



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

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM LEITE
BOVINO EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E
GC-MS/MS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Danieli Daiani Bandeira

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM LEITE
BOVINO EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E
GC-MS/MS**

Por

Danieli Daiani Bandeira

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

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

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

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

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

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM LEITE
BOVINO EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E
GC-MS/MS**

elaborado por
Danieli Daiani Bandeira

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime - Orientadora
Universidade Federal de Santa Maria

Prof^a. Dr^a. Neila Richards
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Osmar Damian Prestes
Universidade Federal do Pampa

Santa Maria, 26 de março de 2012.

Dedico este trabalho à minha família e ao
meu namorado que sempre
estiveram ao meu lado em
todos os momentos.
Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime pela orientação neste trabalho, pelos ensinamentos, pela paciência e amizade. Obrigada por ter acreditado no meu potencial, dando-me a oportunidade de fazer parte do LARP.

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

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

À Prof^a. Dr^a. Neila Richards, pela participação na defesa da dissertação e pelas excelentes contribuições, sugestões e comentários para melhoria deste trabalho.

À Juliana, Gisele, Sandra e a Rita, que sempre me proporcionam momentos de descontração, torcem por mim e que compartilharam comigo aflições, alegrias e realizações. Obrigada pela amizade, carinho e apoio.

Ao Manoel pela co-orientação, pela paciência, pelos ensinamentos e pelas sugestões.

Agradeço principalmente à Juliana, Tiele e a Giovana por todo saber compartilhado, pelo apoio, pela paciência, pela disposição e por toda a ajuda na realização deste trabalho. Muito obrigada! Desejo que Deus ilumine sempre o caminho de vocês.

Agradeço também aos colegas e amigos do LARP, Débora, Magali, Mariele, Mariela, Lucila, Filipe, Guilherme, Mateus, Janice, Márcia, Daniela, Fábio, Carol e o Vagner pelo apoio na realização deste trabalho, pelo convívio e pelos momentos de descontração.

À Prof^a Gema, pela amizade, carinho, apoio e incentivo.

Ao meu namorado Marcelo, pela paciência e compreensão durante os últimos meses deste trabalho. Obrigada pelo incentivo, amor, compreensão e carinho.

Aos meus pais Novembrino e Elizete, e meus irmãos Diego, Francieli e Fabiano que torcem por mim sempre. Obrigada pela força, compreensão, amor e carinho.

À minha prima Sulene e aos meus padrinhos Antônio e Ereci pelo incentivo, amor e carinho.

À Evanilda e ao Valdomiro pela amizade, carinho, apoio e incentivo.

À todos os demais familiares e amigos que torceram por mim e me apoiaram durante o desenvolvimento deste trabalho.

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

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

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

Às Sandras, minhas colegas e a todos os professores do Setor de Química Analítica que me apoiaram e incentivaram.

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

RESUMO

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

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS NO LEITE BOVINO EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E GC-MS/MS

Autora: Danieli Daiani Bandeira
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de março de 2012.

Por oferecer uma composição equilibrada, o leite é considerado um dos alimentos *in natura* mais completos nutricionalmente, sendo um produto muito bem aceito no mercado e tendo consumidores de todas as idades. Sendo assim, a análise da qualidade do leite é de grande importância para informação do consumidor e verificação dos parâmetros exigidos pela legislação. Considerando toda a problemática envolvendo as inúmeras substâncias químicas utilizadas com finalidades diversas na agropecuária, e a possibilidade destas chegarem direta ou indiretamente até o leite e causarem danos a saúde da população, neste trabalho foi desenvolvido e validado um método multirresíduo para a determinação de 48 agrotóxicos em leite de vaca, empregando método QuEChERS modificado e GC-MS/MS. O procedimento de extração consistiu em 5,0 mL de amostra (leite integral) extraída com 5,0 mL de acetonitrila acidificada com 1% de ácido acético (v/v), seguido de agitação manual por 1 min, para a etapa de partição utilizou-se 2,0 g de MgSO₄ anidro e 0,85 g de acetato de sódio. Repetiu-se a agitação manual por 1 min, e posteriormente foi realizada a etapa de centrifugação a 3400 rpm, durante 8 min. A etapa de limpeza dispersiva, consistiu em 1,0 mL de extrato sobrenadante, 150 mg de MgSO₄ anidro, 125 mg de C18 e 62 mg de PSA em tubo *ependorf*, os quais foram agitados em vortex por 1 min centrifugados a 10000 rpm por 3 min. Após a centrifugação, o extrato foi transferido para o *insert* de vidro para injeção no sistema GC-MS/MS. Avaliou-se a linearidade, os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), o efeito matriz, a exatidão e a precisão do método analítico. O método demonstrou ser eficiente, apresentando resultados satisfatórios para recuperações, as quais se situaram na faixa entre 71,1 e 117,4%, para 45 dos 48 compostos avaliados, com valores de RSD $\leq 17,3\%$, os valores de LOD_i bem como o LOD_m variaram entre 0,3 e 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o LOQ_i e o LOQ_m variaram entre 1,0 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. O método validado foi aplicado para a determinação de resíduos de 45 agrotóxicos/produtos de degradação em amostras de leite UHT. O método desenvolvido mostrou-se adequado a análise de resíduos de agrotóxicos em leite, pois todos os parâmetros de validação encontraram-se dentro dos limites exigidos para validação de métodos cromatográficos, atendendo satisfatoriamente os objetivos traçados neste trabalho.

Palavras Chave: leite, agrotóxicos, QuEChERS modificado, GC-MS/MS.

ABSTRACT

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

**DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN CATTLE MILK
USING MODIFIED QuEChERS METHOD AND GC-MS/MS**

Author: Danieli Daiani Bandeira
Advisor: Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime
Date and Place: March 26th, 2012, Santa Maria.

For providing a balanced composition, among fresh food, the milk is considered one of the most nutritionally complete, being a product very well accepted in the market with consumers of all ages. Thus, the analysis of milk quality is great importance for consumer information and verification of the parameters required by law. Considering all the problems involving the many chemicals used for several purposes in agriculture, and the possibility of these compounds directly or indirectly the milk and cause damage to population health, this work aimed to develop and validate a method for a multiresidue determination of 48 pesticides in cattle milk, using modified QuEChERS method and GC-MS/MS. The extraction procedure consisted of 5.0 mL of sample (milk) extracted with 5.0 mL of acetonitrile, acidified with 1% of acetic acid (v/v), followed by manual shaking for 1 min for partition step was used 2.0 g of anhydrous MgSO₄ and 0.85 g of anhydrous sodium acetate. Manual agitation was repeated for 1 min, and subsequently it was performed centrifugation at 3400 rpm for 8 min. The dispersive clean up step consisted in add 1.0 mL of supernatant extract, 150.0 mg of anhydrous MgSO₄, 125.0 mg of C18 and 62.0 mg of PSA in an eppendorf tube, which was shaken in a vortex for 1 min, centrifuged at 10000 rpm for 3 min. After centrifugation, the extract was transferred to a glass insert for the injection into the GC-MS/MS system. It was evaluated the linearity, limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ), the matrix effect, accuracy and precision of the analytical method. The method proved to be efficient, with satisfactory results for recoveries, with values in a range between 71.1 and 117.4% for 45 of the 48 compounds analyzed. RSD values lowerd than 17,3%, values of LOD_i and LOD_m ranged between 0.3 to 3.0 µg L⁻¹ and LOQ_i and LOQ_m ranged between 1.0 to 10.0 µg L⁻¹. The validated method was applied for the determination of residues of 45 pesticides/degradation products in samples of milk UHT. The method developed was adequate for the analysis of pesticide residues in cattle milk, as all the validation parameters were within the limits required for validation of chromatographic methods, achieving satisfactorily the objectives outlined in this paper.

Keywords: pesticide; milk; modified QuEChERS; GC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação da fonte de ionização por elétrons	30
Figura 2:	Representação esquemática de um analisador de massas do tipo quadrupolo	32
Figura 3:	Representação de um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo	33
Figura 4:	Sistema GC-MS/MS utilizado para o desenvolvimento deste trabalho	46
Figura 5:	Cromatograma obtido para verificar a possibilidade de utilizar a amostra como “branco”	57
Figura 6:	Cromatogramas obtidos por GC-MS/MS para os 48 agrotóxicos avaliados neste estudo, (A) para as soluções analíticas ($25,0 \mu\text{g L}^{-1}$) preparadas em acetonitrila, (B) para as soluções analíticas ($25,0 \mu\text{g L}^{-1}$) preparadas no extrato “branco” da matriz e (C) fortificação ($25,0 \mu\text{g L}^{-1}$) na matriz “branco”	62
Figura 7:	Cromatogramas no modo MRM obtido para uma solução analítica preparada no extrato da matriz na concentração de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ dos compostos alacloro e parationa metílica, contendo as transições empregadas para a quantificação	63
Figura 8:	Cromatogramas dos extratos “branco” da matriz, obtidos no modo <i>full scan</i> para os quatro diferentes ensaios realizados na etapa de limpeza. (A) $\text{MgSO}_4 + \text{C}_{18}$; (B) $\text{MgSO}_4 + \text{C}_{18} + \text{PSA}$; (C) $\text{MgSO}_4 + \text{C}_{18} + \text{PSA}$, com precipitação a baixa temperatura e (D) $\text{MgSO}_4 + \text{C}_{18}$, com precipitação a baixa temperatura	65
Figura 9:	Percentuais de compostos que apresentaram recuperação	

	entre 70 e 120%, para cada um dos testes realizados durante os ensaios de otimização do método QuEChERS modificado ..	66
Figura 10:	Representação do método para determinação de resíduos de agrotóxicos em leite, utilizando o método QuEChERS modificado ..	68
Figura 11:	Tubos <i>ependorf</i> referentes aos testes 1, 2, 3 e 4, após a centrifugação na etapa de limpeza ..	69
Figura 12:	Percentuais de recuperação dos agrotóxicos para a repetitividade nos três níveis de fortificação (10,0; 25,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) ..	77
Figura 13:	Percentuais de RSD dos agrotóxicos para a repetitividade nos três níveis de fortificação (10,0; 25,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) ..	77
Figura 14:	Representação percentual de efeito matriz para os agrotóxicos analisados por GC-MS/MS, no extrato do leite ..	83
Figura 15:	Cromatograma referente à amostra de leite número 2 ..	84
Figura 16:	Cromatograma referente à amostra de leite número 4 ..	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Composição média do leite em porcentagens	3
Tabela 2:	Produtividade de leite no Brasil (em litros/vaca/ano)	6
Tabela 3:	LMRs estabelecidos pelo MAPA, Codex Alimentarius e EU para os agrotóxicos avaliados neste estudo	12
Tabela 4:	Lista dos agrotóxicos monitorados no leite pelo PNCRC 2010 e seus respectivos LMRs	14
Tabela 5:	Resultado do monitoramento do PNCRC 2010 para o leite	16
Tabela 6:	Relação dos compostos em estudo, com informações de pureza, classe, grupo químico e fórmula molecular	47
Tabela 7:	Relação dos diferentes ensaios realizados para os compostos analisados neste trabalho para escolha do melhor método de análise	52
Tabela 8:	Condições empregadas no sistema cromatográfico GC-MS/MS para a análise de agrotóxicos em leite	58
Tabela 9:	Condições empregadas no sistema cromatográfico GC-MS/MS para a análise de cada um dos compostos de interesse deste trabalho: tempo de retenção, íons precursores, íons produtos e energia de colisão para as transições monitoradas	59
Tabela 10:	Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos em acetonitrila, empregando QuEChERS modificado e GC-MS/MS	70
Tabela 11:	Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos no extrato da matriz, empregando QuEChERS modificado e GC-MS/MS	71

Tabela 12: Valores de LOD e LOQ do instrumento e do método	73
Tabela 13: Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método	75
Tabela 14: Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método	78
Tabela 15: Percentual de efeito matriz para os agrotóxicos analisados por GC-MS/MS, no extrato do leite	80
Tabela 16: Resultado das quatro amostras de leite UHT integral analisadas	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- Ar - Argônio
- ca - corrente alternada
- CARs - carbamatos
- cc - corrente contínua
- CI - ionização química, do inglês *Chemical Ionization*
- C₁₈ - Sílica modificada com hidrocarboneto linear C₁₈, octadecilsilano
- d.i. - diâmetro interno
- d-SPE - extração em fase sólida dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*
- ECD - Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Electron-Capture Detection*
- EFSA - Autoridade Europeia de Segurança Alimentar, do inglês *European Food Safety Authority*
- EI - ionização por elétrons, do inglês *Electron Ionization*
- EM - Efeito matriz
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EU - União Europeia
- FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
- FPD - Detector Fotométrico de Chama, do inglês *Flame-Photometric Detector*
- GC - Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*
- GC-ECD - Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Gas Chromatography with Electron Capture Detection*

- GC-FPD – Cromatografia Gasosa com Detecção Fotométrica de Chama, do inglês *Gas Chromatography with Flame-Photometric Detector*
- GC-MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*
- GC-MS/MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em série, do inglês *Gas Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*
- GC- μ ECD - Cromatografia Gasosa com Micro Detector por Captura de Elétrons, do inglês *Gas Chromatography with micro-Electron Capture Detector*
- GC-NPD - Cromatografia Gasosa com Detecção Nitrogênio e Fósforo, do inglês *Gas Chromatography with Nitrogen Phosphorus Detection*
- GCB - Carbono preto grafitizado, do inglês *Graphitized Carbon Black*
- GPC - Cromatografia por Permeação em Gel, do inglês *Gel Permeation Chromatography*
- HAc - ácido acético
- HCB - hexaclorobenzeno
- HCH – hexaclorociclohexano, do inglês *Hexachlorocyclohexane*
- HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*
- HS-SPME - Microextração em fase sólida no *headspace*, do inglês *Headspace Solid Phase Microextraction*
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- ISO – Organização Internacional para Padronização, do inglês *International Organization for Standardization*
- IUPAC – do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- Kow - Coeficiente de partição octanol-água
- LC - Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*
- LC-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em série, do inglês *Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*
- 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*
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MeCN - acetonitrila
- MgSO₄ - sulfato de magnésio anidro
- MSPD - Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*
- MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas, do inglês *Multiple Reactions Monitoring*
- MS - Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*
- MS/MS - Espectrometria de Massas em série, do inglês *Tandem Mass Spectrometry*
- m/z* - razão massa-por-carga
- n.q. - não quantificado
- NaAc - acetato de sódio
- NPD - Detecção por Nitrogênio-Fósforo, do inglês *Nitrogen-Phosphorus Detection*
- OCs - Organoclorados
- OFs – Organofosforados
- PBT – Precipitação a baixa temperatura
- PCBs – Bifenilas Policloradas
- PDMS-DVB – polidimetilsiloxano/divinilbenzeno
- PI – Padrão interno
- PIB – Produto Interno Bruto
- PIRs - Piretróides
- pKa - Potencial de dissociação ácida
- PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
- PS – Padrão de substituição
- PSA - Amina primária secundária, do inglês *Primary secondary amine*
- PTFE - Politetrafluoretileno ou Teflon, do inglês *Polytetrafluoroethylene*
- PTV – Vaporização com temperatura programada, do inglês *Programmed Temperature Vaporisation*

QqQ - triplo quadrupolo

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

r - coeficiente de correlação

r² - coeficiente de determinação

RIISPOA – Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem
Animal

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

RSDpi - Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

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

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

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

TIC - cromatograma de íons totais, do inglês *total ion chromatogram*

t_R - tempo de retenção

TRIs - Triazinas

UHT - Temperatura de pasteurização ultra alta, do inglês *Ultra High Temperature*

WHO - Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization*

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: Fórmulas estruturais dos agrotóxicos estudados	103
---	-----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	O Leite	3
2.2	O Setor agrícola e a bovinocultura de leite brasileira	5
2.3	Qualidade do leite e pagamento por qualidade	7
2.4	Agrotóxicos e contaminação do leite	8
2.5	Limites Máximos de Resíduos	11
2.6	Monitoramento de resíduos de agrotóxicos e contaminantes em leite no Brasil	13
2.7	Preparo de amostra para análise de resíduos de agrotóxicos ..	16
2.8	Método QuEChERS utilizado para extração de agrotóxicos	22
2.9	Análise de agrotóxicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas com analisador quadrupolar	28
2.9.1	Modos de ionização utilizados na cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	29
2.9.2	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com analisador triplo quadrupolo	31
2.9.3	Técnicas utilizadas para a obtenção de espectros de massas	33
2.10	Efeito matriz	35
2.11	Validação de método	38
2.11.1	Curva analítica e linearidade	38
2.11.2	Seletividade	40
2.11.3	Sensibilidade	40
2.11.4	Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)	41
2.11.5	Precisão	42

2.11.6	Exatidão	43
2.11.7	Robustez	44
3	MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1	Instrumentação	45
3.2	Gases	46
3.3	Materiais	46
3.4	Reagentes e solventes	47
3.5	Padrões analíticos dos agrotóxicos analisados	47
3.6	Amostra utilizada como branco	49
3.7	Padrão interno (PI) e padrão de substituição (PS)	49
3.8	Otimização das condições do Espectrômetro de Massas	50
3.9	Otimização do método QuEChERS modificado para análise de agrotóxicos em leite bovino	51
3.10	Validação do método QuEChERS modificado para análise de agrotóxicos em leite bovino empregando GC-MS/MS	53
3.10.1	Curva analítica e linearidade	53
3.10.2	Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)	53
3.10.3	Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão do método	54
3.10.4	Precisão	55
3.10.5	Avaliação do efeito matriz	56
3.11	Aplicação do método	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	57
4.1	Seleção da amostra utilizada como “branco”	57
4.2	Condições usadas no sistema cromatográfico GC-MS/MS para determinação de agrotóxicos no leite	58
4.3	Condições otimizadas para cada um dos analitos presentes no método desenvolvido	59
4.4	Otimização do método de extração	63
4.5	Validação do método QuEChERS modificado	69
4.5.1	Curva analítica e linearidade	69
4.5.2	Determinação dos valores de LOD e LOQ do instrumento e do método	72
4.5.3	Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão do método	74

4.5.4	Precisão do método (repetitividade) e precisão intermediária	78
4.6	Padrão interno (PI) e padrão de substituição (PS)	79
4.7	Efeito Matriz	80
4.8	Aplicação do método	84
5	CONCLUSÕES	88
6	DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS	90
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	91
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1 INTRODUÇÃO

No âmbito mundial o Brasil é um dos maiores produtores de leite, sendo que no ano de 2009 ficou em quinto lugar no *ranking* (EMBRAPA, 2009). A bovinocultura de leite é uma das mais importantes e tradicionais atividades econômicas em nosso país. De acordo com os dados da Produção Pecuária Municipal 2010 (IBGE, 2010), destacam-se os estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás e Santa Catarina como os maiores produtores de leite do Brasil. No período de 2009 a 2010 a produção cresceu de aproximadamente 29,1 bilhões de litros/ano para mais de 30,7 bilhões (IBGE, 2010).

Juntamente com o crescimento demográfico vem também a necessidade de satisfazer a demanda de leite e derivados e conseqüentemente a necessidade de aumentar a produção. A solução para sanar este problema é intensificar a produtividade, fato este já observado no Relatório da Produção da Pecuária Municipal 2010 (IBGE, 2010), que referiu o aumento da produtividade, passando de 1297 litros/vaca/ano em 2009 para 1340 em 2010.

Os ganhos de produtividade advêm, basicamente, da adoção de tecnologias que melhoram a eficiência do uso dos fatores de produção. O melhoramento da genética nos rebanhos leiteiros, a alimentação e a saúde animal, tiveram importante participação nesta evolução (EMBRAPA, 2008).

O uso de agrotóxicos na agricultura tem colaborado com a produção de alimentos em quantidades cada vez maiores, suprimindo a demanda de uma população (MARASCHIN, 2003) de mais de 6,9 bilhões de pessoas (UNITED NATIONS, 2011). A atividade agrícola proporciona dividendos econômicos aos países em desenvolvimento que têm na agricultura de exportação uma das principais fontes de recursos necessários ao seu desenvolvimento. Entretanto, o uso constante, sem critérios técnicos adequados, ou mesmo desnecessário, pode causar a contaminação do ambiente afetando o solo, o ar e as águas superficiais e subterrâneas. Os agrotóxicos podem ocasionar sérios problemas ambientais, como por exemplo, a diminuição ou eliminação das espécies mais sensíveis, disfunção na capacidade reprodutiva de algumas espécies, a morte de peixes, pássaros, abelhas entre outros. A população pode ser atingida através dos alimentos, da água ou pela

exposição ocupacional, ocasionando desde disfunções orgânicas até intoxicações, podendo levar a morte (MARASCHIN, 2003).

O leite pode sofrer contaminação por agrotóxicos por meio de diferentes fontes: a) contaminação de pastos, rações e cereais; b) contaminação do meio ambiente; c) uso de domissanitários nos currais e estabelecimentos de produção leiteira; d) uso de produtos veterinários no gado leiteiro (KAN *et al.*, 2007).

Considerando toda a problemática envolvendo as inúmeras substâncias químicas utilizadas com finalidades diversas na agropecuária, e a possibilidade destas chegarem direta ou indiretamente até o leite e causarem danos a saúde da população, os objetivos deste trabalho foram: desenvolver e validar um método multiresíduo para a determinação de agrotóxicos em leite bovino, empregando o método QuEChERS (Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*) modificado e GC-MS/MS (Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Gas Chromatography - Tandem Mass Spectrometry*), bem como demonstrar a aplicabilidade do método desenvolvido na determinação destes resíduos de agrotóxicos no leite bovino.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Leite

De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) artigo 475, denomina-se leite, sem outra especificação, o produto normal, fresco, integral, oriundo da ordenha completa e ininterrupta de vacas sadias (TRONCO, 2010). Por oferecer uma equilibrada composição de nutrientes que resulta em elevado valor biológico, é considerado um dos mais completos alimentos *in natura* e por isso é utilizado na alimentação humana (TRONCO, 2010).

Vários são os componentes do leite, sendo a água o que se apresenta em maior proporção e os demais são: gordura, proteínas, carboidratos e também pequenas quantidades de minerais, vitaminas e enzimas (TRONCO, 2010). A composição média de um litro de leite de vaca é especificada na Tabela 1.

Tabela 1: Composição média do leite.

CONSTITUINTE	TEOR (%)
Água	87,3
Gordura	3,6
Proteínas	3,3
Lactose	4,9
Minerais	0,9

Fonte: Tronco, 2010.

Existem vários fatores que afetam a composição do leite tais como: raça, idade da vaca, estágio da lactação, alimentação, estações do ano, estado de saúde da vaca, dentre outros (CQUALI LEITE, 2008).

O principal carboidrato do leite é a lactose, que é produzida pelas células epiteliais da glândula mamária e é a principal fonte de energia dos recém-nascidos. Além da lactose, podem ser encontrados no leite outros carboidratos, como a glicose e a galactose, mas em pequenas quantidades. A lactose controla o volume de leite produzido, atraindo a água do sangue para equilibrar a pressão osmótica na

glândula mamária. A quantidade de água do leite e, conseqüentemente, o volume de leite produzido pela vaca, depende da quantidade de lactose secretada na glândula mamária (EMBRAPA, 2007).

As proteínas do leite são subdivididas em caseína (80%) e proteínas do soro (20%) (TRONCO, 2010). A porcentagem de proteína varia, dentre outros fatores, com a raça e é proporcional à quantidade de gordura presente no leite. Isso significa que quanto maior a porcentagem de gordura no leite, maior será a de proteína. A caseína apresenta alta qualidade nutricional e é muito importante na fabricação dos queijos. A caseína é produzida pelas células secretórias da glândula mamária e encontra-se organizada na forma de micelas, que são agrupamentos de várias moléculas de caseína junto com cálcio, fósforo e outros sais (EMBRAPA, 2007).

A cor branca do leite deve-se ao resultado da dispersão da luz em proteínas, gorduras, fosfatos e citrato de cálcio. O processo de homogeneização do leite aumenta a coloração branca, pois as partículas fragmentadas dispersam mais a luz. O leite desnatado apresenta tonalidade mais azulada, pois existe baixa quantidade de grandes partículas na suspensão (TRONCO, 2010).

A caseína não é facilmente alterada pelo calor permanecendo bastante estável quando o leite é pasteurizado. Entretanto, quando ocorrem mudanças na acidez do leite, há rompimento da estrutura das micelas, o que faz a caseína precipitar e formar coágulos. A gordura e a caseína têm importância fundamental para a manufatura de vários derivados lácteos, sendo que representam a maior concentração de elementos sólidos dos queijos (EMBRAPA, 2007).

Entre os minerais do leite, o cálcio representa um papel importante para a saúde humana. O cálcio e o fósforo encontram-se ligados à caseína na forma de um complexo de fosfocaseinato de cálcio. Existem ainda diversos elementos em quantidades muito pequenas: sódio, potássio, magnésio, flúor, iodo, enxofre, cobre, zinco, ferro, etc. Os sais minerais são importantes e governam a termoestabilidade do leite, além de processos de coagulação (TRONCO, 2010).

A gordura do leite encontra-se na forma de pequenos glóbulos, suspensos na fase aquosa. Cada glóbulo é envolvido por uma camada formada por um componente da gordura denominado fosfolipídio. Essa camada forma uma membrana que impede a união de todos os glóbulos. Desse modo, a gordura do leite é mantida na forma de suspensão (EMBRAPA, 2007).

A maior parte da gordura do leite é constituída de triglicerídeos, que são formados por ácidos graxos ligados ao glicerol. A fração de gordura do leite serve de veículo para as vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K), colesterol e outras substâncias solúveis em gordura, como os carotenóides (provitamina A), que dão ao leite sua cor amarelo-creme (EMBRAPA, 2007).

Os constituintes da gordura do leite são sintetizados a partir de mais de 400 ácidos graxos diferentes, o que torna a gordura do leite a mais complexa de todas as gorduras naturais. Quase todos os ácidos graxos estão presentes em pouquíssimas quantidades sendo que, apenas cerca de 15 estão presentes no nível de 1% ou superior. Os ácidos graxos que se encontram em maior quantidade no leite bovino são entre outros, ácido palmítico, esteárico, butírico, oléico e linoléico (MANSSON, 2008).

As enzimas (lípase, peroxidase, catalase, fosfatase, etc.) são encontradas em baixas concentrações no leite, mas são de grande importância por serem catalisadores bioquímicos. Por isso são usadas, por exemplo, para controlar tratamentos térmicos (fosfatase alcalina) devido a sua sensibilidade ao calor, e para controlar o crescimento bacteriano (sistema lacto-peroxidase-tiocianato) devido a sua atividade bactericida, entre outras (PEREDA *et al.*, 2005).

O leite contém ainda diversas vitaminas, algumas se associam com a gordura (A, D, E e K), enquanto outras se associam com a parte aquosa (B e C). Algumas estão presentes apenas na forma de traços e todas são susceptíveis à destruição por diversos fatores: tratamentos térmicos, ação da luz, oxidações, etc. (TRONCO, 2010).

2.2 O Setor agrícola e a bovinocultura de leite brasileira

A agropecuária brasileira participou em 2010 com 5,8% do Produto Interno Bruto (PIB) do País e movimentou mais de R\$ 180,8 bilhões, representando um crescimento de 6,5% sobre o volume registrado em 2009 (IBGE, 2010).

