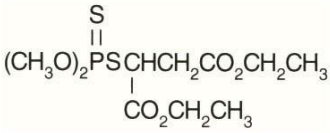
Deltametrina



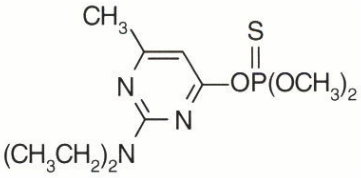
Esfenvalerato



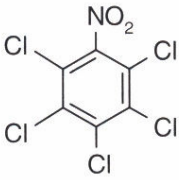
Fenitrotiona



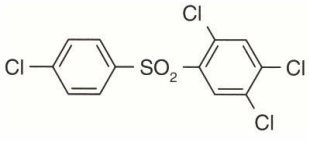
Malationa



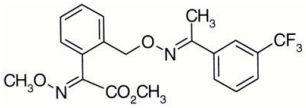
Pirimifós-metílico



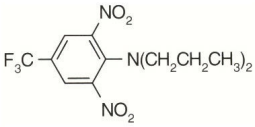
Quintozeno



Tetradifona



Trifloxistrobina



Trifuralina

Fonte: ANVISA (2012).