O agronegócio do leite desempenha um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população. Para cada real de aumento na produção no sistema agro-industrial do leite, há um crescimento de, aproximadamente, cinco reais no aumento do Produto Interno Bruto. O leite

desempenha papel importante no aspecto social do País, principalmente na geração de empregos. Em 2008, mais de 1,1 milhões de propriedades se dedicavam à atividade, ocupando diretamente 3,6 milhões de pessoas. Dados estatísticos mostram que a elevação na demanda final por produtos lácteos em um milhão de reais, gera 195 empregos permanentes. Este impacto supera o de setores tradicionais, como o automobilístico e a construção civil (EMBRAPA, 2008).

Entre 2004 e 2010, houve crescimento médio anual nas exportações brasileiras em praticamente todos os setores agrícolas, à exceção dos pescados. A exportação de produtos lácteos apresentou variação anual de 5,5% neste período, passando de U\$\$ 113 milhões em 2004 para U\$\$ 155 milhões em 2010 (BRASIL, 2011a).

No ano de 2010, foram ordenhadas mais de 22,9 milhões de vacas em todo o País, representando 10,9% do efetivo total de bovinos. A maior produtividade de leite foi na Região Sul do País (2.388 litros/vaca/ano), sendo Santa Catarina o estado com a maior produtividade (2.432 litros/vaca/ano). Dentre os municípios produtores, Castro (PR), destaca-se como o maior produtor nacional de leite, com produtividade média de 7.115 litros/vaca/ano (IBGE, 2010).

A produtividade do leite no Brasil (em litros/vaca/ano) cresceu 12% no período de 2005 a 2010 (Tabela 2). Ganhos significativos de produtividade ocorreram em todas as regiões, merecendo destaques os crescimentos observados no Sul (19,1%) e no Norte (12,5%) do País (IBGE, 2010).

Tabela 2: Produtividade de leite no Brasil (em litros/vaca/ano).

Grandes Regiões	Produtividade de leite (litros/vaca/ano)					
	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Brasil	1194	1213	1237	1278	1297	1340
Norte	598	597	626	618	628	673
Nordeste	747	767	775	787	795	811
Sudeste	1351	1355	1347	1376	1386	1410
Sul	2005	2066	2157	2265	2314	2388
Centro-Oeste	1116	1115	1129	1166	1178	1220

Fonte: IBGE, 2010.

É seguro afirmar que os ganhos de produtividade advêm, basicamente, da adoção de tecnologias que melhoram a eficiência do uso dos fatores de produção. O melhoramento da genética nos rebanhos leiteiros, a alimentação e a saúde animal, tiveram importante participação nesta evolução (EMBRAPA, 2008).

Nas projeções brasileiras do agronegócio de 2010/2011 a 2020/2021, o leite foi considerado como um dos produtos que apresenta elevadas possibilidades de crescimento. A produção deverá crescer a uma taxa anual de 1,9%. Isso corresponde a uma produção de 38,2 bilhões de litros de leite cru no final do período das projeções (BRASIL, 2011b).

2.3 Qualidade do leite e pagamento por qualidade

A análise da qualidade do leite é de grande importância tanto para a sociedade quanto para a ciência, pois com ela será provado se realmente o consumidor está comprando um produto de acordo com o que é exigido pela legislação. O leite é um produto muito bem aceito no mercado, tendo consumidores de diferentes características e de todas as idades (SILVA *et al.*, 1999).

Para que o leite seja considerado de boa qualidade é necessário que atenda, pelo menos à quatro critérios: ausência de agentes patogênicos e contaminantes (resíduos de antimicrobianos, agrotóxicos e substâncias estranhas ao leite); baixa carga microbiana; sabor agradável e alto valor nutritivo (COSTA, 2009).

Em geral, os incentivos por qualidade variam entre as indústrias ou cooperativas, mas a contagem de células somáticas, contagem total de bactérias, ausência de resíduos de antimicrobianos e de outros inibidores e ausência de fraude por adição de água, são geralmente contemplados. Além destes indicadores, no Brasil, nos programas ditos de “pagamento por qualidade”, são incluídos também uma série de fatores relacionados às condições de produção, que não medem a qualidade em si, considerando, por exemplo, o volume e o manejo (MADALENA, 2000).

No Brasil, diversas empresas empregam atualmente sistemas de pagamento baseados na composição centesimal do leite, nos quais a proteína bruta e a gordura são os componentes mais valorizados (MARTINS *et al.*, 2004).

Atualmente, o consumidor tornou-se mais exigente e muitos são os requisitos que as indústrias precisam atender para comercializar os seus produtos nos mercados interno e externo. Nesse contexto, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou no *Diário Oficial da União* de 29 de dezembro de 2011 a Instrução Normativa nº 62 (IN 62) em substituição da Instrução Normativa nº. 51 (IN 51). Estas Instruções Normativas tem como finalidade regulamentar o padrão de identidade e qualidade do leite, incluindo manejo de ordenha, resfriamento na propriedade, e transporte em grande quantidade e também os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e contagem de células somáticas, o que aumentou o nível de exigência nas propriedades e nas indústrias da área.

Com a intenção de monitorar também a presença de resíduos de agrotóxicos e de medicamentos veterinários o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), tendo em vista o disposto na Portaria MA nº 51, de 6 de fevereiro de 1986, Portaria MAARA nº 527, de 15 de agosto de 1995, Portaria MAPA nº 45, de 22 de março de 2007, e o que consta do Processo nº 21000001330/2010-72, publicou no *Diário Oficial da União* de 03 de maio de 2010 a Instrução Normativa nº. 08, aprovando o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC - 2010).

2.4 Agrotóxicos e contaminação do leite

A Lei Federal Brasileira nº 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, define agrotóxicos e afins como “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” (BRASIL, 2002).

De acordo com o *Codex Alimentarius*, agrotóxico é definido como sendo “toda e qualquer substância utilizada com o propósito de prevenir, destruir, atrair, repelir

ou controlar qualquer peste, incluindo espécies indesejáveis de plantas, insetos ou animais, durante as etapas de produção, armazenamento, transporte, distribuição e processamento do alimento ou ração animal” (FAO, 2005).

ROCHA (2009) define agrotóxico como: “todas as substâncias de origem natural ou sintética utilizadas no controle e/ou eliminação/diminuição de pragas (insetos, ervas daninhas, etc.), as quais causam prejuízos na produção de alimentos ou transferem enfermidades aos seres humanos e a outros organismos”.

A principal classificação dos agrotóxicos é quanto ao seu emprego: 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 e CANN, 2011).

Outra classificação dada aos agrotóxicos refere-se a sua classificação química, sendo as principais: os organoclorados (OCs), organofosforados (OFs), carbamatos (CARs), triazinas (TRIs) e piretróides (PIRs). Na classe dos OFs destacam-se principalmente os inseticidas e alguns herbicidas, entre os CARs os herbicidas e fungicidas, nas TRIs os herbicidas e nos PIRs os inseticidas (MCKINLAY *et al.*, 2008).

Agrotóxicos organoclorados (OCs), são eficazes contra uma variedade de insetos e foram amplamente utilizados em todo o mundo na agricultura e em animais até que países desenvolvidos restringiram o seu uso no final de 1970 (LEDOUX, 2011). Estes poluentes têm alta estabilidade, baixa volatilidade, são apolares, lipofílicos e, conseqüentemente, apresentam persistência ambiental considerável com uma tendência para a bioacumulação, levando à contaminação dos gêneros alimentícios, especialmente aqueles com alto teor de gordura (LÁZARO *et al.*, 1996). Embora a concentração destes resíduos tenha diminuído nos alimentos monitorados, uma vez que estes produtos químicos foram proibidos na maioria dos países, níveis de traço ainda são detectados em muitos gêneros alimentícios (YAGÜE *et al.*, 2001).

Agrotóxicos organofosforados (OFs) são usados principalmente como inseticidas, são ésteres de ácido fosfórico com substituintes diferentes (PAGLIUCA *et al.*, 2005). OFs têm propriedades físico-químicas muito diferentes, tais como polaridade e solubilidade em água (JUHLER, 1997). Estas substâncias agem

através da inibição da acetil-colinesterase, e por isso representam um risco à saúde humana (LEDOUX, 2011).

Agrotóxicos carbamatos (CARs), são utilizados para o controle de um amplo espectro de insetos em todo o mundo (LISKA et al., 1996). Carbamatos, atuam como inibidores da acetil-colinesterase e podem levar a distúrbios neurológicos reversíveis (LEDOUX, 2011), e alguns são suspeitos de serem cancerígenos e mutagênicos (BOGIALLI et al., 2006).

Agrotóxicos piretróides (PIRs) são inseticidas de amplo espectro com toxicidade baixa para mamíferos e curto prazo de persistência no meio ambiente. Piretróides são compostos lipofílicos, com polaridade variando de apolar à baixa polaridade. Nos animais, eles tendem a bioacumulação em tecidos lipídicos, tornando-se uma potencial fonte de exposição humana através dos gêneros alimentícios (STEFANELLI et al., 2009).

Triazinas (TRIs) estão entre os herbicidas mais utilizados na agricultura. A maioria deles são derivados de s-triazina (1,3,5 - triazina), mas alguns são baseados em 1,2,4-triazina (PACÁKOVÁ et al., 1996). As triazinas são degradadas por processos químicos e biológicos em suas respectivas hidroxitriazinas (LISKA et al., 1996). S-triazinas e seus produtos de degradação são fracamente básicos, pouco solúveis em água e compostos de baixa polaridade, estáveis no ambiente e portanto, persistentes (PACÁKOVÁ et al., 1996). Esses herbicidas são suspeitos de causar câncer, defeitos de nascimento e interrupção da função hormonal.

O leite pode sofrer contaminação por agrotóxicos por meio de diferentes fontes: a) contaminação de pastos, rações e cereais; b) contaminação do meio ambiente; c) uso de domissanitários nos currais e estabelecimentos de produção leiteira; d) uso de produtos veterinários no gado leiteiro (KAN et al., 2007).

A contaminação de pastos e dos cereais utilizados na alimentação animal tem sua origem nos tratamentos e produtos aplicados às plantas que podem ser contaminadas durante as pulverizações ou indiretamente por meio de produtos residuais no solo como: herbicidas, nematicidas e acaricidas (GONZÁLEZ-RODRIGUES et al., 2005).

São registrados pelo MAPA cerca de 380 diferentes produtos veterinários formulados contendo agrotóxicos, correspondentes a 15 diferentes ingredientes ativos de 9 diferentes classes químicas, sendo estes utilizados no gado para o combate aos parasitas animais (BASTOS et al., 2011).

2.5 Limites Máximos de Resíduos de Agrotóxicos

O *Codex Alimentarius* define resíduos de agrotóxicos como qualquer substância encontrada em alimentos de origem vegetal ou animal, resultante do uso de agrotóxicos. O termo inclui quaisquer derivados de um agrotóxico, tais como: metabólitos, produtos de degradação e impurezas consideradas de importância toxicológica que permanecem no alimento e são provenientes de produtos agrícolas e/ou animais tratados com estas substâncias (CODEX ALIMENTARIUS, 2010).

O Regulamento N° 315/93 do Conselho das Comunidades Europeias, define contaminante como qualquer substância que não seja intencionalmente adicionada a um gênero alimentício, mas nele esteja presente como resíduo da produção (incluindo os tratamentos aplicados às culturas e ao gado e na prática da medicina veterinária), fabricação, processamento, preparação, tratamento, acondicionamento, embalagem, transporte ou armazenagem do referido alimento ou em resultado de contaminação ambiental.

Segundo a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA, do inglês *European Food Safety Authority*), o risco potencial que os agrotóxicos oferecem ao homem através da alimentação, devido a uma exposição crônica diária, determinou a exigência de Limites Máximos de Resíduos (LMRs) que consiste na concentração máxima de agrotóxico legalmente aceita no alimento, em decorrência das boas práticas agrícolas (EFSA, 2011). Em função disto, vários países possuem programas de monitoramento dos níveis de resíduos de agrotóxicos, a fim de garantir a segurança alimentar e ambiental (STEPAN *et al.*, 2005).

O LMR é definido, pelo *Codex Alimentarius*, como sendo a concentração máxima do resíduo de um agrotóxico (expresso em mg kg^{-1}), recomendado pela Comissão do *Codex Alimentarius* (*Codex Alimentarius Commission*) como sendo legalmente permitido em alimentos e rações animais. (CODEX ALIMENTARIUS, 2010).

Para que os agrotóxicos sejam utilizados, mantendo a segurança no alimento, é necessário que sejam seguidos padrões toxicológicos internacionais considerados seguros ao homem. Um desses parâmetros é a ingestão diária aceitável (IDA) também denominada dose de referência pela Environmental Protection Agency (EPA). Esses parâmetros sugerem a quantidade de substância presente em um

dado alimento ou água que pode ser ingerida diariamente ao longo da vida sem que ocorram efeitos adversos à saúde (JARDIM *et al.*, 2009).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável pelo processo de registro de aditivos, agrotóxicos e medicamentos veterinários e pela condução de avaliação de risco da exposição humana a estas substâncias e a contaminantes em alimentos. Internacionalmente, procedimentos de avaliação de risco são conduzidos pelos comitês científicos da Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*) e a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) para subsidiar o estabelecimento de padrões alimentares pelo *Codex Alimentarius* (JARDIM e CALDAS, 2009).

A legislação brasileira referente aos resíduos de agrotóxicos tem sido aperfeiçoada nos últimos anos com base em informações fornecidas pela FAO/WHO e pelo *Codex Alimentarius* (KOLBERG, 2008).

Na Tabela 3 estão listados todos os agrotóxicos avaliados neste estudo, bem como os seus respectivos LMRs estabelecidos pelo MAPA, Codex Alimentarius e EU (União Européia).

Tabela 3: LMRs estabelecidos pelo MAPA, Codex Alimentarius e EU para os agrotóxicos avaliados neste estudo.

Analitos	MAPA* ($\mu\text{g L}^{-1}$)	EU** ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CODEX ALIMENTARIUS*** ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Alacloro	-	10,0	-
Aldrin	6,0	6,0 (c)	6,0 (c)
Azoxistrobina	-	10,0	10,0
Bifentrina	-	10,0	200,0
Carbofuran	100,0	100,0	-
Cialotrina lambda	25,0	50,0	200,0
Ciflutrina	20,0	20,0 (d)	40 (d)
Cipermetrina	20,0	50,0 (d)	50 (d)
Clorpirifós etílico	10,0	10,0	20,0
Clorpirifós metílico	10,0	10,0	10,0
DDT e metabólitos	40,0 (a)	40,0 (a)	20,0 (a)
Deltametrina	20,0	50,0	50,0
Diazinona	10,0	10,0	20,0
Dicofol	-	20,0	100,0
Dieldrin	6,0	(c)	(c)
Difenoconazole	-	10,0	5,0
Endosulfan	-	50,0 (e)	10,0 (e)
Endrin	2,0	1,0	-

Analitos	MAPA* (µg L⁻¹)	EU** (µg kg⁻¹)	CODEX ALIMENTARIUS*** (µg kg⁻¹)
Epoxiconazole	-	2,0	-
Esfenvalerato	-	(f)	-
Fenitrotona	-	10,0	10,0
Fenvalerato	40,0	20,0 (f)	100,0
HCH, alfa	4,0	4,0	-
HCH, delta	-	3,0	-
Heptacloro	4,0 (b)	4,0 (b)	6,0 (b)
Hexaclorobenzeno	10,0	10,0	-
Lindano	10,0	1,0	10,0
Malationa	-	20,0	-
Metidationa	20,0	20,0	1,0
Miclobutanil	-	10,0	10,0
Mirex	2,0	-	-
Parationa etílica	20,0	50,0	-
Parationa metílica	-	20,0	-
Permetrina	50,0	50,0	-
Pirazofós	-	20,0	-
Pirimifós etílico	20,0	-	-
Pirimifós metílico	50,0	50,0	10,0
Procimidona	-	20,0	-
Propiconazole	-	10,0	10,0
Propoxur	50,0	50,0	-
Tetradifona	-	50,0	-
Triclorfon	-	100,0	-
Trifluralina	-	10,0	-

Fonte: * BRASIL – MAPA/PNCRC, 2010; ** EU, Pesticides database; *** CODEX ALIMENTARIUS, Pesticide Residues in Food and Feed.

(a) O limite de referência refere-se ao somatório de DDT e metabólitos (4,4-DDE, 4,4-DDD, 2,4-DDT e 4,4-DDT);

(b) O limite de referência refere-se ao somatório de heptacloro e heptacloro epóxido;

(c) O limite de referência refere-se ao somatório de aldrin e dieldrin;

(d) O limite de referência refere-se ao somatório dos isômeros;

(e) O limite de referência refere-se ao somatório de endosulfan alfa, beta e sulfato;

(f) O limite de referência refere-se ao somatório de fenvalerato e esfenvalerato;

2.6 Monitoramento de resíduos de agrotóxicos e contaminantes em leite no Brasil

A falta de boas práticas na aplicação de produtos veterinários levou ao uso inadequado desses, gerando populações de endoparasitas e ectoparasitas resistentes a diferentes classes de produtos. Desta forma, há a necessidade do uso

de outros produtos químicos em curto espaço de tempo, dentro de uma mesma propriedade (SANTOS *et al.*, 2009).

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos é crucial para a avaliação dos riscos provenientes da contaminação alimentar. Além disso é imprescindível para que ações da vigilância sanitária, na prevenção e controle dos riscos à saúde por meio do consumo de alimentos contaminados, sejam colocadas em prática (JARDIM *et al.*, 2009).

Sendo assim, a competência para estabelecer LMRs em alimentos seja de agrotóxicos, medicamentos veterinários, contaminantes e aditivos, são do Ministério da Saúde (MS) por meio da ANVISA. No caso de estes não estarem estabelecidos por esse Ministério, utiliza-se os internalizados no Mercosul, os recomendados pelo *Codex Alimentarius*, os constantes nas Diretivas da União Européia e os utilizados pelo FDA/USA (BRASIL, 1999).

No Brasil o MAPA monitora através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes a presença agrotóxicos, contaminantes e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Estão no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC 2010) para a matriz leite (Tabela 4), 43 agrotóxicos e produtos de degradação de diferentes classes químicas (carbamatos, organoclorados, organofosforados e piretróides) e 5 PCBs.

Tabela 4: Lista dos agrotóxicos monitorados no leite pelo PNCRC 2010 e seus respectivos LMRs.

Grupo Químico	Analitos	LMRs ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Agrotóxicos organoclorados e PCBs	Aldrin	6,0
	HCH-alfa	4,0
	Lindano	10,0
	Hexaclorobenzeno	10,0
	Dieldrin	6,0
	Endrin	2,0
	Heptacloro (a)	4,0
	DDT e metabólitos (b)	40,0
	Clordano (c)	2,0
	Mirex	2,0
	Metoxicloro	10,0
PCBs (d)	2,0	
Carbamatos	Carbaril	20,0
	Carbofuran	100,0
	Metomil	20,0
	Propoxur	50,0

Grupo Químico	Analitos	LMRs ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	Aldicarb	10,0
	Metiocarb	50,0
	Oxamil	50,0
	Clorpirifós etílico	10,0
	Clorpirifós metílico	10,0
	Diazinona	10,0
	Metamidofós	10,0
	Mevinfós	50,0
Organofosforados	Acefato	20,0
	Pirimifós etílico	20,0
	Pirimifós metílico	50,0
	Parationa etílica	20,0
	Metidationa	20,0
	Azinfós metil	50,0
	Azinfós etil	50,0
	Gama-cialotrina	25,0
	Lambda-cialotrina	25,0
	Deltametrina	20,0
Piretróides	Permetrina	50,0
	Ciflutrina	20,0
	Cipermetrina	20,0
	Fenvalerato	40,0

Fonte: BRASIL, 2010.

- (a) O limite de referência refere-se ao somatório de heptacloro e heptacloro epóxido;
 (b) O limite de referência refere-se ao somatório de DDT e metabólitos (4,4-DDE, 4,4-DDD, 2,4-DDT e 4,4-DDT);
 (c) O limite de referência refere-se ao somatório dos isômeros clordano cis e trans.
 (d) PCBs 101, 118, 138, 153 e 180.

Os herbicidas, classe agrônômica mais comercializada no Brasil, com uso permitido freqüentemente em pastagens, cereais (caroço de algodão, cevada, milho, sorgo, etc.) além de outras fontes de alimentação como a cana de açúcar, não possuem avaliações dos resíduos em amostras de leite, mesmo havendo possibilidades de chegarem a esse alimento (BASTOS *et al.*, 2011).

O MAPA publicou no Diário Oficial da União de 28 de fevereiro de 2011 a Instrução Normativa nº. 06, de 25 de fevereiro de 2011, com os resultados do acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes dos subprogramas de monitoramento em carnes (bovina, suína, aves e eqüina), leite, ovos, mel e pescado do exercício de 2010. Na oportunidade o MAPA recomendou aos setores produtivos contemplados pelo PNCRC/2010, com base nas violações detectadas pelo programa, que sejam adotadas medidas de educação sanitária a campo para atendimento às boas práticas de utilização de produtos de uso

veterinário, a fim de mitigar o risco da ocorrência de resíduos/contaminantes em produtos de origem animal (BRASIL, 2011c).

As violações encontradas no monitoramento do PNCRC 2010 foram em carnes bovina, suína, eqüina e de aves. Sendo que os resíduos encontrados foram: contaminantes inorgânicos (cádmio e arsênio), substâncias de ação anabolizante I* (zeranol), avermectinas (abamectina, doramectina e ivermectina), quinolonas (enrofloxacina), sulfonamidas (sulfaquinoxalina) e nicarbazina (BRASIL, 2011c).

No monitoramento do PNCRC 2010 para leite, não foram encontradas violações para os compostos avaliados, entretanto, essas avaliações não incluem todos os analitos pertencentes às classes, nem englobam todos os agrotóxicos com uso permitido na legislação atual. Na Tabela 5 estão descritas as classes de compostos avaliadas, bem como a quantidade de análises realizadas.

Tabela 5: Resultado do monitoramento do PNCRC 2010 para o leite.

Tipo de amostra	Tipo de análise	Análises concluídas	Nº. de não conformidades detectadas
Leite bovino	Carbamatos	79	0
	Tetraciclina	154	0
	Cloranfenicol	60	0
	Organofosforados	81	0
	Aflatoxina M1	103	0
	Sulfonamidas	76	0
	Avermectinas	71	0
	Albendazol	76	0

Fonte: BRASIL, 2011a.

2.7 Preparo de amostra para análise de resíduos de agrotóxicos em leite

A determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentares é um desafio, principalmente por causa das pequenas quantidades de analitos e grandes quantidades de substâncias interferentes que podem ser co-extraídas e, na maioria dos casos, afetar os resultados de uma análise (WILKOWSKA e BIZIUK, 2011).

A determinação de resíduos de contaminantes em matrizes complexas, tais como alimentos, muitas vezes requer extensa etapa de extração e preparação da amostra antes da análise instrumental. O preparo da amostra é muitas vezes o gargalo em uma análise e há a necessidade de minimizar o número de etapas para reduzir os prazos e as fontes de erro (RIDGWAY *et al.*, 2007). Em função disto,

métodos analíticos têm sido desenvolvidos com a finalidade de minimizar o número de manipulações físicas e químicas, o volume de solvente, o número de etapas de evaporação do solvente, o uso de solventes tóxicos, e tiveram por objetivo automatizar, na medida do possível, os procedimentos de extração e clean-up (ARGAUER *et al.*, 1997).

Consequentemente, técnicas mais ecológicas, utilizam na maioria das vezes menor tamanho de amostra, sendo que a quantidade necessária de amostra depende da matriz, das propriedades e da concentração do analito a ser determinado. As etapas comuns no preparo de amostras incluem amostragem/homogeneização, extração, limpeza e as vezes concentração, seguida pela análise final (RIDGWAY *et al.*, 2007).

Os LMRs estabelecidos para os contaminantes presentes nos alimentos estão em geral, diminuindo devido a exigência de melhor qualidade dos alimentos por parte de consumidores e órgãos governamentais. Por este motivo são necessários métodos mais sensíveis e confiáveis, com menores limites de detecção, capazes de melhorar a avaliação de risco da presença de agrotóxicos nos alimentos, fornecendo maior proteção para o consumidor. Métodos de análise devem ser sensíveis o suficiente para cobrir não só limites legais de substâncias com uso permitido, mas também a detecção de substâncias proibidas devido ao mau uso ou a contaminação não intencional, especialmente para compostos que podem ser genotóxicos ou carcinogênicos. Avaliações de risco para a saúde pública e preocupações com a segurança alimentar requerem dados confiáveis e inequívoca identificação das substância, para que as avaliações de dados ou de risco não possam ser questionadas (RIDGWAY *et al.*, 2007).

A extração líquido-líquido (LLE) foi e ainda é utilizada para extrair resíduos de agrotóxicos do leite fluído. Este procedimento consiste na agitação de amostras de leite fluído várias vezes em solventes orgânicos selecionados para a extração de resíduos de agrotóxicos do leite (LEDOUX, 2011).

PAGLIUCA e colaboradores (2005), desenvolveram um método para analisar 8 agrotóxicos organofosforados (acefato, clorpirifós etílico, clorpirifós metílico, diazinona, metamidofós, metidationa, forato e pirimifós metílico) em leite. O isolamento destes agrotóxicos foi realizado por partição líquido-líquido e posterior etapa de limpeza por SPE, seguida de identificação e quantificação por GC-NPD. Para a extração foram utilizados 20 g de leite a 20 °C, que foram extraídos com 25

mL de acetona:acetonitrila (1:4), sendo que a mistura (amostra + solvente extrator) ficou em repouso por 20 min. A amostra foi agitada e posteriormente centrifugada. A fase líquida foi decantada em um frasco e o leite (sólido) foi redissolvido em 2 mL de água ao qual foi adicionado 20 mL de acetona:acetonitrila (1:4) e feita uma segunda extração, da mesma forma que a anterior. A fase líquida foi decantada, bem como anteriormente e a extração foi repetida uma terceira vez. As fases líquidas foram adicionadas a 50 mL de diclorometano em um funil de separação. O extrato contendo diclorometano foi coletado enquanto o extrato contendo acetona:acetonitrila foi extraído mais 2 vezes com diclorometano. Os extratos de diclorometano foram reunidos, secos com sulfato de sódio anidro por 30 min, filtrados em papel filtro e levados a secura em rotaevaporador rotativo. A amostra foi dissolvida em 1 mL de acetonitrila e percolada em cartucho de SPE (C₁₈), o qual foi lavado com 2 mL de acetonitrila e 1 mL de 2-propanol. Os 4 mL resultantes foram concentrados a secura e redissolvidos em 200 µL de acetona. As recuperações das amostras fortificadas com 5, 10 e 50 ppb, variaram de 59 a 117%. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram, respectivamente, 1 e 5 µg L⁻¹ para cada composto e permitiram quantificar resíduos abaixo dos limites legais.

Um dos desafios analíticos na segurança alimentar é apresentar resultados confiáveis no que diz respeito às diretrizes oficiais, o mais rápido possível, sem prejudicar as propriedades do método, como a precisão, recuperação, sensibilidade, seletividade e especificidade. Procedimentos de extração clássica como a extração por particionamento líquido-líquido são tediosas e demoradas, exigem muita manipulação e utilização de grandes volumes de solventes (RIDGWAY *et al.*, 2007). Este método convencional ainda é amplamente utilizado, porque têm provado ser confiável. No entanto, tem-se observado avanços no processo de preparo da amostra para minimizar a produção de resíduos perigosos, o tempo e o trabalho empregado e reduzir o custo por amostra (RIDGWAY *et al.*, 2007).

Recentemente, várias técnicas têm sido utilizadas para a extração de agrotóxicos do leite, tais como: Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*), Microextração em Fase Sólida no *Headspace* (HS-SPME, do inglês *Headspace Solid Phase Microextraction*), Microextração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*), Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*) e QuEChERS (rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*).

BOGIALLI e colaboradores (2006), desenvolveram um método multiresíduo para análise de resíduos de 27 herbicidas e 3 fungicidas em leite bovino, utilizando SPE, seguida de quantificação por LC-MS/MS (Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*). O método de extração consistiu de 4 mL de amostra diluída com 35 mL de solução água/metanol (50:50, v/v), agitada por 5 min para homogeneização e então passada por um cartucho de SPE preenchidos com 0,5 g de Carboglyph 4 (sorvente a base de carbono grafitizado, com área superficial de $200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), a uma vazão de $5\text{-}6 \text{ mL min}^{-1}$, em seguida o cartucho foi lavado com 2 mL de solução água/metanol (50:50, v/v) seguido por 0,3 mL de metanol. A eluição dos analitos foi efetuada com 1,5 mL de metanol seguido por 6,0 mL de uma solução de cloreto de metileno/metanol (80:20, v/v) acidificada com 50 mmol L^{-1} . O eluato contendo os analitos foi coletado em frasco de vidro com fundo cônico e a remoção parcial do solvente foi realizada em banho de água a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ sob fluxo de nitrogênio. Para evitar perda dos analitos, a evaporação do solvente foi interrompida quando o frasco continha ainda cerca de $100 \text{ }\mu\text{L}$ do extrato. O extrato foi filtrado por filtro de PTFE e após $50 \text{ }\mu\text{L}$ do extrato final foi analisado por LC-MS/MS. As recuperações para todos os agrotóxicos estudados variaram entre 81 e 120% com RSD inferiores a 8%.

Nos últimos anos, compostos organofosforados se tornaram uma das classes de agrotóxicos mais utilizadas, devido a sua toxicidade aguda contra uma grande variedade de pragas. RODRIGUES e colaboradores (2011) desenvolveram um método para determinar resíduos de 10 agrotóxicos organofosforados (diclorvós, sulfotet, demeton-S, dimpilate, disulfoton, parationa metílica, fenitrotiona, clorpirifós etílico, parationa etílica e etiona) em leite de vaca, baseado em HS-SPME seguido por identificação e quantificação por GC-MS (Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*). A extração consistiu em uma alíquota de 12 mL de leite em um frasco de vidro selado de 20 mL e tempo de espera de 30 min para atingir o equilíbrio gás-líquido. Em seguida a fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS-DVB) foi exposta ao headspace. A extração foi realizada a temperatura controlada de $90 \text{ }^\circ\text{C}$, com agitação de 600 rpm por 45 min. Após a extração e pré-concentração, a fibra foi inserida diretamente no injetor do GC para dessorção a $250 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min. A SPME é uma técnica de extração não exaustiva, apresentando recuperações

geralmente baixas. Entre os 10 agrotóxicos estudados, etiona é o menos polar e, portanto, apresentou recuperações inferiores aos demais, pois PDMS/DVB é bipolar (RODRIGUES *et al.*, 2011). A baixa recuperação da etiona é explicada pela sua maior afinidade com a matriz, rica em lipídios, do que com a fibra (PICÓ *et al.*, 2007). O método foi aplicado em amostras de leite de vacas expostas aos agrotóxicos, sendo que foram encontrados resíduos de clorpirifós dentro de um período de 24 h após a aplicação e de etiona num período de até 72 h após a aplicação (RODRIGUES *et al.*, 2011).

FERNANDEZ-ALVAREZ e colaboradores (2008) desenvolveram um método baseado em SPME com imersão direta, seguida por GC- μ ECD (Cromatografia Gasosa com Micro Detector por Captura de Elétrons, do inglês *Gas Chromatography with micro-Electron Capture Detector*) para a determinação simultânea de 35 agrotóxicos (organoclorados, piretróides e organofosforados) no leite. O procedimento de extração consistiu de 1 mL de leite diluído em 9 mL de água milli-Q, a temperatura de 100 °C e sob agitação por 30 min e a fibra utilizada foi PDMS/DVB. Após terminado o período de exposição, a fibra foi imediatamente inserida no injetor do GC, sendo que o tempo de dessorção otimizado foi de 5 min. Os RSDs obtidos durante o processo de validação foram $\leq 13\%$ e os LODs e LOQs foram satisfatórios e respeitaram os LMRs estabelecidos pela legislação. O método foi validado para leite integral, semi desnatado e desnatado e as recuperações variaram de 72 a 139%. Um inconveniente da micro-extração em fase sólida com imersão direta para a análise de leite, é que a vida útil da fibra é reduzida devido a quantidade de lipídeos presentes na matriz.

TSIPLAKOU e colaboradores (2010) investigaram a presença de 40 compostos (agrotóxicos e produtos de degradação) em leites de cabra e ovelhas. O procedimento de extração consistiu em extrair os compostos presentes em 0,1 g de gordura do leite com 2,5 mL de acetato de etila e 2,5 mL de ciclohexano e posterior adição de sulfato de sódio anidro seguidos de agitação e centrifugação. Uma alíquota de 4 mL do extrato sobrenadante (acetato de etila:ciclohexano 1:1 (v/v)) foi injetado no sistema de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC do inglês, *Gel Permeation Chromatography*) o qual foi eluído sob uma vazão de 5 mL min⁻¹. A fração representativa contendo os analitos foi coletada de 18 a 32 min (aproximadamente 70 mL). A fração GPC foi evaporada à secura em evaporador rotativo a 40 °C. Para a análise por GC-MS/MS, o resíduo foi re-dissolvido em 0,5

mL de 2,2,4-trimetil pentano:tolueno (9:1 v/v). O LOQ foi estabelecido como $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ (a menor concentração testada), sendo que as recuperações para o nível de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ variaram entre 81,2 e 114,7 com RSDs inferiores a 20,4% e para o nível de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ variaram entre 70,2 e 109,3% com RSDs inferiores a 20,6%.

YAGÜE e colaboradores (2001) desenvolveram um método de extração por MSPD para a análise de resíduos de 6 bifenilas policloradas (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 e PCB 180) e 22 agrotóxicos organoclorados (HCB, α -HCH, β -HCH, lindano, aldrin, dieldrin, endrin, heptacloro, heptacloro epóxido, clordano, trans-nonacloro, α -endosulfan, β -endosulfan, endosulfan sulfato, 2,4-DDD, 4,4-DDD, 2,4-DDE, 4,4-DDE, 2,4-DDT e 4,4-DDT) em leite integral e posterior determinação por GC-ECD. O procedimento de extração foi realizado em uma seringa com a extremidade inferior de vidro grosso poroso ao qual foram adicionados 2 discos de papel filtro para evitar perda da fase sólida 2 g de C_{18} foi adicionada na seringa e condicionada por lavagens sequenciais com 5,0 mL de éter de petróleo e 5,0 mL de acetona, seguido de duas porções de 2,0 mL de metanol. O metanol em excesso foi removido por filtração a vácuo suave e 3,0 mL de leite foram transferidos para a coluna, o qual foi misturado com o C_{18} usando uma espátula de aço inoxidável, 1,5 mL de acetonitrila foi acrescentado à coluna e foi misturado novamente com a espátula. A mistura ficou “estabilizando” durante 5 min e em seguida 5,0 mL de água destilada foi adicionado a mistura e então esta foi passada através da coluna, a uma vazão de cerca de 2 gotas s^{-1} . A coluna foi lavada com água destilada e seca por aplicação de vácuo por 5 min, em seguida foi eluída com quatro porções de 5 mL de n-hexano com vazão de 2 gotas s^{-1} . O eluato foi coletado e evaporado até 0,5 mL à temperatura ambiente sob suave corrente de N_2 . A etapa de limpeza consistiu em uma coluna (seringa) igual à da etapa de extração à qual foi adicionada uma porção de 2 g de alumina neutra (desativada com 8% de água) e sulfato de sódio. Os 0,5 mL do extrato da coluna C_{18} foram transferidos para a coluna de alumina neutra e eluída com 20 mL de n-hexano. O eluato foi concentrado até 0,5 mL em temperatura ambiente sob uma vazão suave de nitrogênio. Em resumo, o método descrito pode ser aplicado com sucesso para a análise de 6 PCBs e 19 dos 22 agrotóxicos selecionados. As recuperações variaram entre 74 e 106% para todos os resíduos, exceto β -HCH, endosulfan- β e endosulfan sulfato que não foram completamente satisfatórias, provavelmente devido à sua forte adsorção na coluna de alumina. Os LODs variaram entre 0,02 e 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para OCs, e de 0,06 e 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os

PCBs e os LOQs variaram 0,02 e 0,62 $\mu\text{g L}^{-1}$ para OCs, e 0,07 e 0,12 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os PCBs.

Uma desvantagem geralmente apresentada por estes métodos de extração é o escopo limitado de agrotóxicos que podem ser extraídos sob determinadas condições. Sendo assim, estes procedimentos, podem ser empregados em algumas aplicações, mas estão distantes de serem considerados ideais para um método multiresíduo, (LAMBROPOULOU e ALBANIS, 2007) onde agrotóxicos com uma grande variedade de propriedades químicas (incluindo ácidos, básicos e neutros) podem ser monitorados (WILKOWSKA e BIZIUK, 2011).

Com o objetivo de superar as limitações dos métodos multiresíduos desenvolvidos até então, em 2003, ANASTASSIADES e colaboradores introduziram um novo procedimento de preparo de amostras para extração de resíduos de agrotóxicos denominado QuEChERS. Esse método tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro.

Este método atende as características necessárias para um método multiresíduo, pois além de garantir resultados verdadeiros e precisos, garante baixos limites de detecção para um amplo espectro de analitos, também é capaz de garantir a rapidez de análise, ser fácil de realizar, ser aplicável, com reagentes e aparelhos de baixo custo; permitir a determinação seletiva de analitos e utilizar pequenas quantidades de solventes e reagentes (WILKOWSKA e BIZIUK, 2011).

O método QuEChERS é hoje o método de extração mais aplicado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos, proporcionando recuperações aceitáveis para agrotóxicos ácidos, básicos e neutros (PRESTES *et al.*, 2009).

2.8 Método QuEChERS utilizado para extração de agrotóxicos

ANASTASSIADES e colaboradores (2003a), desenvolveram um método para análise de agrotóxicos em frutas e legumes, denominado QuEChERS original, o qual abrangeu inicialmente a extração com acetonitrila, seguida de uma etapa de extração/partição após a adição de sal e uma etapa de limpeza utilizando extração em fase sólida dispersiva.

Para evitar o uso de co-solventes, que muitas vezes são tóxicos e caros, uma série de experimentos foram realizados durante o desenvolvimento do método QuEChERS com a adição de vários sais que eram destinados a induzir a separação de fases. Estes sais permitem que agrotóxicos de polaridades diferentes possam ser analisados. Entre os vários sais testados, sulfato de magnésio anidro (MgSO_4), mostrou-se eficaz reduzindo o volume da fase aquosa e facilitando a partição de analitos polares para a fase orgânica (devido ao efeito “*salting out*” pois a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa) produzindo maiores recuperações, especialmente dos agrotóxicos muito polares como metamidofós, acefato ou ometoato. Além disso sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento da amostra entre 40 e 45 °C durante as etapas de extração/partição, favorecendo especialmente a extração dos compostos apolares. Variando a quantidade de cloreto de sódio (NaCl) adicionado à amostra durante o particionamento com MgSO_4 , foi possível controlar a polaridade do método e, assim, a quantidade de interferentes no extrato. Experimentos mostraram que uma mistura de 4 g MgSO_4 e 1 g NaCl , (resultando em 0,5 g de sais/g amostra) evitaram a co-extração de alguns interferentes, como por exemplo a frutose (ANASTASSIADES *et al.*, 2003a).

O emprego de acetonitrila como solvente de extração no método QuEChERS proporciona uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra quando se trabalha, como por exemplo, com cereais, gorduras e pigmentos; também, a extração de uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades e, a compatibilidade do extrato final com a Cromatografia Líquida e com a Cromatografia Gasosa (PRESTES *et al.*, 2009).

Sendo a etapa de limpeza, fundamental na análise de resíduos de agrotóxicos, uma vez que reduz as interferências e o efeito matriz (JIMENEZ *et al.*, 2001) além de diminuir a necessidade de manutenção do sistema cromatográfico, um novo método foi desenvolvido juntamente com o método QuEChERS, o qual foi chamado de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*).

A d-SPE é baseada na extração em fase sólida (SPE), mas o sorvente é adicionado diretamente ao extrato, sem necessidade de condicionamento em cartuchos. Devido ao uso de pequenas quantidades de sorvente e por não necessitar o uso de cartuchos, a d-SPE é uma técnica que economiza tempo,

dinheiro, trabalho e também quantidade de solvente, quando comparada à técnica de SPE. Não há a necessidade de nenhuma etapa de condicionamento de cartuchos e também não há problemas de secagem do adsorvente (ANASTASSIADES *et al.*, 2003a).

Neste método, uma alíquota de 1 mL do extrato é colocada em contato com uma mistura contendo 25 mg do sorvente amina primária-secundária (PSA) e 150 mg de sulfato de magnésio. Os sólidos são então separados por centrifugação ou filtração e uma alíquota do extrato final é levada para análise (ANASTASSIADES *et al.*, 2003a). Algumas vezes, na etapa de limpeza do método QuEChERS é conveniente utilizar uma combinação de sorventes, como por exemplo, octadecilsilano (C₁₈) e PSA, dependendo do tipo de matriz utilizada e das propriedades químicas dos agrotóxicos (LEHOTAY *et al.*, 2005a).

As pesquisas de ANASTASSIADES e colaboradores (2003a), foram continuadas por LEHOTAY e colaboradores (2005b), que validaram o procedimento para 229 agrotóxicos em laranja e alface. A extração consistiu em 15 g de amostra e 15 mL de acetonitrila, seguido de agitação por 45 s. Para a etapa de partição foram adicionadas 6 g de MgSO₄ e 1,5 g de NaCl, e novamente agitado por 45 s. GC-MS e LC-MS/MS foram usados para a quantificação, sendo que 89 analitos foram analisados por GC e 140 por LC. Os resultados foram satisfatórios para a maioria dos resíduos dos agrotóxicos investigados, com exceções á aqueles que apresentaram problemas de estabilidade devido ao pH. Em matrizes levemente ácidas, como alface (pH ~ 6), os agrotóxicos sensíveis ao pH alcalino, como captana, folpete, diclofluanida e clorotalonil, foram degradados.

LEHOTAY *et al.* (2005a), realizaram um estudo para melhorar as recuperações dos agrotóxicos sensíveis ao pH do meio, independente da matriz, sem sacrificar as recuperações dos outros agrotóxicos, sendo que neste estudo foi avaliado o efeito do pH durante a etapa de extração, para 32 agrotóxicos de diferentes classes selecionados a partir do estudo realizado por LEHOTAY *et al.* (2005b). Testes foram realizados acidificando a acetonitrila com ácido acético e substituindo o NaCl por acetato de sódio (NaAc) na etapa de partição, sendo que o tamponamento dos extratos entre pH 4 e 5 com ácido acético (pKa = 4,75) e acetato de sódio (NaAc) foi adotado.

O procedimento consistiu em 15 g de amostra, extraída com 15 mL de acetonitrila acidificada com 1% de ácido acético (v/v) e posterior etapa de partição

com 6 g de $MgSO_4$ e 1,5 g de NaAc. Ácido acético e acetato de sódio estão presentes de forma natural em várias frutas e vegetais, portanto, a utilização deste tampão evita que novos reagentes sejam utilizados e que interferências indesejáveis venham a ocorrer. O pH é importante tanto para compostos sensíveis à degradação em meio alcalino, como para aqueles sensíveis em meio ácido como, por exemplo, pimetrozina. Observou-se a faixa ideal de pH entre 4 e 5, uma vez que a mesma proporcionou boas recuperações (> 70%) para agrotóxicos com a estabilidade dependente do pH (LEHOTAY *et al.*, 2005a).

Os excelentes resultados obtidos para frutas e legumes com o método QuEChERS gerou o interesse de LEHOTAY *et al.* (2005c) em aplicá-lo para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos que contenham até 20% de gordura (leite e ovos). Eles reconheceram que alimentos que contêm de 2% a 20% de gordura também podem conter resíduos de agrotóxicos tanto lipofílicos quanto hidrofílicos, e portanto, seria conveniente desenvolver métodos analíticos capazes de determinar simultaneamente analitos com uma ampla gama de polaridade. Esses alimentos incluem o leite, ovos, nozes, milho, soja, trigo e outros grãos, peixes, crustáceos e outros frutos do mar, rins, fígado, aves, carne de porco, carne bovina e abacate. A eficiência de limpeza dos extratos de matrizes gordurosas como ovos, leite, abacate e tecidos animais com o método QuEChERS foi avaliada usando adsorventes como PSA, GCB (Carbono grafitizado, do inglês *Graphitized Carbon Black*) e C_{18} juntamente com a SPE baseado em colunas tradicionais e d-SPE.

A etapa de extração escolhida para o estudo foi a versão QuEChERS modificada (acetato), apresentada por LEHOTAY e colaboradores (2005a). Para a etapa de limpeza a d-SPE foi escolhida, onde 1 mL do extrato orgânico foi transferido para um tubo de centrifuga de 2 mL com 50 mg PSA + 50 mg C_{18} + 150 mg $MgSO_4$ anidro. O extrato foi misturado por 20 s e centrifugado. Esta escolha deve-se ao fato de que apesar da excelente limpeza fornecida pela combinação de C_{18} , PSA, GCB e $MgSO_4$, o GCB retém fortemente agrotóxicos com estrutura planar (por exemplo, o hexaclorobenzeno). No entanto, GCB pode ser empregado para limpeza, se a lista de analitos de interesse não incluir agrotóxicos com estrutura planar. A adição de C_{18} , é justificada pela eficiência na limpeza de matrizes que contém gordura. Apesar da SPE em coluna fornecer melhor limpeza, a d-SPE foi escolhida, pois produziu maiores recuperações além de ser mais fácil, mais barata, mais rápida e requerer menos materiais e equipamentos. O método foi utilizado para

analisar agrotóxicos em amostras de ovo, leite e abacate. O hexaclorobenzeno apresentou recuperações inferiores a 70% para todas as matrizes e esta recuperação diminuiu conforme aumentou o teor de gordura. Para a matriz ovo também não recuperaram clorotalonil e 4,4-DDE. No abacate, clordano, 4,4-DDE, dieldrin, heptacloro epóxido e permetrina também apresentaram recuperações inferiores a 70% (LEHOTAY *et al.*, 2005c).

Outro procedimento que tem sido utilizado para remover gorduras co-extraídas da amostra, é o congelamento seguido de centrifugação. Gorduras, principalmente lipídeos têm pontos de fusão mais altos do que o solvente, de modo que os lipídeos congelados podem ser removidos, enquanto que os agrotóxicos permanecem dissolvidos no solvente (CHUNG e CHEN, 2011). MCLEOD e WALES (1972) usaram precipitação a baixa temperatura para a limpeza de extratos lipídicos na determinação de 13 agrotóxicos organofosforados. A etapa de limpeza por precipitação a baixa temperatura foi realizada utilizando banho de metanol com dióxido de carbono sólido (gelo seco). Os extratos foram mantidos a temperatura de -78 °C por 30 min e em seguida foram passados para outro tubo por filtração e então concentrados sob fluxo de N₂ a 40 °C até atingir de 0,5 a 1,0 mL e depois diluídos até 5 mL com hexano. As determinações foram feitas por GC-ECD e GC-FPD (Cromatografia Gasosa com Detecção Fotométrica de Chama, do inglês *Gas Chromatography with Flame-Photometric Detector*) e as recuperações variaram de 81 a 114%.

HONG *et al.* (2004), utilizaram temperatura de -24 °C para remover lipídeos do extrato de amostras de peixe para analisar agrotóxicos organoclorados. O extrato foi seco e redissolvido em acetonitrila, pois está proporciona baixa solubilidade para lipídeos, em seguida foi armazenado no congelador a -24 °C durante 30 min e então imediatamente filtrado com papel filtro para remover os lipídeos congelados. Após o extrato foi concentrado a 1 mL com evaporador rotativo sob fluxo de N₂ e em seguida realizado procedimento de extração por SPE com florisil como adsorvente. Após a eluição o extrato foi novamente evaporado até 1 mL e então injetado no GC-MS. As recuperações variaram de 78,25 a 115, 24 com RSD de 2,99 e 14,44%, os LODs variaram de 0,5 a 20 µg kg⁻¹.

GOULART e colaboradores (2008) utilizaram precipitação a baixa temperatura para a limpeza de extratos de leite pasteurizado, obtidos a partir de LLE e analisados por GC-ECD. A etapa de limpeza consistiu em deixar o extrato a -20 °C

durante 12 h. A acetonitrila tem temperatura de congelamento de $-46\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, portanto fica líquida juntamente com o material extraído que permanece na fase líquida e podem ser separados da água e da gordura através de filtração com Na_2SO_4 anidro (sulfato de sódio). As recuperações foram de 93% para cipermetrina e 84% para deltametrina e os limites de quantificação foram de $0,75\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ para ambos os agrotóxicos.

No entanto, a solubilidade dos lipídeos em solvente não depende apenas da temperatura, mas também do produto de solubilidade, portanto esta técnica pode remover quantidades significativas de alguns lipídeos, mas certa quantidade pode permanecer no solvente após o congelamento/centrifugação, sendo necessária outra etapa de limpeza (CHUNG e CHEN, 2011).

DAGNAC *et al.* (2009), determinaram 44 agrotóxicos em leite bovino cru por LC-MS/MS. O método de extração foi d-SPE, onde foram testados carbono grafitizado não poroso e C_{18} combinados com MgSO_4 e PSA. Cinco mililitros de leite cru foram diluídos com 5 mL de solvente orgânico (metanol ou acetonitrila) contendo 1% de ácido fórmico (v/v) e a mistura foi agitada por 2 minutos. Após a centrifugação, a fase orgânica sobrenadante foi separada e seca com sulfato de sódio anidro. Posteriormente, o extrato foi colocado em contato com uma mistura dispersiva composta de MgSO_4 , C_{18} e PSA (6/1/1 em g) ou MgSO_4 , GCB e PSA (6/0,1/1 em g). Após agitação e centrifugação, o extrato final foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e reconstituído com 1 mL de metanol. Extratos obtidos a partir da acetonitrila apresentaram resultados superiores ao metanol, e foi então o solvente selecionado para o estudo. C_{18} permitiu médias de recuperações superiores ao GCB e foi portanto a fase sólida dispersiva utilizada no desenvolvimento do método, apresentando recuperações quantitativas com valores acima de 70% para a maioria dos compostos no nível de fortificação de $2\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. O RSD variou de 3 a 20%, sendo que 30 compostos apresentaram RSD inferior a 10%. No nível de fortificação de $4\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ as recuperações variaram de 60 a 113% com RSD entre 1 e 15%.

PRESTES (2011), desenvolveu um método rápido para determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (leite, rim, fígado carne e ovo) por LC-MS/MS, utilizando método de extração QuEChERS modificado. O método consistiu em 10 g de amostra, extraídas com 10 mL de acetonitrila acidificada com 1% de ácido acético (v/v). A etapa de partição foi realizada com 4 g de MgSO_4 e 1,7 g de NaAc, para a etapa de

limpeza, foram utilizados MgSO_4 e C_{18} . Entre agrotóxicos e medicamentos veterinários, 100 compostos foram analisados, destes, salinomicina, quinclozac, fluoroxipir, diclofluanida e 2,4D não puderam ser quantificados em função de apresentarem recuperações inferiores a 70%. No entanto, 83% dos agrotóxicos e 89% dos medicamentos veterinários apresentaram valores de recuperação de 70 a 120% e $\text{RSD} \leq 20\%$ para o nível de fortificação de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (LOQ_m).

BRONDI *et al.* (2011) desenvolveram um método para a determinação de cipermetrina em leite bovino utilizando QuEChERS. O método consistiu em 10 g de amostra que foram extraídas com 10 mL de acetonitrila e para a etapa de partição foram utilizadas 4 g de MgSO_4 e 1g de NaCl. A etapa de limpeza foi realizada com 1 mL de extrato, 50 mg de PSA, 50 mg de C_{18} e 150 mg de MgSO_4 . A quantificação foi realizada por GC-MS no modo de aquisição SIM. As recuperações variaram de 92 a 105% com RSD abaixo de 7% e o LOD e LOQ foi de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $40 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

Claramente o método QuEChERS exige menos etapas (sem a necessidade de etapas de mistura, filtração, evaporação / condensação ou trocas de solvente), isto é muito significativo, pois cada passo adicional complica o processo de análise e é também uma fonte potencial de erros sistemáticos e aleatórios (WILKOWSKA e BIZIUK, 2011).

2.9 Análise de agrotóxicos por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas com analisador quadrupolar.

A característica básica para que se possa analisar um determinado composto por cromatografia gasosa é que este seja volátil ou volatilizável e termicamente estável. A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa) (COLLINS *et al.*, 2006).

A GC pode ser combinada com diferentes tipos de métodos de detecção, dependendo principalmente da classe de agrotóxicos que se deseja analisar, por exemplo, Detector por Captura de Elétrons (ECD) é empregado geralmente para agrotóxicos organoclorados e piretróides, Detector Fotométrico de Chama (FPD)

com filtro de fósforo e Detector Nitrogênio-Fósforo (NPD) tem sido utilizados para a detecção de agrotóxicos organofosforados (LEDOUX, 2011).

Porém, com o desenvolvimento de métodos de extração multiresíduos e utilizando GC-MS, a determinação de resíduos de agrotóxicos de diferentes classes pode ser feita com um único instrumento em uma única corrida cromatográfica. Outra vantagem da GC-MS é que escolhe-se os íons moleculares que se quer monitorar evitando a interferência de materiais co-extraídos da amostra (ALDER *et al.*, 2006).

2.9.1 Modos de ionização utilizados na Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas.

A identificação confirmatória de um composto em uma amostra complexa, analisada por GC, requer informação complementar ao tempo de retenção, e esta complementaridade da análise cromatográfica é obtida com o espectro de massas, que apresenta uma combinação única de fragmentos carregados (íons) gerados durante a dissociação ou fragmentação da molécula previamente ionizada (STASHENKO e MARTÍNEZ, 2009).

A ionização dos pesticidas em GC-MS pode ser realizada utilizando os modos EI (Ionização por elétrons) ou CI (Ionização química) positiva ou negativa.

Ionização por elétrons (EI): As moléculas gasosas que entram na fonte de ionização por elétrons são bombardeadas por elétrons com uma energia de 70 eV. Esta energia é suficiente para ionizar as moléculas ($M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$) e para quebrá-las em pequenos fragmentos. O processo de ionização requer geralmente energia de 12 a 15 eV (HARRIS, 2008). As vantagens da utilização da EI são a baixa influência da estrutura molecular na resposta e o grande número de fragmentos característicos que são gerados. A EI é mais universal, mas muitas vezes a formação de muitos fragmentos resulta em uma baixa intensidade de íons pai (ALDER *et al.*, 2006). A Figura 1 representa uma fonte de ionização por elétrons.

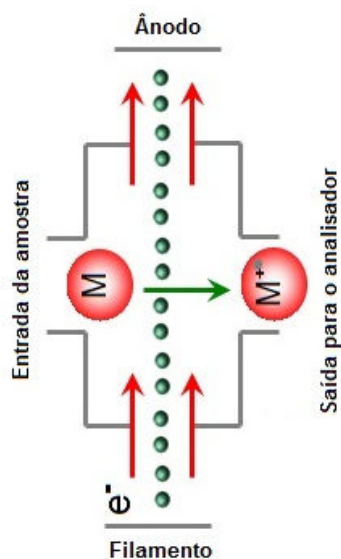


Figura 1: Representação da fonte de ionização por elétrons. Adaptado de LINGEMAN, 2012.

Ionização química (CI): A CI foi desenvolvida especialmente para reduzir as fragmentações associadas à ionização por elétrons. Nesta técnica, as moléculas do analito, em fase gasosa, são introduzidas na câmara de ionização do espectrômetro de massas, que contém um gás reagente (por exemplo, metano, isobutano ou amônia). A mistura das moléculas do analito + gás reagente é bombardeada com elétrons, assim como na EI. Mas, como o gás reagente está em excesso em relação ao analito (geralmente em proporção maior que 1000:1), ele é ionizado quase que exclusivamente e passam a ocorrer reações entre os íons em fase gasosa do gás reagente e as moléculas neutras do analito, dando origem aos íons pseudomoleculares do analito $[M+H]^+$. Por este processo ser relativamente de baixa energia, quase não é observada fragmentação (CHIARADIA *et al.*, 2008).

A ionização química é usada mais raramente apesar de apresentar melhor seletividade para vários compostos (em comparação com EI) e resultar em cromatogramas com reduzida interferência de matriz. Espectros de massas produzidos por ionização química (CI) geralmente contém um número menor de fragmentos, oferecendo assim menos informações. GC-MS com CI é focada preferencialmente para agrotóxicos organohalogenados, piretróides e organofosforados. Por não ser uma técnica de ionização universal, raramente é usada em métodos multiresíduos (ALDER *et al.*, 2006). Por este motivo em análises multiresíduos por GC-MS a EI é mais comumente usada (COSCOLLÀ *et al.*, 2011).

Outro motivo que contribui para a preferência da EI é a disponibilidade de bibliotecas de referência (p. ex. NIST) (ALDER *et al.*, 2006).

2.9.2 Cromatografia Gasosa acoplada á Espectrometria de Massas com analisador quadrupolo

Nos últimos anos a aplicação da espectrometria de massas em série (MS/MS) tem sido considerada uma ferramenta vantajosa, com alta seletividade e alta detectabilidade (COSCOLLÀ *et al.*, 2011). Outra característica da cromatografia acoplada à espectrometria de massas é a capacidade de identificar e quantificar analitos que possuem estruturas diferentes, mas possuem mesmo tempo de retenção.

Na GC-MS, o eluato proveniente da coluna cromatográfica passa pela câmara de ionização do espectrômetro de massas e os íons são acelerados por um potencial de 5 a 100 V antes de entrarem no separador de massas quadrupolar. O separador quadrupolar é constituído de 4 hastes metálicas paralelas, sendo que as hastes opostas estão conectadas eletricamente, um par sendo ligado ao lado positivo de uma fonte de corrente contínua (cc) e o outro par ligado ao terminal negativo. Além disso, são aplicados a cada par de hastes, potenciais de corrente alternada (ca) de radiofrequência variável. Enquanto os íons passam pelas hastes, as voltagens cc e ca são aumentadas simultaneamente, enquanto sua razão é mantida constante. O campo elétrico deflete os íons conforme estes migram da câmara de ionização na direção do detector, permitindo que apenas íons com determinada razão m/z alcancem o detector, outros íons (íons com trajetória instável) colidem com as hastes e se perdem antes de alcançarem o detector (STASHENKO e MARTÍNEZ, 2010). A Figura 2 representa um analisador quadrupolar de massas.

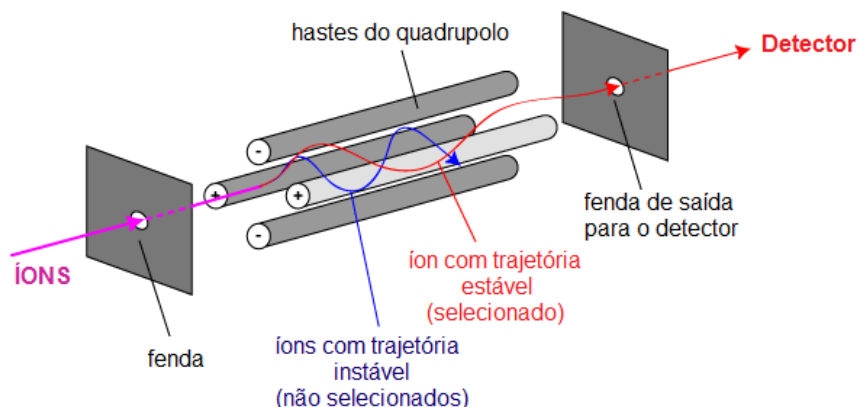


Figura 2: Representação esquemática de um analisador de massas do tipo quadrupolo. Adaptado de CORILO, 2009.

A MS/MS é a técnica espectrométrica que, ao invés de utilizar apenas um analisador de massas para separar os íons de mesma razão m/z gerados na fonte de ionização, utiliza dois estágios de espectrometria de massas, em que um deles é usado para isolar o íon de interesse e o outro é usado para estabelecer uma relação entre este íon de interesse isolado e outros íons que foram gerados a partir da sua decomposição induzida (CHIARADIA *et al.*, 2008).

O espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (QqQ) é formado pela junção de três quadrupolos em seqüência, ou seja, dois analisadores do tipo quadrupolo que tem entre eles uma cela de colisão. No primeiro (Q1), o íon de interesse é separado da corrente de íons vinda da fonte de íons. No segundo (Q2), este íon sofre nova fragmentação por colisão com íons de N_2 ou Ar. Os fragmentos desta colisão são analisados no terceiro quadrupolo (Q3), que seleciona os íons formados para enviar ao detector (STASHENKO e MARTÍNEZ, 2010). A Figura 3 demonstra a representação de um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo.

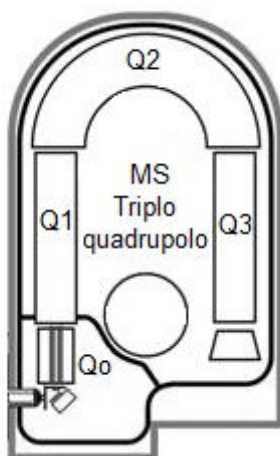


Figura 3: Representação de um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo. Adaptado de SCOTT, 2008.

Vários autores tem utilizado a GC-MS/MS com analisador QqQ para a determinação de agrotóxicos em diferentes matrizes, tais como frutas e vegetais (PAYÁ *et al.*, 2007), solo (RASHID *et al.*, 2010), água (PITARCH *et al.*, 2007), alimentação animal (WALORCZYK, 2008), gordura de porco, óleo de peixe, óleo vegetal hidrogenado e azeite de oliva (PATEL *et al.*, 2005) e leite (TSIPLAKOU *et al.*, 2010).

2.9.3 Técnicas utilizadas para a obtenção de espectros de massas

Varredura completa (*full scan*): neste modo de operação pode-se analisar toda a faixa de razão m/z do espectrômetro de massas ou uma faixa determinada. Na maioria das vezes a massa mínima estabelecida para a varredura completa é m/z 50 e a máxima deve corresponder ao peso molecular da substância mais pesada que suspeita-se estar presente na amostra, mais 50 unidades (STASHENKO e MARTÍNEZ, 2009). O espectro de massas contendo todos os íons produzidos pelo espectrômetro de massas é denominado “cromatograma de íons totais” (TIC do inglês, *total ion chromatogram*) (CHIARADIA *et al.*, 2008).

Varredura dos íons produzidos (“product-ion scan”): neste modo de operação, considerando-se um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo, no primeiro

estágio (Q1) é isolado o íon de interesse que, em seguida, é fragmentado na cela de colisão (Q2). No segundo estágio do espectrômetro de massas (Q3) é feita a varredura dos íons produzidos a partir da fragmentação do íon de interesse isolado em Q1 para obtenção do espectro de massas (CHIARADIA *et al.*, 2008).

Varredura do íon precursor (“precursor-ion scan”): no triplo quadrupolo, este tipo de varredura é realizado quando o Q1 é ajustado para transmitir íons dentro de um intervalo de m/z de interesse, os quais são fragmentados na cela de colisão (Q2), para que em Q3 sejam transmitidos íons de uma única razão m/z (íon produto de fragmentação). O sinal só é gerado no detector quando Q1 e Q3 estão transmitindo, isto é, quando um íon transmitido por Q1 se fragmenta na cela de colisão gerando o íon produto selecionado que atravessa Q3 (CHIARADIA *et al.*, 2008).

Monitoramento de íon selecionado (SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring*): após a ionização o Q1 monitora um ou vários íons selecionados (usualmente 2 a 3), típicos do analito de interesse. Os outros quadrupolos Q2 e Q3 só transmitem estes íons filtrados pelo Q1. A razão sinal/ruído no monitoramento de íons selecionados é maior do que a razão sinal/ruído num cromatograma de varredura, pois a maioria do tempo de aquisição espectral é gasto fazendo a aquisição de dados de cada íon selecionado (STASHENKO e MARTÍNEZ, 2010).

Monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *Multiple reaction monitoring*): quando um espectrômetro de massas triplo quadrupolo é usado, uma mistura de íons entra no Q1, que libera apenas um íon precursor selecionado para o Q2. Enquanto está dentro da célula de colisão (Q2), o íon precursor colide com moléculas de N_2 ou Ar em uma pressão de $\sim 10^{-8}$ a 10^{-6} bar e se fragmenta, formando os íons produto. O Q3 permite que somente determinados íons produto passem para o detector (STASHENKO e MARTÍNEZ, 2010).

Dependendo do modo de aquisição, o espectrômetro de massas pode funcionar como um sistema de detecção universal, seletivo ou específico. A transmissão e o registro de todos os íons que emergem da câmara de ionização, chamada de modo *full scan* permite o funcionamento do espectrômetro de massas como detector cromatográfico universal, neste modo de detecção é comum ocorrer co-eluição. Quando no espectro de massas de uma substância registra unicamente alguns íons característicos (pré-selecionados), as correntes iônicas parciais processadas em função do tempo são denominadas fragmentogramas de massas e

nestes aparecem os picos cromatográficos das substâncias de interesse, este modo de aquisição é conhecido como Monitoramento de Íons Seleccionados (SIM) e o detector de massas neste caso é considerado seletivo. Para o detector de massas ser considerado específico é necessário a utilização de espectrômetros de massa em série, para que se possa monitorar transições específicas de cada analito (STASHENKO e MARTÍNEZ, 2010).

2.10 Efeito matriz

Durante as análises cromatográficas os componentes da matriz contidos nos extratos podem influenciar na quantificação dos analitos de interesse, gerando resultados duvidosos (PINHO *et al.*, 2010). Este fenômeno é denominado efeito matriz (HAJSLOVA *et al.*, 1998).

O efeito matriz pode ser observado pela significativa diferença de resposta obtida em padrões preparados no solvente daqueles preparados no extrato da matriz, e quando uma boa precisão é obtida, diz-se que o efeito foi eliminado ou compensado (PICÓ *et al.*, 2004).

O efeito de redução/valorização do sinal pode afetar drasticamente a identificação e a quantificação de resíduos de agrotóxicos pois, a resposta dos analitos em solução padrão preparada no solvente e aqueles preparados no extrato da amostra real diferem significativamente como consequência da ausência/presença de componentes da matriz durante a ionização do analito (SOLER *et al.*, 2007).

A presença de co-extrativos tem uma grande influência sobre a precisão, exatidão, bem como sobre a sensibilidade dos métodos analíticos. A presença da matriz pode levar a elevadas ou baixas taxas de recuperações e a altos limites de detecção e quantificação. O efeito matriz para alimentos que apresentam níveis significativos de gordura tem sido relacionados em alguns casos com baixas recuperações de determinados resíduos (ARGAUER *et al.*, 1997; PRZYBYLSKI *et al.*, 2009).

Na GC, esses problemas causados por componentes da matriz podem ocorrer tanto no injetor, na coluna e no detector (HERCEGOVA *et al.*, 2007). Usando a detecção com métodos como ECD, FPD e NPD a co-eluição de componentes da

matriz com resíduos de agrotóxicos pode resultar em problemas como o mascaramento de pico do analito (resultado falso negativo), identificação de impurezas como analitos (resultado falso positivo), aumento no sinal de detector (resultado superestimado) e extinção do sinal de detector (resultado subestimado) (HAJSLOVÁ *et al.*, 2003). A Espectrometria de Massas (MS) superou alguns desses problemas, devido a maior especificidade com base na estrutura molecular do analito, mas alguns inconvenientes ainda permanecem, por exemplo, componentes da matriz podem induzir a diminuição do sinal correspondente a uma substância através da diminuição do potencial de ionização (PRZYBYLSKI *et al.*, 2009).

Calibração com matriz de correspondência e adição de analitos protetores têm sido propostos para mascarar os sítios ativos e limitar os efeitos da matriz (LEDOUX, 2011). Na calibração com matriz de correspondência os padrões são preparados em uma solução que corresponde ao nível mais próximo possível da composição da amostra que está sendo utilizada. Padrões de calibração na matriz são preparados por adição de agrotóxicos puros nos extratos brancos (LEDOUX, 2011). No entanto, este método para eliminar o efeito matriz apresenta como inconveniente a dificuldade na obtenção de matrizes totalmente livres de resíduos para cada tipo de alimento (DI BELLA *et al.*, 2006) e, alternativamente, extratos brancos representativos para um intervalo definido de alimentos de origem animal (PICÓ *et al.*, 2006).

Quando uma amostra real é injetada, componentes da matriz tendem a bloquear os sítios ativos (principalmente grupos silanol livres) na entrada da coluna do GC, reduzindo assim as perdas de analitos causadas por adsorção ou degradação. Este fenômeno resulta em sinais maiores para analitos que se encontram no extrato da matriz do que os sinais dos mesmos analitos quando estes se encontram em soluções livres de matriz (solvente), o que impede o uso de padrões de calibração preparados apenas no solvente, pois levaria a super estimativas das concentrações encontradas nas amostras analisadas. A adição dos analitos protetores, faz com que ocorra um aumento na resposta das soluções preparadas somente no solvente, podendo estas serem usadas para a construção da curva de calibração, uma vez que matriz de correspondência livre de contaminações é muitas vezes difícil de ser encontrada. Os analitos protetores são compostos que interagem fortemente com os sítios ativos do sistema

cromatográfico, diminuindo a degradação e/ou adsorção dos analitos de interesse (MASTOVSKÁ *et al.*, 2005).

Em 2003, ANASTASSIADES e colaboradores reintroduziram o uso de analitos protetores para compensar o efeito matriz, utilizando compostos ou misturas de compostos que imitavam o comportamento da matriz. Eles avaliaram 93 compostos como analitos protetores para análise de 30 agrotóxicos. Os analitos protetores selecionados foram açúcares e seus derivados (poliidroxilados), ácidos carboxílicos, aminoácidos, compostos alifáticos como o dodecano, compostos básicos como a uréia, etc. Soluções padrão de agrotóxicos foram preparadas em solvente puro, adicionando-se baixa concentração de aditivos (analitos protetores) capazes de interagir fortemente com a interface, como através de ligações de hidrogênio com os grupos silanóis do insertor. Esses analitos protetores devem ter volatilidade similar à dos agrotóxicos, impedindo a adsorção destes durante a análise da solução padrão, assim como ocorre nos extratos. Uma substância é considerada um bom analito protetor se a sua eficiência for independente da natureza da matriz, for solúvel no solvente da solução padrão, não reagir com os agrotóxicos de interesse, não se acumular no sistema cromatográfico e não apresentar o mesmo tempo de retenção dos analitos. Esses compostos devem apresentar grupos polares, como hidroxilas, carboxilas, grupos nitrogenados, etc., para que, ao competirem com os agrotóxicos, sejam predominantemente adsorvidos no insertor (ANASTASSIADES *et al.*, 2003b).

No entanto, para compensar efetivamente o aumento da resposta induzida pelo efeito matriz em métodos multiresíduos utilizando GC, os analitos protetores devem induzir o aumento da resposta para toda a gama de analitos. Portanto, para atender a necessidade de métodos multiresíduos de análises é necessária a combinação adequada de vários analitos protetores (MASTOVSKÁ *et al.*, 2005).

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.). Esse efeito é mais significativo na análise de agrotóxicos quando estes se encontram em concentrações mais baixas ou quando a proporção matriz/analito é muito alta (PINHO *et al.*, 2009).

Quando a intensidade do efeito matriz for maior que 10%, considera-se que o efeito matriz começa a exercer influência nas análises (ZROSTLIKOVA *et al.*, 2001). Neste caso, recomenda-se a construção das curvas analíticas no extrato da matriz.

2.11 Validação de método

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis com relação a uma amostra, este deve ser submetido a uma avaliação analítica denominada validação (RIBANI *et al.*, 2004).

A validação de um método é uma exigência na prática das análises químicas, sendo que o método desenvolvido deve ser devidamente validado de forma apropriada, antes de ser utilizado (ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005), e tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, garantindo, através de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003).

De acordo com LANÇAS (2004), validação é o ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal. Visa a diminuir os fatores que levam a imprecisão ou inexatidão de um dado gerado.

O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. As figuras de mérito são os indicadores quantitativos do escopo e do bom desempenho das técnicas, e são descritas como: curva analítica e determinação da sua faixa de linearidade, seletividade, sensibilidade do método, representada pelos Limites de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ), precisão, exatidão e robustez (RIBEIRO e FERREIRA, 2008).

2.11.1 Curva analítica e linearidade

A curva analítica é a ferramenta de quantificação mais freqüentemente utilizada e corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental (área/altura da banda cromatográfica) (eixo y) e a

concentração do analito (eixo x). Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

A relação entre as variáveis x e y produz uma equação de regressão linear $y = ax + b$, que relaciona as duas variáveis e gera os coeficientes de regressão **a** (inclinação da curva) e **b** (interseção da curva analítica com o eixo y, quando $x = 0$). Também é possível calcular a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação **r**, que permite estimar a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Em qualquer técnica instrumental a relação linear descrita pela equação $y = ax + b$ só é válida para um intervalo determinado de concentração do analito (RIBANI *et al.*, 2004). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e o Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2003) recomendam valores de **r** iguais ou superiores a 0,99 e 0,90, respectivamente.

A linearidade de um método analítico pode ser definida como sendo a habilidade deste método em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma determinada faixa de concentração (INMETRO, 2007). Na prática, a linearidade é determinada através da curva analítica (LANÇAS, 2004).

É necessário o uso de um número suficiente de soluções analíticas para definir adequadamente a faixa linear na relação entre a concentração e a resposta (BRITO *et al.*, 2003). A ANVISA (2003) especifica um mínimo de cinco níveis de concentração.

A faixa linear de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições específicas do ensaio. A faixa linear é definida como sendo a faixa de concentração na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico (INMETRO, 2007).

Segundo o INMETRO (2007) a faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e apresentar, de preferência, mais que seis pontos de calibração. A concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. Os valores medidos próximos

ao limite inferior da faixa de trabalho devem ser distinguidos dos brancos dos métodos, sendo, portanto, igual ou maior do que o limite de detecção do método.

2.11.2 Seletividade

Uma amostra, de maneira geral, consiste dos analitos a serem medidos, da matriz e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer quantificar. A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico (INMETRO, 2007). A seletividade corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis de interferirem na determinação (LANÇAS, 2004).

A seletividade é um parâmetro de grande importância na análise de amostras complexas, como resíduos de agrotóxicos em alimentos. Em geral, uma forma simples de verificar a seletividade de um método cromatográfico é observar a presença de picos na região do tempo de retenção do analito de interesse injetando-se um branco obtido com a mesma matriz a ser analisada. Entretanto, para matrizes complexas, somente esse critério poderá não ser suficiente para atestar a seletividade do método. Deve-se ainda, demonstrar que o pico observado no tempo de retenção do analito de interesse possui apenas o componente, ou seja, é realmente o analito procurado. Isso é importante em decorrência da possibilidade de co-eluição do composto com outros interferentes. Atualmente a forma mais segura de minimizar efeitos causados por co-eluição é a utilização de um espectrômetro de massas como detector em cromatografia (LANÇAS, 2004).

2.11.3 Sensibilidade

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pela inclinação da curva analítica, sendo determinada simultaneamente aos testes de linearidade. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada (INMETRO, 2007). No caso de uma reta, quanto maior for o ângulo de inclinação da

reta, mais sensível será o método. A sensibilidade de um método indica sua capacidade de discriminar concentrações próximas de um analito. (LANÇAS, 2004).

2.11.4 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

O limite de detecção (LOD) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato. Na prática o LOD é determinado como a menor concentração do analito que pode ser diferenciada do ruído do sistema com segurança. O ruído (N) é a amplitude da linha base, a qual inclui todas as variações do sinal do detector cuja amplitude esteja na ordem de um ou mais ciclos por minuto (LANÇAS, 2004).

O LOD pode ser calculado de três formas diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica.

Método visual: utiliza a matriz com adição de concentração conhecida da substância de interesse, de tal modo que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (RIBANI *et al.*, 2004).

Método da relação sinal ruído: é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco desta amostra. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção (RIBANI *et al.*, 2004).

Método baseado em parâmetros da curva analítica: pode ser expresso conforme a Equação 1:

$$LOD = 3,3 x \frac{s}{S} \quad (1)$$

onde, s é a estimativa do desvio padrão do branco ou do coeficiente linear da equação e S é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica. Para calcular estes dados, uma curva analítica deve ser feita utilizando a matriz contendo o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção (RIBANI *et al.*, 2004).

O limite de quantificação (LOQ) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão (LANÇAS, 2004). Os mesmos critérios de LOD podem ser adotados para o LOQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LOQ pode ser calculado utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta (s) (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação) e a inclinação da curva analítica (S), em níveis próximos ao LOQ, a partir da Equação 2:

$$LOQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (2)$$

2.11.5 Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. A precisão é avaliada pelo desvio-padrão e normalmente é expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) (INMETRO, 2007).

Em métodos de análise de traços, são aceitos RSD de até 20% (RIBANI *et al.*, 2004).

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

Repetitividade: é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, ou seja, mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmo equipamento utilizado sob as mesmas condições de análise, mesmo local e repetições do ensaio em curto espaço de tempo (INMETRO, 2007). Para repetitividade, o INMETRO (2007) recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão.

Precisão intermediária: refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), como por exemplo: diferentes analistas, diferentes equipamentos, e diferentes dias de análise

(INMETRO, 2007). A precisão intermediária é reconhecida como a forma mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que, no mesmo laboratório, o método fornecerá os mesmos resultados. Esta medida de precisão pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) (RIBANI *et al.*, 2004).

Reprodutibilidade: é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas de análise (mudança de operador, local, equipamentos, etc). Geralmente é obtida através de estudo de colaboração entre laboratórios (RIBANI *et al.*, 2004). Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial (INMETRO, 2007).

2.11.6 Exatidão

A exatidão expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou aceito como referência (LANÇAS, 2004).

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência certificados, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007). Sempre que possível, os materiais de referência certificados devem ser utilizados no processo de validação de um método de ensaio (INMETRO, 2007).

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras as quais foram adicionadas quantidades conhecidas do mesmo. Os analitos podem ser adicionados as amostras em pelo menos três diferentes níveis de concentrações, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima a média da faixa de uso do método. A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que o presente na amostra. A presença de

analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação (INMETRO, 2007).

A recuperação é calculada segundo a Equação 3:

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

onde:

C₁= concentração determinada na amostra adicionada;

C₂= concentração determinada na amostra não adicionada;

C₃= concentração adicionada.

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão. Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (RIBANI *et al.*, 2004).

O intervalo aceitável de recuperação para a análise de resíduos geralmente é entre 70 e 120%, com precisão de até ± 20% (SANCO, 2009). Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até ± 15% (RIBANI *et al.*, 2004).

2.11.7 Robustez

A robustez é uma medida de capacidade de um método de não sofrer alterações em decorrência de pequenas variações (LANÇAS, 2004). A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em HPLC, programação de temperatura, natureza do gás de arraste em GC, bem como o tempo de extração, agitação, etc (RIBANI *et al.*, 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu na otimização e validação do método QuEChERS modificado para a extração de resíduos de agrotóxicos em leite bovino integral e quantificação por GC-MS/MS.

Os parâmetros analíticos avaliados na etapa de validação foram: linearidade, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e efeito matriz.

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

3.1 Instrumentação

- ✓ Agitador vortex Biomixer, modelo QL-901- (Brasil);
 - ✓ Balança analítica AND, modelo SV-200 - (Japão)-;
 - ✓ Balança analítica Shimadzu, modelo UX420H - (Japão);
 - ✓ Balança analítica Shimadzu, modelo AUW 220D - (Japão);
 - ✓ Centrífuga refrigerada Nova Técnica, modelo NT 825, com rotação max. 3500 rpm - (Brasil);
 - ✓ Centrífuga refrigerada SOLAB, modelo SL 703, com rotação max. 10000 rpm - (Brasil);
 - ✓ Purificador de água Milli-Q Direct 3UV - resistividade 18,2 M Ω cm - (França);
 - ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável, marca Brand - (Alemanha) e marca Eppendorf - (Canadá);
- Sistema GC-MS/MS (QqQ) (Figura 4) equipado com:
- ✓ Cromatógrafo a gás Varian, modelo CP 3800 - (EUA);
 - ✓ Amostrador automático Varian, modelo CP 8400 - (EUA);
 - ✓ Injetor Varian, modelo 1079 (PTV), com insersor de vidro silanizado, d.i. de 3,4 mm - (EUA), contendo cerca de 0,5 cm de carbofrita;

- ✓ Coluna capilar Varian, modelo CP VF-5-MS (5% fenil 95% metilpolisiloxano), de sílica fundida, nas dimensões 30,0 m de comprimento, 0,25 mm de d.i. e 0,25 µm de espessura de filme - (EUA);
- ✓ Detector MS Triplo Quadrupolo Varian, modelo 1200, atuando no modo MRM - (EUA);
- ✓ Sistema de aquisição de dados através do *software* MS *Workstation* 6.4 (Varian, EUA).



Figura 4: Sistema GC-MS/MS utilizado para o desenvolvimento deste trabalho.

3.2 Gases

- ✓ Hélio 99,9997% de pureza (Air Products, Brasil);
- ✓ Argônio 99,9992% de pureza (Air Liquid, Brasil).

3.3 Materiais

- ✓ Tubos *ependorf* de 2,0 mL;
- ✓ Tubos de polipropileno de fundo cônico, com tampas de rosquear, capacidade de 50 e 15 mL;
- ✓ Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 mL;
- ✓ *Insert* de vidro;

- ✓ Filtro de *nylon* para seringa (13 mm de diâmetro e 0,2 µm de porosidade)
- ✓ Vidraria comum de laboratório;
- ✓ Gelo seco.

3.4 Reagentes e solventes

- ✓ Acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker - EUA);
- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct 3UV (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro (J.T. Baker - Japão);
- ✓ Acetato de sódio anidro (J.T. Baker - México);
- ✓ Ácido acético glacial, grau HPLC (J.T. Baker - EUA);
- ✓ Cloreto de sódio (J.T. Baker - EUA);
- ✓ Amina primária secundária (PSA) com tamanho de partículas de 40 µm – Bondesil (Agilent Technologies - EUA);
- ✓ Octadecilsilano (C₁₈) com tamanho de partículas de 40 µm – Bondesil (Agilent Technologies - EUA);
- ✓ Padrões sólidos dos agrotóxicos, adquiridos da firma Dr. Ehrenstorfer, Alemanha, conforme Tabela 6.

3.5 Padrões analíticos dos agrotóxicos analisados

A Tabela 6 lista algumas informações sobre os compostos analisados neste estudo, como: pureza, classe, grupo químico e fórmula molecular.

Tabela 6: Relação dos compostos em estudo, com informações de pureza, classe, grupo químico e fórmula molecular.

Analitos	Pureza (%)	Classe	Grupo Químico	Fórmula Molecular*
4,4-DDE	98,5	P.D.	Organoclorado	C ₁₄ H ₈ Cl ₄
Alacloro	99,5	H	Cloroacetamida	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂
Aldrin	97,0	I	Organoclorado	C ₁₂ H ₈ Cl ₆
Azoxistrobina	99,5	F	Metoxicrilato	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅
Bifentrina	95,5	I, A	Piretróide	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂
Carbofuran	98,5	I, N	Carbamato	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃

Analitos	Pureza (%)	Classe	Grupo Químico	Fórmula Molecular*
Cialotrina lambda	98,0	I	Piretróide	C ₂₃ H ₁₉ ClF ₃ NO ₃
Ciflutrina	98,5	I	Piretróide	C ₂₂ H ₁₈ Cl ₂ FNO ₃
Cipermetrina	92,0	I	Piretróide	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃
Clorpirifós etílico	99,5	I	Organofosforado	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Clorpirifós metílico	97,5	I, A	Organofosforado	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS
DDT	99,0	I	Organoclorado	C ₁₄ H ₉ Cl ₅
Deltametrina	99,0	I	Piretróide	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃
Diazinona	96,0	I, A	Organofosforado	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS
Dicofol	98,8	A	Organoclorado	C ₁₄ H ₉ Cl ₅ O
Dieldrin	97,5	I	Organoclorado	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O
Difenoconazole	99,0	F	Triazole	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃
Endosulfan alfa	96,0	I, A	Ciclodieno	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S
Endosulfan beta	98,0	I, A	Ciclodieno	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S
Endosulfan sulfato	99,5	P.D.	Ciclodieno	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₄ S
Endrin	99,5	I,R	Organoclorado	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O
Epoxiconazole	97,5	F	Triazole	C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O
Esfenvalerato	98,0	I	Piretróide	C ₂₅ H ₂₂ ClNO ₃
Fenitrotiona	97,5	I	Organofosforado	C ₉ H ₁₂ NO ₅ PS
Fenvalerato	98,0	I, A	Piretróide	C ₂₅ H ₂₂ ClNO ₃
HCH, alfa	97,5	I	Organoclorado	C ₆ H ₆ Cl ₆
HCH, delta	98,4	I	Organoclorado	C ₆ H ₆ Cl ₆
Hepacloro-epox. endo	99,0	P.D.	Organoclorado	C ₁₀ H ₅ Cl ₇ O
Hepacloro-epox. exo	99,0	P.D.	Organoclorado	C ₁₀ H ₅ Cl ₇ O
Heptacloro	98,5	I	Organoclorado	C ₁₀ H ₅ Cl ₇
Hexaclorobenzeno	99,5	F	Organoclorado	C ₆ Cl ₆
Lindano	99,0	I, A	Organoclorado	C ₆ H ₆ Cl ₆
Malationa	99,0	I, A	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂
Metidationa	99,0	I, A	Organofosforado	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃
Miclobutanil	99,5	F	Triazole	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄
Mirex	99,0	I	Organoclorado	C ₁₀ Cl ₁₂
Parationa etílica	99,5	I, A	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₄ NO ₅ PS
Parationa metílica	98,5	I	Organofosforado	C ₈ H ₁₀ NO ₅ PS
Permetrina	94,0	I	Piretróide	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃
Pirazofós	97,0	F	Fosfotiazole	C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₅ PS
Pirimifós etílico	98,5	I	Organofosforado	C ₁₃ H ₂₄ N ₃ O ₃ PS
Pirimifós metílico	99,0	I, A	Organofosforado	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS
Procimidona	98,0	F	Dicarboximida	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂
Propiconazole	97,5	F	Triazole	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂
Propoxur	99,0	I	Carbamato	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃
Quintozeno (PI)	96,0	F	Cloronitrofenil	C ₆ Cl ₅ NO ₂
Tetradifona	99,0	A	Clorodifenilsulfona	C ₁₂ H ₆ Cl ₄ O ₂ S
Triclorfon	97,0	I	Organofosforado	C ₄ H ₈ Cl ₃ O ₄ P
Trifenilfosfato (PI)	99,0	-	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₅ O ₄ P
Trifluralina	97,5	H	Dinitroanilina	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄
Trifluralina d-14 (PS)	99,1	-	-	C ₁₃ H ₂ F ₃ N ₃ O ₄ D ₁₄

* As estruturas moleculares destes compostos estão apresentadas no Anexo A.

A: acaricida; F: fungicida; H: herbicida; I: inseticida; N: nematocida; R: rodenticida; P.D.: produto de degradação; PI: padrão interno e PS: padrão de substituição.

Preparou-se individualmente 10 mL da solução analítica estoque 1000 mg L^{-1} de cada agrotóxico considerando a pureza dos padrões sólidos. A massa do padrão sólido pesado foi dissolvida em acetonitrila grau HPLC, as soluções estoque foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura de $-18 \text{ }^\circ\text{C}$. Após foram preparadas soluções analíticas individuais de cada composto em estudo, na concentração de $100,0 \text{ mg L}^{-1}$, em acetonitrila. A partir destas soluções, preparou-se uma mistura na concentração $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ contendo todos os compostos (em acetonitrila). A partir da solução padrão $10,0 \text{ mg L}^{-1}$, preparou-se uma mistura na concentração $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

O padrão de substituição, bem como os padrões internos foram preparados separadamente e na concentração de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$. O padrão de substituição foi adicionado antes do procedimento de extração e na quantidade de $25 \text{ } \mu\text{L}$. Os padrões internos foram adicionados em $400 \text{ } \mu\text{L}$ do extrato final, na quantidade de $10 \text{ } \mu\text{L}$.

Para injeção no sistema GC-MS/MS, as soluções analíticas foram preparadas nas concentrações de 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0; 150,0 e $200,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para todos os compostos, em acetonitrila e no extrato da matriz (leite).

3.6 Amostra utilizada como branco

A amostra “branco” de leite utilizada neste estudo foi adquirida em um supermercado de Santa Maria. A amostra consistiu em leite UHT do tipo integral, com teor de gordura de 3,0 %. Depois de aberta a amostra foi acondicionada em frascos de 250 mL com tampa e armazenados em freezer (abaixo de $-10 \text{ }^\circ\text{C}$). Para utilizações posteriores, foi esperado que a mesma atingisse a temperatura ambiente e a homogeneização da amostra antes da utilização foi feita por forte agitação manual por 30 s.

3.7 Padrão interno (PI) e padrão de substituição (PS)

Padrão interno (PI) e de substituição (*surrogate*) (PS) são definidos como um composto ou elemento puro adicionado ao material teste (amostra), sendo que o

comportamento físico e químico deve ser representativo da substância de interesse (CUADROS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

Os compostos escolhidos para serem utilizados como PI e PS, devem apresentar características semelhantes aos agrotóxicos a serem analisados e não estarem presentes nas amostras (KOLBERG, 2008).

Neste trabalho quintozeno e trifenilfosfato foram utilizados como PI, os quais foram adicionados aos extratos finais com a intenção de avaliar a estabilidade do sistema cromatográfico.

O PS utilizado foi a trifluralina-d14, um composto isotopicamente modificado que não é encontrado naturalmente no meio ambiente. O PS foi adicionado na amostra antes do procedimento de extração, com a finalidade de verificar a eficiência do procedimento de extração e limpeza.

3.8 Otimização das condições do Espectrômetro de Massas

A otimização das condições utilizadas para a detecção, foi realizada com o intuito de conseguir a máxima detectabilidade, seletividade e os menores LODs e LOQs.

Inicialmente, soluções individuais dos compostos em estudo foram preparadas na concentração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ e injetadas no GC-MS/MS no modo de detecção *full scan*, ou seja, realizando varredura de 50 a 500 m/z no modo de ionização EI. Para cada um dos compostos foram identificados e selecionados os íons característicos formados na fragmentação.

Posteriormente, uma solução padrão contendo todos os compostos na concentração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ foi injetada e a detecção foi realizada no modo de monitoramento de íon selecionado (SIM), monitorando cada um dos íons selecionados na etapa anterior. Sendo que o íon que apresentou maior intensidade foi escolhido para a próxima etapa.

No Q1 foi isolado o íon de interesse, que posteriormente foi fragmentado na cela de colisão (Q2). No segundo estágio do espectrômetro de massas (Q3) foi feita a varredura dos íons produzidos a partir da fragmentação do íon de interesse que foi isolado no Q1. A varredura no Q3 foi feita monitorando-se os íons entre 50 m/z e a

m/z do íon molecular obtido na fragmentação inicial, para cada um dos compostos foi utilizado variações da energia de colisão dentro da faixa de 5 a 45 V.

As injeções foram repetidas variando a energia de colisão até obter a maior intensidade de sinal para os íons produto de interesse e até obter a completa fragmentação do íon precursor. E posteriormente foram programadas as massas dos íons produto no Q3 para cada transição monitorada (MRM).

3.9 Otimização do método QuEChERS modificado para análise de agrotóxicos em leite bovino

O método de extração otimizado neste trabalho foi basicamente o método QuEChERS modificado, proposto por PRESTES (2011) para a determinação simultânea de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal com determinação por LC-MS/MS. Neste trabalho o método foi otimizado para a extração de compostos que apresentam características que os tornam passíveis de serem analisados por GC, e a realização de testes com menor quantidade de amostra teve como finalidade avaliar a possibilidade de redução na quantidade de sais e solvente de extração.

Para a etapa de limpeza foram realizados testes com a intenção de diminuir interferentes co-extraídos da matriz e também com a finalidade de avaliar a possibilidade de redução na quantidade de extrato e consequentemente de sal secante e sorventes.

A diminuição de sais, sorventes e solvente durante as etapas de extração e limpeza, foram avaliadas visando diminuir os gastos e minimizar os impactos ambientais.

No entanto, foram realizados alguns testes anteriores à otimização do método de análise para a matriz em questão, sendo esta uma importante etapa da análise para obtenção de resultados confiáveis. Todos os testes foram realizados no nível de fortificação $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Na Tabela 7 estão descritos os testes realizados durante a etapa de validação do método.

Tabela 7: Relação dos diferentes ensaios realizados para os compostos analisados neste trabalho para escolha do melhor método de análise.

Extração	Teste	Limpeza
5 mL de amostra + 5 mL de MeCN acidificada com 1% de CH ₃ COOH (v/v) → agitação manual por 1 min + 2,0 g MgSO ₄ anidro + 0,85 g CH ₃ COONa → agitação manual por 1 min → centrifugação a 3400 rpm/8 min	T1	1mL extrato + 0,150 g MgSO ₄ + 0,125 g C ₁₈ → 1 min agitação manual → centrifugação a 10000 rpm /3 min
	T2	1mL extrato + 0,150 g MgSO ₄ + 0,125 g C ₁₈ + 0,062 g PSA → 1 min agitação manual → centrifugação a 10000 rpm /3 min
	T3	1mL extrato + 0,150 g MgSO ₄ + 0,125 g C ₁₈ + 0,062 g PSA → 1 min agitação manual → banho de gelo seco* por 2 min → centrifugação a 10000 rpm /3 min
	T4	A) 2,0 mL de extrato em banho de gelo seco* por 2 min e em seguida centrifugados a 3500 rpm/3 min B) 1mL extrato + 0,150 g MgSO ₄ anidro + 0,125 g C ₁₈ → 1 min agitação manual → centrifugação a 10000 rpm /3 min
	T5	1mL de extrato em banho de gelo seco* por 2 min + 0,150 g MgSO ₄ + 0,125 g C ₁₈ → 1 min agitação manual → centrifugação a 10000 rpm /3 min
	Fort. no extrato branco	T6 1mL de extrato em banho de gelo seco* por 2 min + 0,150 g MgSO ₄ + 0,125 g C ₁₈ → 1 min agitação manual → centrifugação a 10000 rpm /3 min
	Fort. no extrato branco	T7 1mL extrato + 0,150 g MgSO ₄ + 0,125 g C ₁₈ + 0,062 g PSA → 1 min agitação manual → centrifugação a 10000 rpm /3 min
	T8	1mL extrato + 0,150 g MgSO ₄ anidro + 0,125 g C ₁₈ + 0,062 g PSA → 1 min agitação manual → centrifugação a 10000 rpm /3 min

* banho de gelo seco = gelo seco + álcool etílico (temperatura aproximada de -73 °C) (BENDASSOLLI *et al.*, 2002).

3.10 Validação do método QuEChERS modificado para análise de agrotóxicos em leite bovino empregando GC-MS/MS

O método QuEChERS modificado foi validado e os seguintes parâmetros foram avaliados: curva analítica e linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão (recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e efeito matriz.

3.10.1 Curva analítica e linearidade

A linearidade do método foi avaliada a partir das curvas das soluções analíticas contendo todos os compostos em estudo, preparadas (conforme descrito no item 3.5), em acetonitrila e no extrato do leite, nas concentrações de 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0; 150,0 e 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. As curvas analíticas no solvente foram injetadas uma vez e as curvas no extrato da matriz (leite) foram injetadas três vezes.

3.10.2 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

O LOQ do instrumento (LOQ_i) para cada composto foi estimado a partir da relação sinal/ruído calculada pelo *software* do equipamento, considerando no mínimo dez vezes a razão do sinal pela linha de base (ruído). Os limites instrumentais foram obtidos pela injeção de soluções analíticas de diferentes concentrações preparadas no solvente.

O LOD do instrumento (LOD_i) foi obtido conforme a Equação 4:

$$\text{LOD}_i = \text{LOQ}_i/3,33 \quad (4)$$

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

Como o método desenvolvido não apresenta fator de diluição ou concentração, os valores estimados de LOD do método (LOD_m) e de LOQ do

método (LOQ_m) serão iguais aos estimados para o LOD_i e LOQ_i e estes foram expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.10.3 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão do método

Neste trabalho, para o estudo da exatidão do método, foram utilizados ensaios de fortificação, avaliando-se, dessa maneira, a recuperação dos compostos em estudo. Foram realizadas seis fortificações das amostras “branco” em três níveis diferentes de concentração, totalizando 18 análises. As recuperações dos compostos foram avaliadas nas concentrações de 10,0; 25,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. A exatidão, expressa em percentagem de recuperação, foi calculada conforme a Equação 5 (INMETRO, 2007):

$$Rec (\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (5)$$

onde:

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração usada para fortificação.

O procedimento de extração das amostras fortificadas foi realizado 6 vezes, para cada um dos níveis de fortificação e, para isso, utilizaram-se amostras “branco”, isto é, livre da presença dos compostos em estudo, sendo que cada nível de fortificação foi injetado uma vez, obtendo-se um $n = 6$ (6 extrações x 1 injeção).

Inicialmente, para o procedimento de extração do método QuEChERS modificado, a amostra (leite integral) foi homogeneizada por agitação manual e em seguida mediu-se 5,0 mL (com macropipetador) diretamente em tubos de polipropileno (capacidade 50 mL). Logo após, efetuou-se as fortificações nos 3 níveis de concentração (10,0; 25,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) para todos os compostos analisados. Após a fortificação, as amostras foram homogeneizadas através de agitação manual por 1 min. Após uma hora adicionou-se em cada tubo, 5,0 mL de acetonitrila acidificada com 1% de ácido acético (v/v) e agitou-se manualmente por

mais 1 min. Em seguida, acrescentou-se 2,0 g de MgSO_4 anidro e 0,85 g de acetato de sódio. Repetiu-se a agitação manual por 1 min, assegurando-se da completa interação entre o extrato líquido e os reagentes sólidos, com posterior etapa de centrifugação a 3400 rpm, durante 8 min.

Para a etapa de limpeza dispersiva, transferiu-se 1,0 mL de extrato sobrenadante para um tubo de *ependorf* contendo 150 mg de MgSO_4 anidro, 125 mg de C_{18} e 62 mg de PSA. Os tubos *ependorf* foram agitados em vortex por 1 min e imediatamente centrifugado a 10000 rpm por 3 min. Após a centrifugação, o extrato foi transferido para *insert* de vidro para injeção no sistema GC-MS/MS.

3.10.4 Precisão

A precisão foi avaliada através do RSD, que foi calculado através da Equação 6,

$$RSD (\%) = \frac{S}{X_m} \times 100 \quad (6)$$

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.

A precisão do método, em termos de repetitividade (RSD_r), foi efetuada procedendo-se a extração e análise das amostras fortificadas. Cada nível de fortificação foi extraído seis vezes e cada extrato injetado uma vez.

A precisão intermediária (RSD_{pi}) do método foi avaliada, com o nível intermediário de fortificação ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) e foi realizado em dia diferente daquele do estudo da repetitividade.

3.10.5 Avaliação do efeito matriz

Para a avaliação da existência de efeito matriz, duas séries de soluções padrão foram preparadas, sendo uma no solvente puro (acetonitrila) e a outra no extrato da matriz (leite). A contribuição do efeito matriz foi avaliada por comparação entre as inclinações das curvas obtidas empregando-se soluções analíticas em acetonitrila e aquelas obtidas com soluções analíticas preparadas no extrato “branco” da matriz (leite). O cálculo foi efetuado através da Equação 7.

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (7)$$

onde:

X_1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas na matriz (leite);

X_2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em solvente (acetonitrila);

Dessa maneira, verifica-se se a matriz exerce efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (decréscimo de sinal) sobre o resultado da análise. Quando o resultado for acima de 10% considera-se que o efeito matriz começa a exercer influência nas análises (ZROSTLIKOVA et al., 2001). Neste caso, recomenda-se a construção das curvas analíticas no extrato da matriz para minimizar o efeito matriz.

3.11 Aplicação do método

O método após validado foi aplicado para a determinação de 45 resíduos de agrotóxicos em quatro amostras de leite do tipo UHT adquiridas em supermercado local.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Seleção da amostra utilizada como branco

A amostra de leite adquirida comercialmente foi analisada conforme o método otimizado neste trabalho e apresentado no item 4.5, com a finalidade de se obter uma amostra branco dos compostos de interesse.

Após o preparo da amostra, esta foi analisada por GC-MS/MS nas condições descritas nos itens 4.2 e 4.3. O cromatograma obtido para a amostra analisada pode ser visualizado na Figura 5.

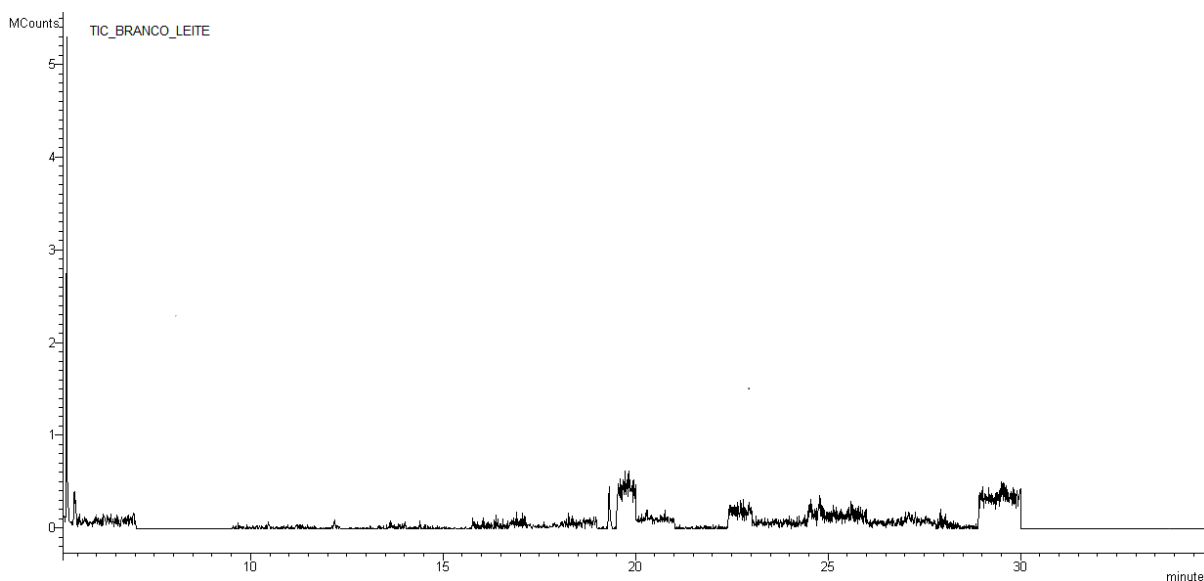


Figura 5 - Cromatograma obtido para verificar a possibilidade de utilizar a amostra como “branco”.

Pode-se observar que a amostra foi considerada adequada para ser utilizada como amostra “branco” para este estudo, pois não foi detectado a presença de nenhum dos analitos alvo deste estudo.

4.2 Condições usadas no sistema cromatográfico GC-MS/MS para determinação de agrotóxicos no leite

A Tabela 8 apresenta as condições empregadas no sistema cromatográfico GC-MS/MS para a análise de agrotóxicos em leite.

Tabela 8: Condições empregadas no sistema cromatográfico GC-MS/MS para a análise de agrotóxicos em leite.

CONDIÇÕES EMPREGADAS PARA O CROMATÓGRAFO A GÁS	
PARÂMETROS	CONDIÇÕES
Programação da temperatura do injetor (PTV-vaporização com temperatura programada)	100 °C (0,1 min) $\xrightarrow{200\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}}$ 280 °C (28 min) $\xrightarrow{100\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}}$ 100 °C (4,2 min)
Volume de injeção	2 μL splitless
Programação da temperatura do forno da coluna	50 °C (1 min) $\xrightarrow{10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}}$ 65 °C $\xrightarrow{25\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}}$ 180 °C $\xrightarrow{5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}}$ 280 °C (7,9 min)
Gás de arraste	Hélio na vazão de 1,0 mL min ⁻¹
Tempo total de corrida	35 min
CONDIÇÕES EMPREGADAS PARA O ESPECTRÔMETRO DE MASSAS	
PARÂMETROS	CONDIÇÕES
Temperatura da <i>transfer line</i>	250 °C
Temperatura da fonte de ionização	210 °C
Temperatura do <i>manifold</i>	40 °C
Modo de aquisição	MRM
Modo de ionização	El, com energia de 70 eV
<i>Collect delay</i>	5 min

Ao empregar MS/MS é possível detectar individualmente os compostos, que não foram separados pela técnica cromatográfica utilizada, através do modo de aquisição MRM, se possuírem diferentes massas moleculares e gerarem diferentes

espectros de massa, possibilitando assim, a obtenção de uma grande quantidade de informação estrutural acerca do analito, o que assegura sua identificação com maior exatidão do que quando ela é feita apenas com base nas características de retenção dos compostos analisados, como ocorre nas outras técnicas de detecção cromatográficas (CHIARADIA *et al.*, 2008).

4.3 Condições otimizadas para cada um dos analitos presentes no método desenvolvido.

De acordo com a Tabela 9, o tempo de corrida de 5 a 35 min, foi dividido em 33 segmentos programados de acordo com o tempo de retenção dos analitos. Os compostos foram analisados por GC-MS/MS usando modo de ionização EI e modo de aquisição MRM.

A Tabela 9 apresenta os íons precursores e produtos, as transições monitoradas, as energias de colisão e os tempos de retenção dos compostos estudados. Para cada composto foram selecionadas duas transições características. A transição mais intensa foi utilizada para a quantificação dos compostos e a segunda transição mais intensa foi utilizada para a confirmação dos mesmos.

Tabela 9: Condições empregadas no sistema cromatográfico GC-MS/MS para a análise de cada um dos compostos de interesse deste trabalho: tempo de retenção, íons precursores, íons produtos e energia de colisão para as transições monitoradas.

Seg.	Nº	t_R (min)	Analitos	1ª Transição - Quantificação			2ª Transição - Confirmação		
				Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia colisão (eV)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia colisão (eV)
1	1	6,12	Propoxur	152	109	10	152	92	30
1	2	6,52	Triclorfon	185	93	10	185	109	20
1	3	6,90	Carbofuran	164	103	20	164	131	20
3	4	9,29	Trifluralina -d14 (PS)	315	267	8	315	209	10
3	5	9,37	Trifluralina	306	264	10	306	206	15
4	6	10,00	HCH, alfa	219	183	10	219	147	20
4	7	10,09	Hexaclorobenzeno	284	214	35	284	249	30
5	8	10,64	Quintozeno (PI)	295	237	10	295	265	10
5	9	10,66	Lindano	219	183	10	219	147	20
5	10	10,72	Diazinona	304	179	10	304	162	10
6	11	11,33	HCH, delta	219	109	25	219	147	20
7	12	11,94	Clorpirifós metílico	288	93	20	288	286	10

Seg.	Nº	t _R (min)	Analitos	1ª Transição - Quantificação			2ª Transição - Confirmação		
				Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia colisão (eV)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia colisão (eV)
7	13	12,11	Alacloro	188	160	10	188	130	40
7	14	12,13	Parationa metílica	263	109	25	263	136	10
8	15	12,37	Heptacloro	274	237	20	274	239	20
9	16	12,61	Pirimifós metílico	290	151	15	290	180	10
9	17	12,75	Fenitrotiona	277	260	10	277	109	25
10	18	12,93	Malationa	173	99	15	173	127	10
11	19	13,15	Clorpirifós etílico	314	258	15	314	286	15
12	20	13,32	Aldrin	263	191	30	263	193	30
12	21	13,38	Parationa etílica	291	81	25	291	109	20
13	22	13,65	Dicofol	139	111	10	139	75	25
13	23	13,70	Pirimifós etílico	333	168	25	333	180	5
15	24	14,42	Heptacloro Ep. exo	353	263	18	353	282	15
15	25	14,55	Heptacloro Ep. endo	272	237	18	272	141	30
15	26	14,70	Procimidona	283	96	10	283	67	20
16	27	15,04	Metidationa	145	85	10	145	58	15
17	28	15,53	Endosulfan Alfa	241	206	10	241	237	15
18	29	16,18	4,4-DDE	318	176	40	318	246	25
18	30	16,32	Miclobutanil	179	125	10	179	90	25
18	31a	16,37	Endrin I	263	193	30	263	191	30
18	32	16,37	Dieldrin	277	241	10	277	206	15
19	31b	17,02	Endrin II	263	191	30	263	193	30
20	33	17,39	Endosulfan Beta	241	206	10	241	170	20
20	34a	17,54	DDT I	235	165	20	235	199	20
21	35a	18,37	Epoxiconazole I	192	138	15	192	111	25
21	36a	18,50	Propiconazole I	259	69	10	259	173	15
21	37	18,65	Endosulfan sulfato	272	237	15	272	235	10
21	36b	18,70	Propiconazole II	259	69	10	259	173	15
21	34b	18,75	DDT II	235	165	20	235	199	20
22	38	19,35	Trifenilfosfato (PI)	325	169	18	325	245	15
23	35b	19,68	Epoxiconazole II	192	138	15	192	111	25
24	39	20,33	Bifentrina	181	166	10	181	165	20
25	40	21,35	Tetradifona	229	201	15	229	199	15
26	41a	21,84	Cialotrina lambda	197	141	10	197	161	5
26	41b	22,19	Cialotrina lambda	197	141	10	197	161	5
26	42	22,24	Mirex	272	237	10	272	143	40
27	43	22,52	Pirazofós	221	193	10	221	198	20
28	44	23,69	Permetrina I e II	165	91	10	165	127	5
29	45	24,94	Ciflutrina	164	127	5	164	91	15
29	46a	25,35	Cipermetrina I	164	127	5	164	91	15
29	46b	25,56	Cipermetrina II + III + IV	164	127	5	164	91	15
30	47	27,03	Fenvalerato	225	147	10	225	197	5
30	48	27,44	Esfenvalerato	225	119	15	225	91	25
31	49	27,94	Difenoconazole	323	265	15	323	139	40

Seg.	N°	t_R (min)	Analitos	1ª Transição - Quantificação			2ª Transição - Confirmação		
				Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia colisão (eV)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia colisão (eV)
32	50	28,59	Deltametrina	253	174	10	253	172	5
33	51	29,04	Azoxistrobina	344	329	10	344	156	30

A Figura 6 apresenta os cromatogramas obtidos por GC-MS/MS para as soluções analíticas ($25,0 \mu\text{g L}^{-1}$) preparadas (A) em acetonitrila e (B) no extrato “branco” da matriz, contendo os 48 compostos avaliados neste estudo. O cromatograma (C) refere-se a fortificação ($25,0 \mu\text{g L}^{-1}$) no “branco da matriz.

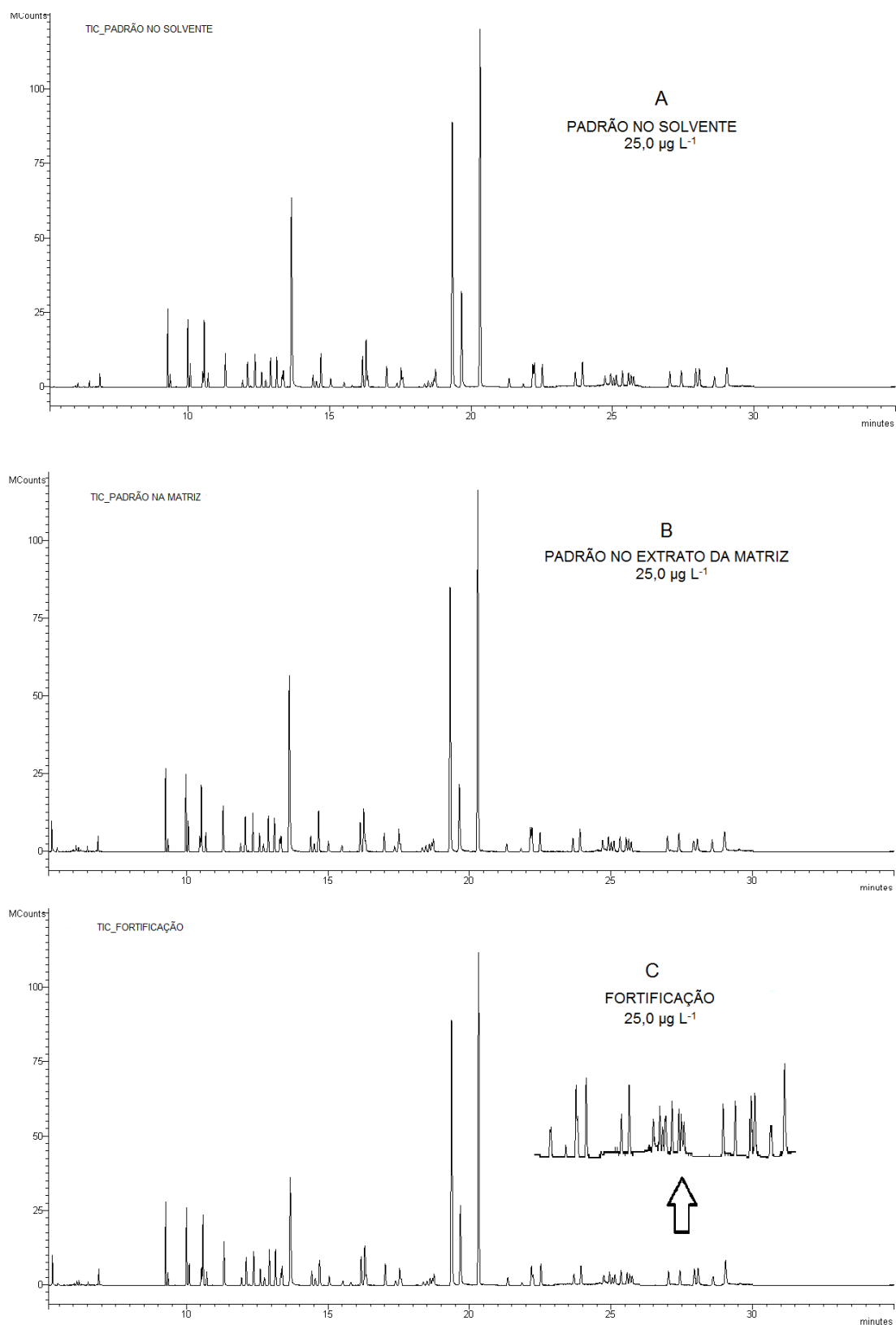


Figura 6 - Cromatogramas obtidos por GC-MS/MS para os 48 agrotóxicos avaliados neste estudo, (A) para as soluções analíticas ($25,0 \mu\text{g L}^{-1}$) preparadas em acetonitrila, (B) para as soluções analíticas ($25,0 \mu\text{g L}^{-1}$) preparadas no extrato “branco” da matriz e (C) fortificação ($25,0 \mu\text{g L}^{-1}$) na matriz “branco”.

Os compostos alacloro e parationa metílica co-eluíram, pois apresentaram tempo de retenção muito semelhante, eluindo em 12,11 e 12,13 min, respectivamente. Portanto, não houve separação adequada, mas, como o detector empregado é um espectrômetro de massas, e este detecta o composto pela massa característica dos fragmentos gerados, tem-se a grande vantagem de não necessitar uma perfeita separação cromatográfica de cada analito contido no extrato. Além disso, foram usadas duas transições para as análises de cada composto, o que torna a técnica altamente seletiva.

Esta seletividade pode ser observada neste estudo, conforme representado na Figura 7, onde os compostos alacloro e parationa metílica foram identificados mesmo com tempos de retenção muito próximos.

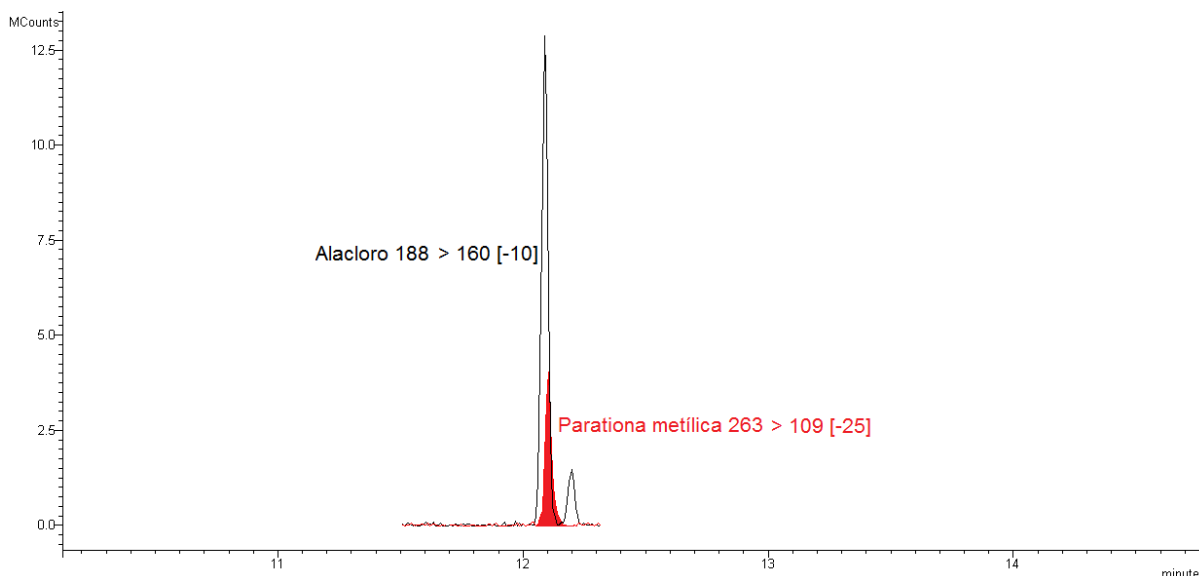


Figura 7 - Cromatogramas no modo MRM obtido para uma solução analítica preparada no extrato da matriz na concentração de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ dos compostos alacloro e parationa metílica, contendo as transições empregadas para a quantificação.

4.4 Otimização do método de extração

Os procedimentos experimentais referentes a este estudo foram iniciados pela avaliação da eficiência de quatro testes de limpeza dos extratos, sendo estes referentes os testes 1, 2, 3 e 4. Na etapa de otimização do procedimento de limpeza empregando d-SPE, foram testados: C_{18} e amina primária secundária (PSA) em

combinação com sulfato de magnésio e também com etapa de precipitação dos lipídeos por baixa temperatura.

O octadecilsilano (C_{18}) é um adsorvente utilizado para remover materiais apolares ou moderadamente polares, tais como ácidos graxos. A utilização de C_{18} na etapa de limpeza do método QuEChERS tem sido demonstrada para amostras contendo teores de gordura $\geq 2\%$ como, por exemplo, arroz, cevada, trigo, óleos vegetais entre outras (PRESTES et al., 2009). Foi utilizado com a intenção de reduzir a concentração de compostos lipídicos presentes no leite.

PSA é um adsorvente de troca aniônica fraco, com a habilidade de remover ácidos graxos, açúcares, alguns pigmentos e outros co-extratos da matriz que formam pontes de hidrogênio (MASTOVSKA e LEHOTAY, 2004). Foi utilizado com a intenção de complementar a remoção dos lipídeos.

Segundo CHUNG e CHEN (2011), gorduras, principalmente lipídeos têm pontos de fusão mais baixos do que o solvente, de modo que os lipídeos congelados podem ser removidos por centrifugação, enquanto que os agrotóxicos permanecem dissolvidos no solvente. Observando os cromatogramas no modo *full scan* (Figura 8), pode-se constatar que realmente a precipitação a baixa temperatura (PBT) ajuda a diminuir os co-extrativos lipídicos presentes na amostra.

Portanto, o estudo para otimização dos procedimentos de limpeza dos extratos é relevante uma vez que reduz as interferências e o efeito matriz (JIMENEZ et al., 2001) além de diminuir a necessidade de manutenção do sistema cromatográfico.

A Figura 8 apresenta os cromatogramas no modo *full scan* dos quatro diferentes ensaios realizados na etapa de limpeza.

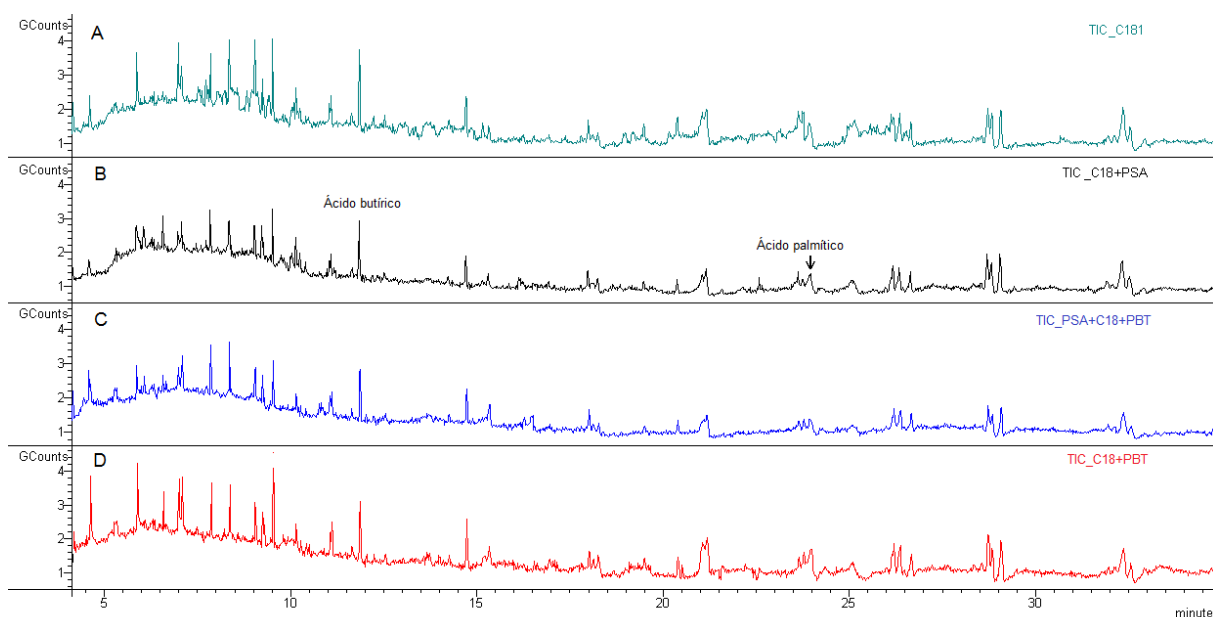


Figura 8 - Cromatogramas dos extratos “branco” da matriz, obtidos no modo *full scan* para os quatro diferentes ensaios realizados na etapa de limpeza. (A) $\text{MgSO}_4 + \text{C}_{18}$; (B) $\text{MgSO}_4 + \text{C}_{18} + \text{PSA}$; (C) $\text{MgSO}_4 + \text{C}_{18} + \text{PSA}$, com precipitação a baixa temperatura e (D) $\text{MgSO}_4 + \text{C}_{18}$, com precipitação a baixa temperatura.

Para avaliar os ensaios de extração realizados neste estudo, utilizou-se uma amostra “branco” de leite, fortificada na concentração $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados dos ensaios descritos no item 3.9 podem ser observados na Figura 9.

Com os testes 1 e 2, obteve-se a recuperação dos mesmos compostos (45), como o teste 2 apresentou maior eficiência na etapa de limpeza e recuperou os mesmos compostos, este foi escolhido em relação ao teste 1.

Os testes 3 e 4 fazem referência ao procedimento de limpeza com precipitação a baixa temperatura (PBT), juntamente com MgSO_4 , C_{18} e PSA e com precipitação a baixa temperatura juntamente com MgSO_4 e C_{18} , respectivamente. Como pode ser observado na Figura 9, estes apresentaram recuperação superiores a 70 % para uma menor quantidade de compostos. Segundo McLEOD e WALES (1972) é necessária a agitação dos extratos durante a etapa de precipitação a baixa temperatura com banho de gelo seco, para prevenir a oclusão de compostos solúveis na matriz lipofílica durante o rápida etapa de precipitação.

Este procedimento de agitação não foi realizado durante o desenvolvimento deste trabalho. Isto pode ter contribuído para redução no número de compostos com recuperações superiores a 70% nos testes realizados com precipitação a baixa temperatura.

Os testes 4 e 5, referem-se, ao procedimento de limpeza com precipitação a baixa temperatura realizada separadamente (anteriormente) a etapa de limpeza dispersiva e ao procedimento de limpeza com precipitação a baixa temperatura realizada juntamente a etapa de limpeza dispersiva, respectivamente. As variações nas recuperações obtidas pelos dois testes foram insignificantes, mas pode-se observar que quando a precipitação a baixa temperatura foi realizada juntamente com a etapa de limpeza estes valores foram levemente superiores.

Os testes 6 e 7 (limpeza com MgSO_4 , C_{18} e precipitação a baixa temperatura e limpeza com MgSO_4 , C_{18} e PSA, respectivamente), referem-se a fortificação do extrato branco antes da etapa de limpeza, e foram objetivados para avaliar se a baixa recuperação de alguns agrotóxicos (aldrin, hexaclorobenzeno e mirex) era referente ao processo de extração ou ao processo de limpeza. Observou-se que nestes testes todos os compostos foram recuperados.

O teste 8, foi realizado para avaliar se a partição com NaCl melhoraria a recuperação, uma vez que o uso deste além de influenciar na recuperação, principalmente, de compostos polares, faz com que co-extrativos mais polares possam ser extraídos. A quantidade de sal a ser utilizada deve ser otimizada, pois se for muito elevada pode acarretar na extração excessiva de co-extrativos polares, diminuindo a recuperação dos analitos de interesse (ANASTASSIADES et al., 2003).

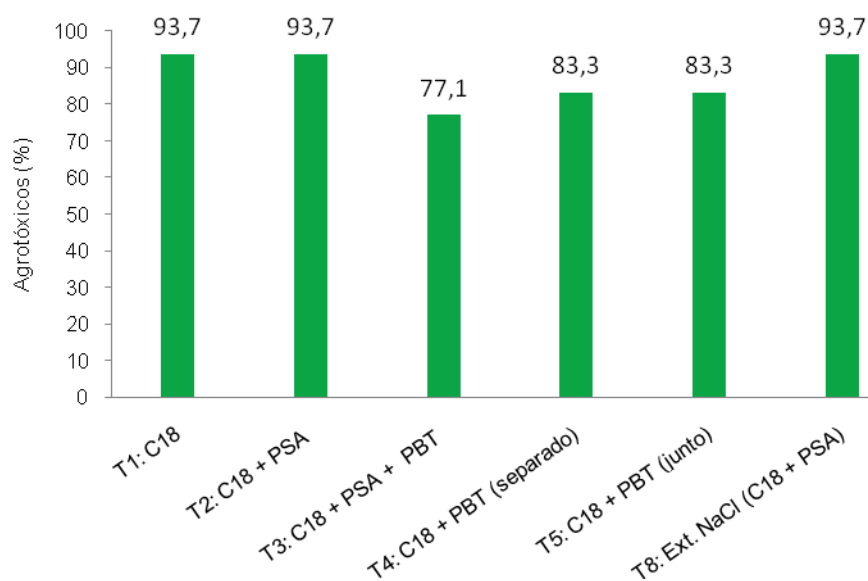


Figura 9 - Percentuais de compostos que apresentaram recuperação entre 70 e 120%, para cada um dos testes realizados durante os ensaios de otimização do método QuEChERS modificado.

A partir destes testes preliminares, foi possível avaliar quais dos métodos apresentaram as melhores recuperações para os compostos em estudo.

Dessa maneira, neste trabalho, foi selecionado o ensaio 2 representado no item 3.9, que utiliza na etapa de limpeza dispersiva, C₁₈ e PSA como sorvente em combinação com MgSO₄. Embora este método de limpeza não tenha sido o que apresentou maior eficiência na limpeza de co-extrativos, foi o que apresentou as maiores recuperações aliadas a uma limpeza satisfatória.

Hexaclorobenzeno e aldrin não foram satisfatoriamente recuperados pelo método desenvolvido, diferentemente do que aconteceu em trabalhos que utilizaram acetona/n-hexano (HONG *et al.*, 2004), éter de petróleo/acetona (YAGÜE *et al.*, 2001) ou acetato de etil/ciclohexano (TSIPLAKOU *et al.*, 2010) provavelmente devido a baixa solubilidade dos mesmos em acetonitrila. Isto pode ser explicado segundo (LEHOTAY *et al.*, 2005c) pelo fato dos lipídeos não serem muito solúveis em acetonitrila/água, sendo que as gorduras geralmente formam uma película oleosa sobre a superfície destes solventes, ou uma emulsão durante a extração. Portanto, grande quantidade dos agrotóxicos lipofílicos permanecem durante a partição dissolvidos na gordura, o que resulta em sua menor recuperação no extrato MeCN. No trabalho desenvolvido por LEHOTAY *et al.* (2005c) que realizou a extração utilizando método QuEChERS acetato, o hexaclorobenzeno também apresentou recuperações inferiores a 70% para amostras de leite.

Diferentemente do observado por YAGÜE e colaboradores (2001) o método desenvolvido neste trabalho possibilitou a determinação de endosulfan beta e endosulfan sulfato, pois não utilizou alumina como adsorvente a qual provavelmente foi responsável pela forte adsorção destes compostos.

Após a otimização do método QuEChERS modificado, realizou-se a etapa de validação do método, utilizando o sistema cromatográfico GC-MS/MS.

A partir dos testes previamente apresentados, obteve-se o procedimento de extração otimizado, utilizado para a validação do método proposto e para a determinação da concentração de resíduos de agrotóxicos nas amostras de leite.

As etapas do procedimento de extração/limpeza otimizadas neste estudo estão representadas esquematicamente na Figura 10.

O método envolve uma etapa de extração com solução de acetonitrila acidificada com 1% de ácido acético (v/v) e uma etapa de partição com sulfato de magnésio e acetato de sódio. Os tubos foram agitados de forma manual e vigorosa

durante 1 minuto, usando os cotovelos e ombros mais do que os pulsos, conforme recomenda LEHOTAY (2007), garantindo que o solvente interaja bem com toda a amostra e que aglomerados cristalinos sejam quebrados durante a agitação.

A etapa de limpeza, consistiu de 1,0 mL de extrato proveniente da extração, C_{18} , PSA e $MgSO_4$. Os tubos *ependorf* foram agitados por 1 minuto em vortex e em seguida centrifugados. Ao retirar o extrato do tubo de *ependorf*, o mesmo foi filtrado com filtro de *nylon* de 13 mm de diâmetro e 0,2 μm de porosidade.

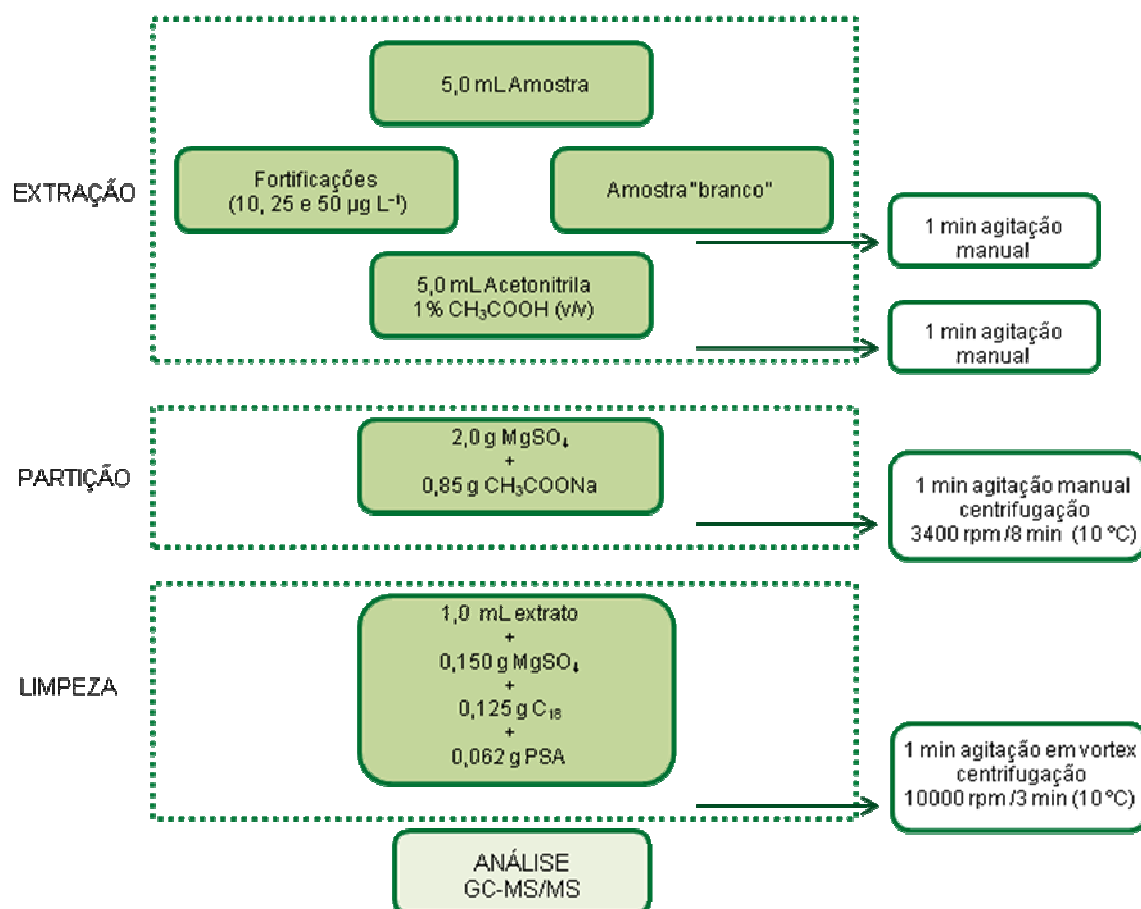


Figura 10 - Representação do método para determinação de resíduos de agrotóxicos em leite, utilizando o método QuEChERS modificado.

A Figura 11 mostra os tubos *ependorf* após a centrifugação, na etapa de limpeza, e como pode ser observado, os extratos apresentam-se límpidos e transparentes.

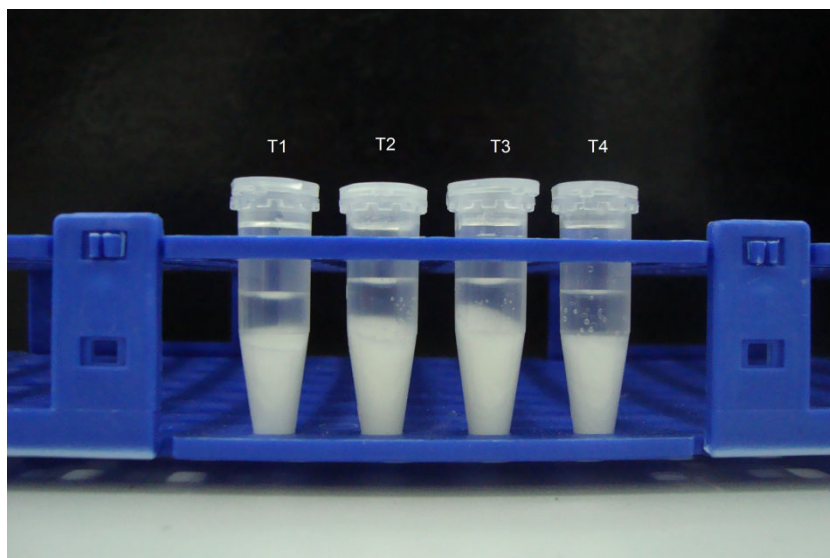


Figura 11 - Tubos *ependorf* referentes aos testes 1, 2, 3 e 4, após a centrifugação na etapa de limpeza.

4.5 Validação do método QuEChERS modificado

Todas as soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato do leite, para avaliar e compensar o efeito matriz, uma vez que o efeito matriz pode influenciar os resultados, dependendo dos compostos e da técnica cromatográfica empregada. Sendo assim, foi realizada a validação do método QuEChERS modificado para a análise dos agrotóxicos, segundo os parâmetros descritos a seguir.

Para a etapa de validação do método QuEChERS modificado utilizado neste trabalho, foram avaliados três níveis de fortificação 10,0; 25,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os níveis de fortificação foram escolhidos levando em consideração os LMRs estabelecidos pela legislação nacional.

4.5.1 Curva analítica e linearidade

As Tabelas 10 e 11 apresentam as equações das curvas analíticas em solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz, coeficiente de determinação (r^2) e intervalo linear para os agrotóxicos estudados.

Tabela 10 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos em acetonitrila, empregando QuEChERS modificado e GC-MS/MS.

Analitos	Intervalo Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Equação da curva
4,4-DDE	1,0 - 200	0,9924	$y = 1,58 \cdot 10^9 x + 8,72 \cdot 10^9$
Alacloro	1,0 - 200	0,9938	$y = 1,01 \cdot 10^9 x - 1,50 \cdot 10^9$
Aldrin	2,0 - 200	0,9927	$y = 5,29 \cdot 10^8 x + 7,92 \cdot 10^8$
Azoxistrobina	2,0 - 200	0,9977	$y = 9,06 \cdot 10^8 x - 7,61 \cdot 10^8$
Bifentrina	1,0 - 200	0,9954	$y = 5,67 \cdot 10^9 x - 6,68 \cdot 10^9$
Carbofuran	2,0 - 200	0,9949	$y = 3,10 \cdot 10^8 x + 9,43 \cdot 10^8$
Cialotrina lambda I	1,0 - 200	0,9975	$y = 1,57 \cdot 10^9 x + 1,03 \cdot 10^9$
Cialotrina lambda II	5,0 - 200	0,9883	$y = 3,09 \cdot 10^8 x - 1,31 \cdot 10^9$
Ciflutrina I + II	5,0 - 200	0,9867	$y = 2,22 \cdot 10^8 x - 3,52 \cdot 10^8$
Cipermetrina I	2,0 - 200	0,9969	$y = 2,52 \cdot 10^8 x + 2,17 \cdot 10^8$
Cipermetrina II + III + IV	5,0 - 200	0,9906	$y = 1,71 \cdot 10^8 x - 4,31 \cdot 10^8$
Clorpirifós etílico	2,0 - 200	0,9933	$y = 6,40 \cdot 10^8 x - 7,13 \cdot 10^7$
Clorpirifós metílico	2,0 - 200	0,9919	$y = 4,3 \cdot 10^8 x - 4,42 \cdot 10^8$
DDT I	1,0 - 200	0,9932	$y = 2,8 \cdot 10^9 x + 3,99 \cdot 10^9$
DDT II	1,0 - 200	0,9949	$y = 2,34 \cdot 10^9 x - 3,62 \cdot 10^9$
Deltametrina	5,0 - 200	0,9964	$y = 2,58 \cdot 10^8 x - 5,3 \cdot 10^8$
Diazinona	2,0 - 200	0,9953	$y = 8,00 \cdot 10^8 x - 1,18 \cdot 10^9$
Dicofol	1,0 - 200	0,9952	$y = 6,71 \cdot 10^9 x - 9,41 \cdot 10^9$
Dieldrin	2,0 - 200	0,9928	$y = 2,55 \cdot 10^8 x + 2,24 \cdot 10^8$
Difenoconazole	2,0 - 200	0,9965	$y = 4,72 \cdot 10^8 x - 6,77 \cdot 10^6$
Endosulfan alfa	2,0 - 200	0,9889	$y = 6,05 \cdot 10^8 x - 4,90 \cdot 10^8$
Endosulfan beta	2,0 - 200	0,9952	$y = 4,01 \cdot 10^8 x - 1,43 \cdot 10^8$
Endosulfan sulfato	1,0 - 200	0,9918	$y = 2,72 \cdot 10^8 x - 2,51 \cdot 10^7$
Endrin I	5,0 - 200	0,9924	$y = 2,52 \cdot 10^8 x + 2,22 \cdot 10^8$
Endrin II	2,0 - 200	0,9905	$y = 3,21 \cdot 10^8 x + 6,18 \cdot 10^8$
Epoxiconazole I	5,0 - 200	0,9892	$y = 2,75 \cdot 10^8 x - 9,57 \cdot 10^6$
Epoxiconazole II	1,0 - 200	0,9945	$y = 1,52 \cdot 10^9 x - 6,08 \cdot 10^8$
Esfenvalerato	2,0 - 200	0,9967	$y = 5,05 \cdot 10^8 x + 8,70 \cdot 10^7$
Fenitrotona	5,0 - 200	0,9936	$y = 2,40 \cdot 10^8 x - 1,42 \cdot 10^9$
Fenvalerato	5,0 - 200	0,9956	$y = 2,77 \cdot 10^8 x - 8,40 \cdot 10^8$
HCH, alfa	1,0 - 200	0,9978	$y = 1,47 \cdot 10^9 x + 4,13 \cdot 10^8$
HCH, delta	1,0 - 200	0,9939	$y = 4,51 \cdot 10^8 x - 4,30 \cdot 10^8$
Heptacloro	2,0 - 200	0,9946	$y = 4,51 \cdot 10^8 x + 6,55 \cdot 10^8$
Heptacloro epóxido endo	5,0 - 200	0,9924	$y = 3,63 \cdot 10^8 x + 4,09 \cdot 10^8$
Heptacloro epóxido exo	2,0 - 200	0,9962	$y = 5,26 \cdot 10^8 x + 3,17 \cdot 10^8$
Hexaclorobenzeno	1,0 - 200	0,9934	$y = 5,56 \cdot 10^8 x + 2,25 \cdot 10^9$
Lindano	1,0 - 200	0,9943	$y = 5,58 \cdot 10^8 x + 2,47 \cdot 10^9$
Malationa	2,0 - 200	0,9930	$y = 5,98 \cdot 10^8 x - 4,61 \cdot 10^8$
Metidationa	2,0 - 200	0,9935	$y = 6,28 \cdot 10^8 x - 2,03 \cdot 10^9$
Miclobutanil	1,0 - 200	0,9933	$y = 3,84 \cdot 10^9 x - 1,12 \cdot 10^9$
Mirex	1,0 - 200	0,9971	$y = 2,11 \cdot 10^9 x + 2,29 \cdot 10^8$
Parationa etílica	2,0 - 200	0,9935	$y = 5,85 \cdot 10^8 x - 7,93 \cdot 10^8$
Parationa metílica	5,0 - 200	0,9922	$y = 2,81 \cdot 10^9 x - 1,29 \cdot 10^9$
Permetrina I + II	5,0 - 200	0,9974	$y = 3,32 \cdot 10^8 x + 5,13 \cdot 10^8$

Pirazofós	2,0 - 200	0,9948	$y = 7,34 \cdot 10^8 x - 1,71 \cdot 10^9$
Pirimifós etílico	1,0 - 200	0,9938	$y = 1,17 \cdot 10^9 x - 4,20 \cdot 10^9$
Pirimifós metílico	2,0 - 200	0,9963	$y = 5,64 \cdot 10^8 x - 1,39 \cdot 10^8$
Procimidona	1,0 - 200	0,9964	$y = 1,75 \cdot 10^9 x - 2,23 \cdot 10^9$
Propiconazole I	2,0 - 200	0,9948	$y = 4,99 \cdot 10^8 x - 1,87 \cdot 10^9$
Propiconazole II	2,0 - 200	0,9925	$y = 6,26 \cdot 10^8 x - 1,64 \cdot 10^9$
Propoxur	5,0 - 200	0,9933	$y = 1,79 \cdot 10^8 x + 3,92 \cdot 10^8$
Tetradifona	5,0 - 200	0,9934	$y = 2,81 \cdot 10^8 x + 8,29 \cdot 10^7$
Triclorfon	5,0 - 200	0,9947	$y = 1,72 \cdot 10^8 x - 4,45 \cdot 10^8$
Trifluralina	1,0 - 200	0,9953	$y = 2,59 \cdot 10^8 x - 4,92 \cdot 10^8$

Tabela 11 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos no extrato da matriz, empregando QuEChERS modificado e GC-MS/MS.

Analitos	Intervalo	r^2	Equação da curva
	Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
4,4-DDE	1,0 - 200	0,9952	$y = 1,95 \cdot 10^9 x + 2,85 \cdot 10^9$
Alacloro	1,0 - 200	0,9992	$y = 1,05 \cdot 10^9 x + 6,34 \cdot 10^8$
Aldrin	2,0 - 200	0,9973	$y = 6,53 \cdot 10^8 x + 5,93 \cdot 10^6$
Azoxistrobina	2,0 - 200	0,9963	$y = 1,03 \cdot 10^9 x - 1,32 \cdot 10^9$
Bifentrina	1,0 - 200	0,9962	$y = 6,34 \cdot 10^9 x - 9,01 \cdot 10^9$
Carbofuran	2,0 - 200	0,9969	$y = 3,65 \cdot 10^8 x + 4,17 \cdot 10^8$
Cialotrina lambda I	1,0 - 200	0,9970	$y = 1,86 \cdot 10^9 x - 2,00 \cdot 10^9$
Cialotrina lambda II	5,0 - 200	0,9944	$y = 3,02 \cdot 10^8 x - 2,50 \cdot 10^8$
Ciflutrina I + II	10,0 - 200	0,9944	$y = 2,34 \cdot 10^8 x + 7,51 \cdot 10^8$
Cipermetrina I	2,0 - 200	0,9951	$y = 2,98 \cdot 10^8 x + 3,42 \cdot 10^8$
Cipermetrina II + III + IV	5,0 - 200	0,9895	$y = 1,59 \cdot 10^8 x - 6,81 \cdot 10^7$
Clorpirifós etílico	2,0 - 200	0,9977	$y = 6,91 \cdot 10^8 x + 2,39 \cdot 10^8$
Clorpirifós metílico	2,0 - 200	0,9960	$y = 4,67 \cdot 10^8 x - 5,40 \cdot 10^8$
DDT I	1,0 - 200	0,9956	$y = 3,26 \cdot 10^9 x + 2,59 \cdot 10^9$
DDT II	1,0 - 200	0,9934	$y = 2,61 \cdot 10^9 x - 6,20 \cdot 10^9$
Deltametrina	5,0 - 200	0,9973	$y = 3,16 \cdot 10^8 x - 8,10 \cdot 10^8$
Diazinona	1,0 - 200	0,9994	$y = 8,42 \cdot 10^8 x - 4,4 \cdot 10^8$
Dicofol	1,0 - 200	0,9966	$y = 7,54 \cdot 10^9 x - 8,10 \cdot 10^9$
Dieldrin	2,0 - 200	0,9970	$y = 3,06 \cdot 10^8 x - 3,73 \cdot 10^8$
Difenoconazole	2,0 - 200	0,9957	$y = 5,26 \cdot 10^8 x - 3,21 \cdot 10^8$
Endosulfan alfa	5,0 - 200	0,9949	$y = 4,43 \cdot 10^8 x + 5,86 \cdot 10^7$
Endosulfan beta	5,0 - 200	0,9954	$y = 2,94 \cdot 10^8 x + 2,35 \cdot 10^8$
Endosulfan sulfato	1,0 - 200	0,9949	$y = 6,46 \cdot 10^8 x - 5,80 \cdot 10^7$
Endrin I	5,0 - 200	0,9926	$y = 3,04 \cdot 10^8 x + 1,92 \cdot 10^8$
Endrin II	2,0 - 200	0,9954	$y = 3,73 \cdot 10^8 x + 6,83 \cdot 10^7$
Epoxiconazole I	5,0 - 200	0,9969	$y = 3,52 \cdot 10^8 x + 9,81 \cdot 10^7$
Epoxiconazole II	1,0 - 200	0,9961	$y = 1,75 \cdot 10^9 x - 1,13 \cdot 10^9$
Esfenvalerato	2,0 - 200	0,9966	$y = 5,95 \cdot 10^8 x - 6,22 \cdot 10^8$
Fenitrotiona	5,0 - 200	0,9961	$y = 1,75 \cdot 10^9 x - 5,81 \cdot 10^8$
Fenvalerato	5,0 - 200	0,9981	$y = 2,87 \cdot 10^8 x - 3,13 \cdot 10^8$
HCH, alfa	1,0 - 200	0,9987	$y = 1,58 \cdot 10^9 x + 7,01 \cdot 10^8$
HCH, delta	1,0 - 200	0,9960	$y = 4,92 \cdot 10^8 x - 4,72 \cdot 10^8$

Heptacloro	2,0 - 200	0,9950	$y = 5,57 \cdot 10^8 x - 6,04 \cdot 10^8$
Heptacloro epóxido endo	5,0 - 200	0,9969	$y = 4,25 \cdot 10^8 x + 2,71 \cdot 10^8$
Heptacloro epóxido exo	2,0 - 200	0,9967	$y = 5,88 \cdot 10^8 x + 1,88 \cdot 10^8$
Hexaclorobenzeno	1,0 - 200	0,9966	$y = 6,46 \cdot 10^8 x + 1,86 \cdot 10^9$
Lindano	1,0 - 200	0,9961	$y = 6,75 \cdot 10^8 x + 2,01 \cdot 10^9$
Malationa	2,0 - 200	0,9968	$y = 6,38 \cdot 10^8 x - 3,93 \cdot 10^8$
Metidationa	2,0 - 200	0,9962	$y = 6,62 \cdot 10^8 x - 1,44 \cdot 10^9$
Miclobutanil	1,0 - 200	0,9953	$y = 4,35 \cdot 10^9 x - 3,92 \cdot 10^9$
Mirex	1,0 - 200	0,9975	$y = 2,45 \cdot 10^9 x - 1,11 \cdot 10^9$
Parationa etílica	2,0 - 200	0,9970	$y = 6,55 \cdot 10^8 x - 1,03 \cdot 10^9$
Parationa metílica	5,0 - 200	0,9924	$y = 2,83 \cdot 10^8 x - 6,92 \cdot 10^8$
Permetrina I + II	5,0 - 200	0,9977	$y = 3,95 \cdot 10^8 x + 9,55 \cdot 10^7$
Pirazofós	2,0 - 200	0,9962	$y = 8,88 \cdot 10^8 x - 1,53 \cdot 10^9$
Pirimifós etílico	2,0 - 200	0,9983	$y = 1,18 \cdot 10^9 x - 2,81 \cdot 10^9$
Pirimifós metílico	2,0 - 200	0,9963	$y = 6,34 \cdot 10^8 x - 1,27 \cdot 10^7$
Procimidona	1,0 - 200	0,9977	$y = 1,88 \cdot 10^9 x - 1,18 \cdot 10^9$
Propiconazole I	5,0 - 200	0,9961	$y = 5,47 \cdot 10^8 x - 7,44 \cdot 10^8$
Propiconazole II	2,0 - 200	0,9967	$y = 6,93 \cdot 10^8 x - 1,55 \cdot 10^9$
Propoxur	5,0 - 200	0,9971	$y = 2,15 \cdot 10^8 x - 7,41 \cdot 10^7$
Tetradifona	5,0 - 200	0,9958	$y = 3,33 \cdot 10^8 x - 6,89 \cdot 10^7$
Triclorfon	5,0 - 200	0,9949	$y = 1,82 \cdot 10^8 x - 5,26 \cdot 10^8$
Trifluralina	1,0 - 200	0,9975	$y = 2,79 \cdot 10^8 x - 3,52 \cdot 10^8$

A partir dos resultados das equações das retas obtidas, pode-se concluir que o modelo linear é satisfatório segundo a literatura (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007), pois a maioria dos compostos apresentaram coeficientes de determinação (r^2) maiores que 0,99 para a curva na matriz, exceto Cipermetrina II + III + IV que apresentou r^2 de 0,9895. Para a curva analítica preparada no solvente, apenas quatro compostos apresentaram r^2 inferior a 0,99.

4.5.2 Determinação dos valores de LOD e LOQ, do instrumento e do método

Os valores de limite de detecção e de quantificação foram obtidos através da relação sinal/ruído conforme apresentado no item 3.10.2. Na Tabela 12 estão listados os valores de LOD e LOQ do instrumento e do método para os agrotóxicos estudados. As soluções analíticas utilizadas para este procedimento foram preparadas no extrato da matriz.

Tabela 12 - Valores de LOD e LOQ do instrumento e do método.

Analitos	LOD _i	LOQ _i	LOD _m	LOQ _m
	µg L ⁻¹		µg L ⁻¹	
4,4-DDE	0,3	1,0	0,3	1,0
Alacloro	0,3	1,0	0,3	1,0
Aldrin	0,6	2,0	0,6	2,0
Azoxistrobina	0,6	2,0	0,6	2,0
Bifentrina	0,3	1,0	0,3	1,0
Carbofuran	0,6	2,0	0,6	2,0
Cialotrina lambda I	0,3	1,0	0,3	1,0
Cialotrina lambda II	1,5	5,0	1,5	5,0
Ciflutrina I + II	3,0	10,0	3,0	10,0
Cipermetrina I	0,6	2,0	0,6	2,0
Cipermetrina II + III + IV	1,5	5,0	1,5	5,0
Clorpirifós etílico	0,6	2,0	0,6	2,0
Clorpirifós metílico	0,6	2,0	0,6	2,0
DDT I	0,3	1,0	0,3	1,0
DDT II	0,3	1,0	0,3	1,0
Deltametrina	1,5	5,0	1,5	5,0
Diazinona	0,3	1,0	0,3	1,0
Dicofol	0,3	1,0	0,3	1,0
Dieldrin	0,6	2,0	0,6	2,0
Difenoconazole	0,6	2,0	0,6	2,0
Endosulfan alfa	1,5	5,0	1,5	5,0
Endosulfan beta	1,5	5,0	1,5	5,0
Endosulfan sulfato	0,3	1,0	0,3	1,0
Endrin I	1,5	5,0	1,5	5,0
Endrin II	0,6	2,0	0,6	2,0
Epoxiconazole I	1,5	5,0	1,5	5,0
Epoxiconazole II	0,3	1,0	0,3	1,0
Esfenvalerato	0,6	2,0	0,6	2,0
Fenitrotiona	1,5	5,0	1,5	5,0
Fenvalerato	1,5	5,0	1,5	5,0
HCH, alfa	0,3	1,0	0,3	1,0
HCH, delta	0,3	1,0	0,3	1,0
Heptacloro	0,6	2,0	0,6	2,0
Heptacloro epóxido endo	1,5	5,0	1,5	5,0
Heptacloro epóxido exo	0,6	2,0	0,6	2,0
Hexaclorobenzeno	0,3	1,0	0,3	1,0
Lindano	0,3	1,0	0,3	1,0
Malationa	0,6	2,0	0,6	2,0
Metidationa	0,6	2,0	0,6	2,0
Miclobutanil	0,3	1,0	0,3	1,0
Mirex	0,3	1,0	0,3	1,0
Parationa etílica	0,6	2,0	0,6	2,0
Parationa metílica	1,5	5,0	1,5	5,0
Permetrina	0,6	2,0	0,6	2,0
Pirazofós	0,6	2,0	0,6	2,0

Analitos	LOD _i	LOQ _i	LOD _m	LOQ _m
	µg L ⁻¹		µg L ⁻¹	
Pirimifós etílico	0,6	2,0	0,6	2,0
Pirimifós metílico	0,6	2,0	0,6	2,0
Procimidona	0,3	1,0	0,3	1,0
Propiconazole I	1,5	5,0	1,5	5,0
Propiconazole II	0,6	2,0	0,6	2,0
Propoxur	1,5	5,0	1,5	5,0
Tetradifona	1,5	5,0	1,5	5,0
Triclorfon	1,5	5,0	1,5	5,0
Trifluralina	0,3	1,0	0,3	1,0

O método QuEChERS otimizado nesse trabalho apresentou baixos limites de detecção (LOD_m = 0,3 a 1,5 µg L⁻¹) e baixos limites de quantificação (LOQ_m = 1,0 a 5,0 µg L⁻¹), para a maioria dos agrotóxicos estudados, exceto para a ciflutrina que apresentou LOD de 3,0 µg L⁻¹ e LOQ de 10 µg L⁻¹.

Estes valores de limites de detecção e quantificação são considerados satisfatórios para o método apresentado e validado, considerando a complexidade da matriz analisada. Além disso, os LOQs deste método permitem que sejam alcançados os LMRs estabelecidos pela legislação brasileira (Tabela 4) para a maioria dos compostos analisados, exceto para endrin e heptacloro, que apresentaram LOQ maiores que seus respectivos LMRs estabelecidos pelo MAPA.

4.5.3 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão do método

A Tabela 13 apresenta os valores de recuperação obtidos para as fortificações, em diferentes níveis de concentração, para os 48 agrotóxicos analisados nas amostras de leite, fazendo uso do procedimento descrito no item 4.5.

Os valores de recuperação foram calculados através da curva analítica preparada no extrato da matriz, de acordo com o método de extração utilizado.

Tabela 13 - Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método.

Analitos	Níveis de Fortificação					
	10 µg L ⁻¹		25 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Rec %	RSD	Rec %	RSD	Rec %	RSD
4,4-DDE	71,2	7,1	71,1	0,9	71,9	8,6
Alacloro	113,8	12,5	94,6	4,2	83,1	9,8
Aldrin	58,3	8,0	56,3	4,4	68,6	13,2
Azoxistrobina	114,3	14,4	102,2	7,6	97,7	17,4
Bifentrina	90,0	10,2	83,2	6,1	87,6	16,6
Carbofuran	88,0	11,7	87,3	8,3	95,2	9,0
Cialotrina lambda I	112,5	11,8	86,4	7,4	80,2	11,8
Cialotrina lambda II	83,4	3,1	95,2	15,6	82,9	15,2
Ciflutrina	-	-	95,8	6,8	94,2	14,2
Cipermetrina I	97,0	14,1	86,7	8,4	88,3	16,1
Cipermetrina II + III + IV	102,9	11,1	100,6	12,9	90,6	9,8
Clorpirifós etílico	90,9	14,9	83,8	7,1	86,0	10,2
Clorpirifós metílico	102,8	9,9	91,9	4,7	85,3	9,6
DDT I	71,9	8,4	72,4	3,2	71,8	17,3
DDT II	72,9	8,3	74,0	5,4	72,8	15,0
Deltametrina	109,1	17,1	88,8	6,8	91,7	16,8
Diazinona	114,7	11,0	88,1	5,2	92,9	18,5
Dicofol	94,0	11,2	70,9	6,8	72,5	8,7
Dieldrin	94,9	17,0	75,6	1,8	71,8	10,4
Difenoconazole	102,5	7,8	90,8	8,5	93,3	11,9
Endosulfan alfa	76,9	8,3	74,7	4,2	82,7	15,2
Endosulfan beta	90,2	10,5	81,5	8,4	86,1	15,0
Endosulfan sulfato	91,3	12,3	93,7	8,2	97,8	12,9
Endrin I	86,7	16,7	75,4	7,9	76,7	16,0
Endrin II	75,5	12,6	74,8	10,9	74,1	11,7
Epoxiconazole I	117,1	6,2	84,5	8,3	87,3	10,9
Epoxiconazole II	106,5	9,3	91,2	7,3	88,1	13,6
Esfenvalerato	110,2	11,3	83,6	6,0	81,5	10,7
Fenitrotiona	100,5	16,3	98,8	5,5	88,9	12,1
Fenvalerato	103,3	8,2	92,5	5,5	90,0	15,7
HCH, alfa	96,3	17,1	84,7	5,3	89,8	11,7
HCH, delta	96,7	8,9	90,8	6,7	91,1	15,9
Heptacloro	82,7	14,5	70,6	2,8	74,0	16,3
Heptacloro epóxido endo	83,7	13,9	77,7	6,4	88,0	15,9
Heptacloro epóxido exo	82,7	14,5	77,2	6,3	86,8	11,9
Hexaclorobenzeno	56,8	8,1	44,3	9,1	62,9	5,7
Lindano	114,8	13,2	83,5	4,8	86,3	12,8
Malationa	99,0	12,3	100,2	7,8	101,0	14,8
Metidationa	105,5	4,8	105,2	8,6	94,2	6,8
Miclobutanil	115,4	9,5	95,3	7,5	96,5	9,4
Mirex	49,1	9,6	37,9	8,0	40,1	8,3
Parationa etílica	104,2	13,1	91,5	6,3	87,3	12,8
Parationa metílica	91,4	10,4	95,8	4,7	86,6	13,0
Permetrina	86,6	13,0	74,5	13,9	89,5	14,9
Pirazofós	104,2	4,6	92,6	6,8	81,7	14,6
Pirimifós etílico	114,8	8,3	87,6	4,8	90,8	6,8
Pirimifós metílico	91,1	15,2	85,7	5,3	91,5	6,5
Procimidona	115,7	11,9	93,3	6,3	89,7	8,1
Propiconazole I	113,4	7,4	85,8	8,9	87,7	14,8
Propiconazole II	117,4	7,3	96,2	9,9	84,0	13,0
Propoxur	101,9	12,5	88,6	6,1	92,5	8,3
Tetradifona	84,4	13,8	87,1	4,5	87,1	13,0

Analitos	Níveis de Fortificação					
	10 µg L ⁻¹		25 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹	
	Rec %	RSD	Rec %	RSD	Rec %	RSD
Triclorfon	101,5	11,4	95,5	6,2	90,8	9,7
Trifluralina	107,1	10,0	85,9	4,2	99,4	11,9

Como pode ser observado na Tabela 13, a maioria dos resultados obtidos apresentaram-se dentro do intervalo de 70 e 120% de recuperação e, portanto, o método está de acordo com os parâmetros exigidos para a exatidão do método, exceto para aldrin, hexaclorobenzeno e mirex que apresentaram valores de recuperação inferiores a 70%. A baixa recuperação destes compostos é esperada devido à grande afinidade dos mesmos pela matriz lipofílica. Embora estes compostos tenham apresentado percentuais de recuperação inferiores a 70%, estes ainda podem ser quantificados, pois segundo a SANCO (2009) dependendo da complexidade analítica e da amostra, os resultados obtidos podem ser corrigidos se a recuperação média for fora da faixa de 70 – 120%, mas com boa precisão.

A ciflutrina não apresentou sinal suficiente para a quantificação no nível de fortificação 10 µg L⁻¹, portanto não pode ser quantificada neste nível de fortificação.

As Figuras 12 e 13 representam graficamente o percentual de recuperação e de RSD dos 48 agrotóxicos analisados nos três níveis de fortificação (10,0; 25,0 e 50,0 µg L⁻¹), respectivamente.

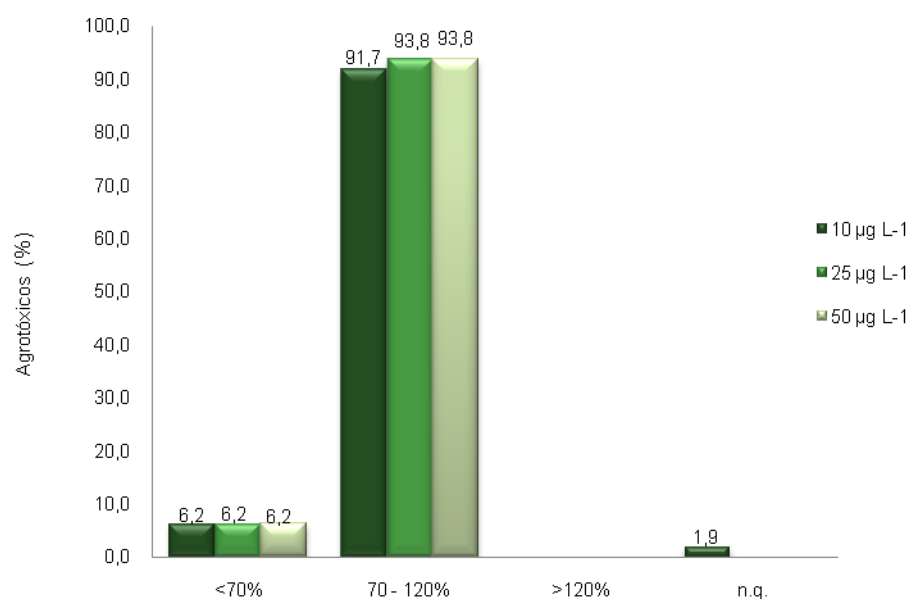


Figura 12 - Percentuais de recupera76o dos agrot6xicos para a repetitividade nos tr6s n6veis de fortifica76o (10,0; 25,0 e 50,0 µg L⁻¹).

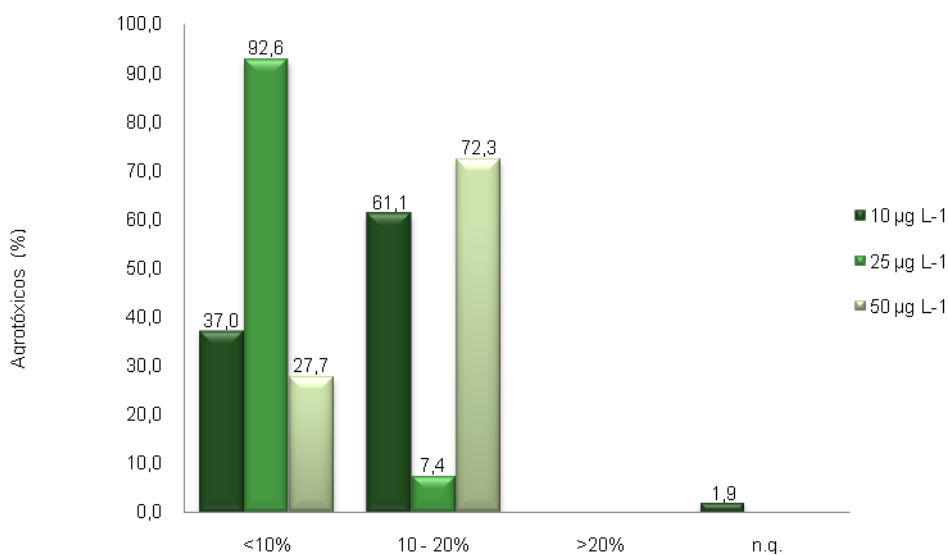


Figura 13 - Percentuais de RSD dos agrot6xicos para a repetitividade nos tr6s n6veis de fortifica76o (10,0; 25,0 e 50,0 µg L⁻¹).

4.5.4 Precisão do método (repetitividade) e precisão intermediária

A precisão do método QuEChERS otimizado neste estudo, foi avaliada em função da repetitividade e da precisão intermediária.

A precisão do método expressa pelo RSD para repetitividade ($n= 6$; 6 extrações x 1 injeção de cada extrato), foi considerada satisfatória, pois todos os compostos apresentaram RSD inferior a 20%. Sendo que 37,0; 92,6 e 27,7% dos compostos analisados, apresentaram RSD inferior a 10% nos níveis de fortificação de 10,0; 25,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, como pode ser visto na Figura 13. Os agrotóxicos aldrin, hexaclorobenzeno e mirex, que apresentaram recuperações inferiores a 70%, apresentaram RSDs inferiores a 10%, exceto aldrin que no nível de fortificação 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ apresentou RSD de 13,2%.

A avaliação da precisão intermediária foi realizada empregando-se dias diferentes daqueles dos estudos da repetitividade. O RSD_{pi} para a precisão intermediária variou na faixa entre 4,9 e 16,1% e foi avaliada somente para o nível de fortificação de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os valores de RSD e recuperação para a precisão intermediária estão apresentados na Tabela 14.

Para validação de métodos cromatográficos, na faixa de concentração avaliada nesse trabalho, recomenda-se que a precisão deve apresentar $\text{RSD} \leq 20\%$ (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2009). Portanto, todos os resultados obtidos para RSD estão dentro dos limites estabelecidos.

Tabela 14 - Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método.

Analitos	Nível de Fortificação 25 $\mu\text{g L}^{-1}$	
	$\text{Rec}_{\text{pi}} \%$	$\text{RSD}_{\text{pi}} \%$
4,4-DDE	78,5	13,5
Alacloro	98,5	11,4
Aldrin	68,1	7,4
Azoxistrobina	106,6	13,2
Bifentrina	80,1	7,6
Carbofuran	103,1	14,3
Cialotrina lambda I	103,6	8,2
Cialotrina lambda II	94,9	16,1
Ciflutrina I + II	117,0	4,9
Cipermetrina I	96,2	8,4
Cipermetrina II + III + IV	97,7	14,1
Clorpirifós etílico	97,1	8,9
Clorpirifós metílico	104,3	8,8
DDT I	82,3	7,9
DDT II	76,2	14,4

Analitos	Nível de Fortificação 25 µg L ⁻¹	
	Rec _{PI} %	RSD _{PI} %
Deltametrina	94,4	10,9
Diazinona	90,5	13,1
Dicofol	72,4	13,8
Dieldrin	85,8	11,1
Difenoconazole	107,0	10,5
Endosulfan alfa	95,1	10,7
Endosulfan beta	95,6	6,7
Endosulfan sulfato	107,5	8,3
Endrin I	95,0	13,6
Endrin II	96,6	9,8
Epoxiconazole I	103,9	8,0
Epoxiconazole II	114,1	7,4
Esfenvalerato	96,8	9,3
Fenitrothion	107,1	8,6
Fenvalerato	89,1	14,5
HCH, alfa	94,5	10,1
HCH, delta	99,7	11,7
Heptacloro	71,5	12,2
Heptacloro epóxido endo	92,2	7,5
Heptacloro epóxido exo	90,6	10,2
Hexaclorobenzeno	66,1	11,1
Lindano	106,9	8,3
Malationa	111,7	9,6
Metidationa	109,7	16,1
Miclobutanil	103,0	9,5
Mirex	43,7	7,5
Parationa etílica	117,1	7,0
Parationa metílica	112,3	12,6
Permetrina	74,6	8,1
Pirazofós	111,2	8,4
Pirimifós etílico	90,0	13,7
Pirimifós metílico	100,8	7,6
Procimidona	96,4	14,5
Propiconazole I	95,9	15,8
Propiconazole II	99,5	15,6
Propoxur	79,3	7,4
Tetradifona	100,3	6,3
Triclorfon	95,0	13,7
Trifluralina	95,7	11,5

4.6 Padrão interno (PI) e padrão de substituição (PS)

A fim de se obter maior confiabilidade nos resultados, foram utilizados no desenvolvimento deste trabalho dois PIs e um PS.

Os PIs não foram utilizados nos cálculos, foram utilizados com a finalidade de monitorar a repetitividade do sinal do sistema cromatográfico. Os compostos utilizados como PIs foram escolhidos por já terem sido utilizados como PIs para a

análise de agrotóxicos em outros trabalhos, bem como por não fazerem parte do PNCRC 2010. O trifenilfosfato foi utilizado como PI por ANASTASSIADES e colaboradores (2003a) e o quintozeno foi utilizado com padrão interno por PÉREZ-CARRERA e colaboradores (2007).

A trifluralina-d14 foi utilizada como PS e foi adicionada na amostra antes do procedimento de extração, com a finalidade de verificar problemas durante o procedimento de extração e limpeza. Vários trabalhos têm relatado a utilização de compostos deuterados com esta finalidade, como por exemplo, PÉREZ-CARRERA e colaboradores (2007).

4.7 Efeito Matriz

O efeito matriz sempre sofre variações ao longo do tempo e também varia dependendo da condição do instrumento utilizado, devendo, por isso, ser constantemente avaliado, tanto na etapa de desenvolvimento do método quanto na aplicação deste método nas análises de rotina (HAJSLOVÁ & ZROSTLÍKOVÁ, 2003).

A Tabela 15 e a Figura 14 apresentam o percentual de efeito matriz para os agrotóxicos analisados no extrato da matriz.

Tabela 15 - Percentual de efeito matriz para os agrotóxicos analisados por GC-MS/MS, no extrato do leite.

Analitos	Efeito matriz (%)
4,4-DDE	23,3
Alacloro	4,1
Aldrin	23,5
Azoxistrobina	13,5
Bifentrina	11,8
Carbofuran	17,5
Cialotrina lambda I	18,5
Cialotrina lambda II	-2,8
Ciflutrina I + II	5,7
Cipermetrina I	18,3
Cipermetrina II + III + IV	-6,8
Clorpirifós etílico	7,9
Clorpirifós metílico	8,6
DDT I	16,5
DDT II	11,5
Deltametrina	22,8
Diazinona	5,3
Dicofol	12,3
Dieldrin	20,3

Analitos	Efeito matriz (%)
Difenoconazole	11,4
Endosulfan alfa	6,7
Endosulfan beta	10,4
Endosulfan sulfato	8,0
Endrin I	19,3
Endrin II	16,3
Epoxiconazole I	28,0
Epoxiconazole II	15,3
Esfenvalerato	17,9
Fenitrotiona	1,5
Fenvalerato	3,9
HCH, alfa	7,6
HCH, delta	9,0
Heptacloro	23,4
Heptacloro epóxido endo	17,0
Heptacloro epóxido exo	11,8
Hexaclorobenzeno	16,1
Lindano	20,9
Malationa	6,8
Metidationa	5,5
Miclobutanil	13,3
Mirex	16,3
Parationa etílica	11,9
Parationa metílica	1,0
Permetrina I + II	19,0
Pirazofós	20,9
Pirimifós etílico	0,7
Pirimifós metílico	12,3
Procimidona	7,6
Propiconazole I	9,5
Propiconazole II	9,9
Propoxur	20,2
Tetradifona	18,3
Triclorfon	6,2
Trifluralina	8,0

Conforme apresentado na Tabela 15 e na Figura 14, os agrotóxicos cialotrina lambda I e cipermetrina II + III + IV, apresentaram resposta maior para os padrões preparados em acetonitrila quando comparado ao padrão preparado no extrato da matriz, apresentando efeito matriz “negativo”, ou seja, a resposta do detector é menor quando são injetados na presença de componentes da matriz. Entretanto, o efeito matriz não foi significativo, uma vez que, variações menores que 10% não são consideradas uma influência do efeito matriz e os compostos apresentaram efeito matriz de -2,8 e -6,8 respectivamente.

Para 40,7% dos agrotóxicos analisados, o efeito matriz é desprezível, pois as inclinações das curvas analíticas preparadas em acetonitrila e no extrato da matriz são correspondentes, sugerindo assim que esses compostos não apresentaram

efeito matriz, ou seja, a presença de componentes da matriz não interferiu significativamente na análise cromatográfica.

No entanto, para 59,3% dos compostos analisados, o padrão preparado na matriz apresentou uma resposta $\geq 10\%$ da resposta obtida para o padrão preparado em acetonitrila, pois o aumento do coeficiente angular foi mais expressivo. Dessa maneira, compostos que apresentam efeito matriz “positivo”, apresentam valores maiores de área quando injetado na presença de componentes da matriz, em comparação ao padrão preparado em acetonitrila.

Devido a constatação da presença do efeito matriz nas curvas analíticas de alguns compostos estudados, as soluções analíticas devem ser preparadas nos extratos da matriz para a quantificação de resíduos de agrotóxicos nas amostras de leite analisadas por GC-MS/MS.

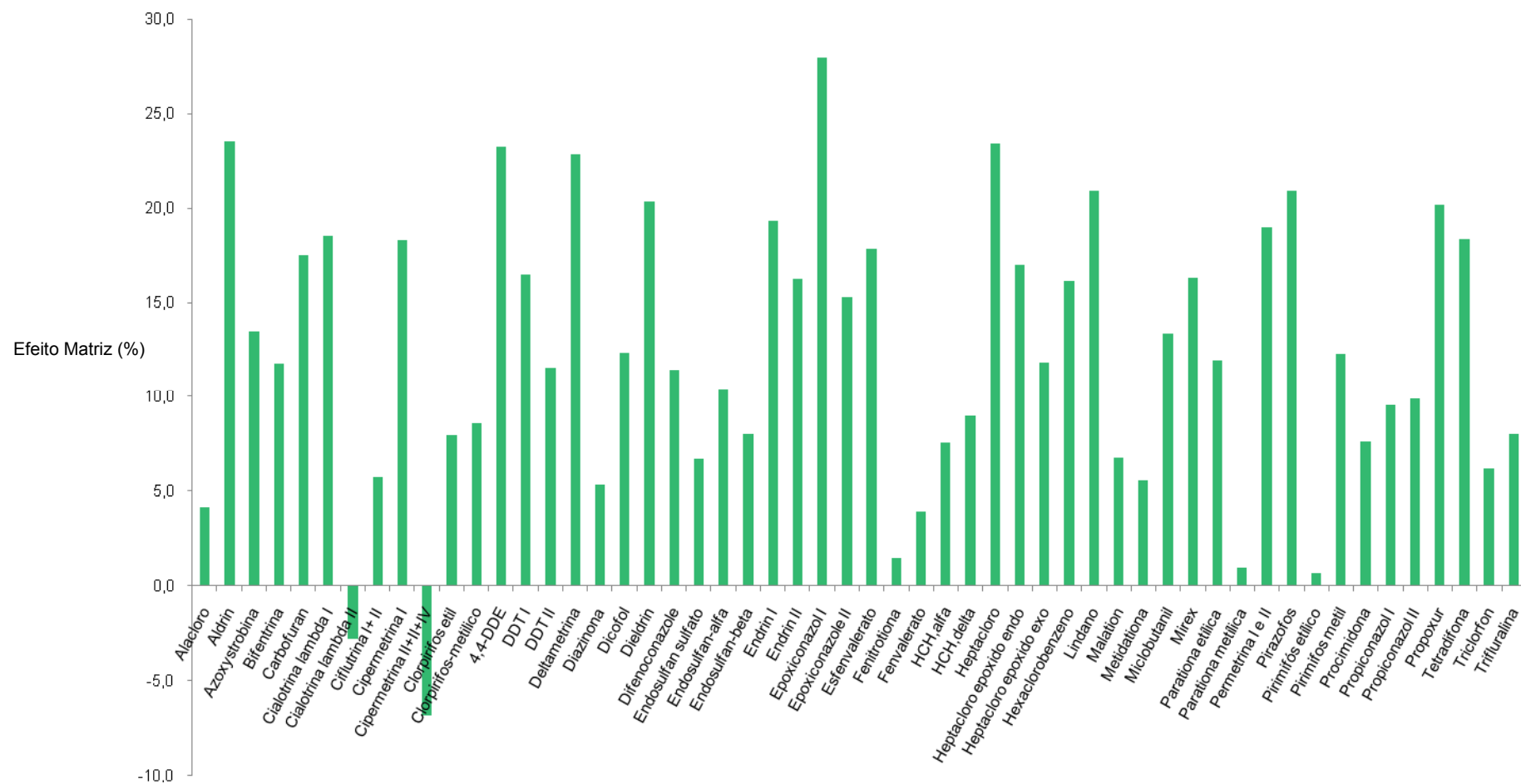


Figura 14 - Representação percentual de efeito matriz para os agrotóxicos analisados por GC-MS/MS, no extrato do leite.

4.8 Aplicação do método

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de 45 resíduos de agrotóxicos em quatro amostras de leite do tipo UHT adquiridas em supermercado local.

As amostras de leite foram preparadas conforme o método validado. As concentrações dos agrotóxicos encontrados nas amostras estão demonstradas na Tabela 16.

Tabela 16. Resultado das quatro amostras de leite UHT integral analisadas.

COMPOSTOS	AMOSTRAS			
	A1 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	A2 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	A3 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	A4 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Lindano	n.d.	< LOQ	n.d.	1,1
Cipermetrina	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.
Demais compostos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Os cromatogramas das amostras com resultado positivo estão demonstrados nas Figuras 15 e 16.

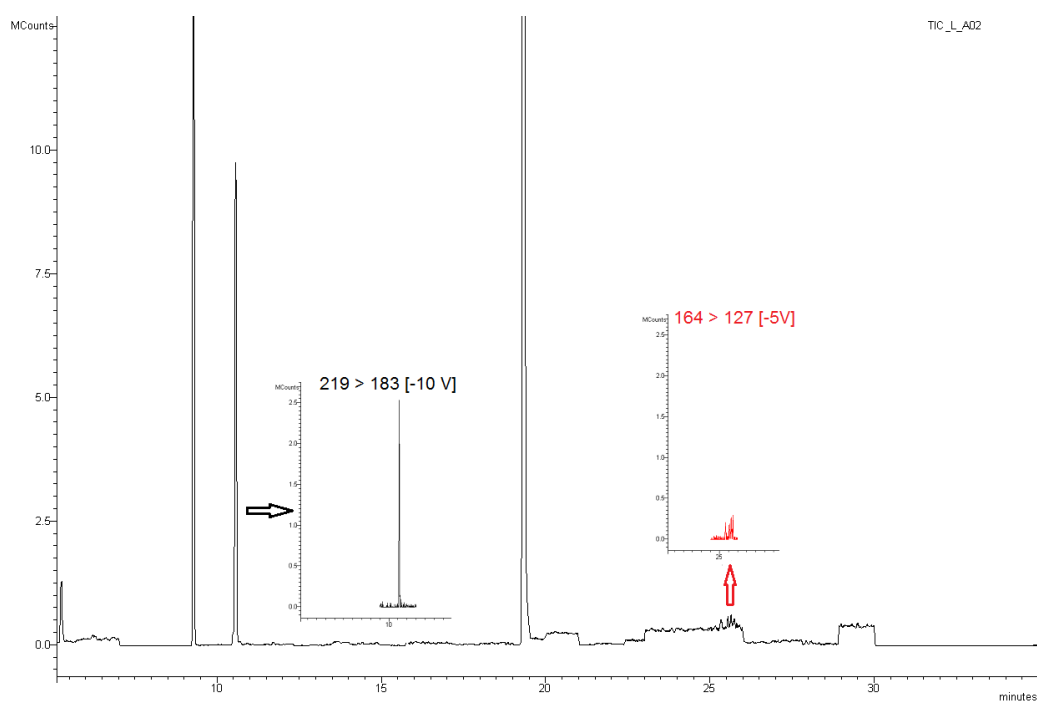


Figura 15 - Cromatograma referente à amostra de leite número 2.

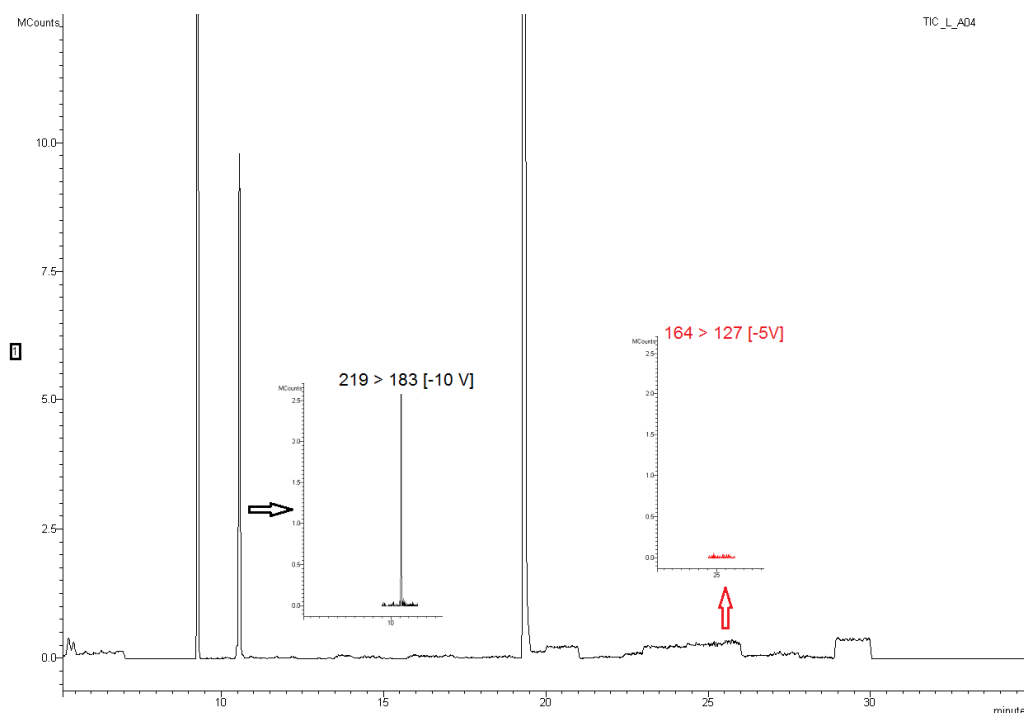


Figura 16 - Cromatograma referente à amostra de leite número 4.

Neste trabalho foram analisadas 4 amostras, das quais duas apresentaram contaminação por resíduos de agrotóxicos (Tabela 16), sendo estes encontrados em concentrações bem abaixo dos seus respectivos LMRs.

CISCATO e colaboradores (2002) avaliaram a presença de 23 resíduos de agrotóxicos de diferentes classes em leite de vaca consumido em São Paulo. Foram analisadas 94 amostras de leite pasteurizado, sendo que 8,5% destas estavam contaminadas com endossulfan (alfa e beta) em níveis abaixo de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ (na gordura) e 1,1% das amostras apresentaram contaminação por alfa-HCH na concentração de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ (na gordura).

Outros trabalhos também relataram a presença de lindano e cipermetrina em amostras de leite, HECK *et al.* (2007) avaliaram a presença de organoclorados em leite no Rio Grande do Sul e constataram a presença de lindano em 95,1% das amostras analisadas em concentrações que variaram de 0,3 a $68,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ de gordura, outros compostos organoclorados também foram encontrados como hexaclorobenzeno, DDT, PCBs, Aldrin, entre outros. No Egito ABOU-DONIA e colaboradores (2010) analisaram organoclorados, sendo que 43,3% das amostras apresentaram lindano com concentrações variando de 12 a $46 \mu\text{g kg}^{-1}$ de gordura. Sendo que lindano, hexaclorobenzeno e aldrin foram os agrotóxicos encontrados com maior frequência nas amostras.

RODRIGUES e colaboradores (2011) avaliaram a persistência de alguns resíduos de agrotóxicos organofosforados em amostras de leite de vacas expostas aos mesmos. Resíduos de clorpirifós foram encontrados dentro de um período de 24 h em concentrações abaixo do LOQ ($13,7 \mu\text{g L}^{-1}$). GOULART e colaboradores (2008) analisaram deltametrina e cipermetrina em amostras de leite integral e bebida láctea comercializadas em Viçosa (MG) e as concentrações de deltametrina variaram $< 0,25$ até $1,45 \mu\text{g L}^{-1}$ e as concentrações de cipermetrina variaram de $<0,25$ até $3,68 \mu\text{g L}^{-1}$. BRONDI e colaboradores (2011) monitoraram a concentração de cipermetrina no leite de 3 animais tratados com cipermetrina, após o tratamento foram feitas amostragens diárias até que não foi mais detectado cipermetrina nas amostras. Nas amostras de dois animais tratados com cipermetrina a concentração encontrada foi inferior ao LOQ e no terceiro animal, no quinto dia após o tratamento a concentração encontrada foi o dobro do LMR estabelecido pela legislação brasileira, sendo que até o sétimo dia ainda foram encontrados resíduos de cipermetrina nesta amostra. PRESTES (2011) analisou doze amostras de leite UHT comercializadas em Santa Maria (RS) e não encontrou a presença de nenhum dos agrotóxicos analisados. Na Espanha FERNANDEZ-ALVAREZ e colaboradores (2008) analisaram 35 amostras de leite adquiridas comercialmente e encontraram somente clordano na concentração de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ de gordura em uma única amostra.

Os compostos organoclorados por serem lipofílicos, dificilmente são metabolizados e por isso a exposição de organismos vivos a estes compostos proporciona a acumulação e a persistência destes nos tecidos adiposos (FALANDYSZ *et al.*, 2004). Sendo assim, compostos orgânicos persistentes como os organoclorados concentram-se na gordura do leite (LOSADA *et al.*, 1996) e sua presença em produtos lácteos pode refletir a contaminação ambiental da região e pode ser de grande valor para o conhecimento científico e para a saúde pública (HECK *et al.*, 2007). Agrotóxicos organoclorados foram proibidos em muitos países a partir de 1970 e estudos de monitoramento tem mostrado que a presença destes resíduos tem diminuído com o passar dos anos (CISCATO *et al.*, 2002).

O uso agrícola do lindano foi cancelado, pela Portaria do Ministério da Agricultura n. 329, de 02 de setembro de 1985 e a sua monografia foi excluída, pelo Ministério da Saúde, através da Portaria n. 11, de 08 de janeiro de 1998 que proibiu seu uso em campanhas de saúde pública e como domissanitários, restando somente o seu uso como preservante de madeiras.

A contaminação do leite por cipermetrina pode ocorrer devido a aplicação do mesmo em rebanhos leiteiros contra carrapatos bovinos (*Boophilus microplus*) (BRONDI *et al.*, 2011) pela aplicação como domissanitários nas áreas de processamento do leite bem como em currais (VENANT *et al.*, 1990) e pela aplicação como agrotóxico em algumas culturas como milho, algodão e soja (ANVISA, 2010) que poderão ser usados na alimentação de animais.

Conforme observado pelo resultado das análises das amostras avaliadas, não há nenhuma indicação de riscos importantes para a saúde, em relação aos compostos avaliados, associada ao consumo de leite na cidade de Santa Maria.

5 CONCLUSÕES

Concluiu-se que o método de extração QuEChERS modificado aliado a etapa de limpeza por d-SPE seguido por análise com GC-MS/MS é eficiente para a extração e determinação de 45 dos 48 agrotóxicos/produtos de degradação em leite bovino avaliados neste estudo. Dos 43 agrotóxicos monitorados pelo PNCRC 2010, 28 foram contemplados no método desenvolvido, sendo que três (aldrin, hexaclorobenzeno e mirex) não puderam ser quantificados, pois apresentaram recuperações inferiores a 70% e somente dois (endrin e heptacloro) não alcançaram os limites máximos permitidos (LMR) pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Este método demonstrou ser eficiente para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos, apresentando resultados satisfatórios para recuperações, as quais se situaram na faixa entre 71,1 e 117,4%, para 45 dos 48 compostos avaliados, com valores de RSD \leq 17,3%. O método QuEChERS otimizado nesse trabalho apresentou baixos limites de detecção ($LOD_m = 0,3$ a $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$) e baixos limites de quantificação ($LOQ_m = 1,0$ a $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$), para a maioria dos agrotóxicos estudados, exceto para a ciflutrina que apresentou LOD de $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e LOQ de $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

As curvas analíticas demonstraram linearidade entre 1,0; 2,0; 5,0 ou 10,0 a $200,0 \mu\text{g L}^{-1}$, com valores de coeficiente de determinação (r^2) $> 0,99$ para a maioria dos compostos quando a curva foi preparada no extrato da matriz, exceto Cipermetrina II + III + IV que apresentou r^2 de 0,9895. Para a curva analítica preparada no solvente, apenas quatro compostos apresentaram r^2 inferiores a 0,99. Todos os compostos apresentaram valores de r^2 adequados, segundo a literatura.

Tendo em vista que a obtenção de extratos limpos para a posterior injeção é de extrema importância para preservar o sistema cromatográfico, a etapa de limpeza dispersiva, utilizando sulfato de magnésio e sorventes PSA e C_{18} , demonstrou ser adequada para o objetivo proposto, pois conseguiu remover grande quantidade de lipídeos obtendo-se, desta forma, extratos mais limpos.

As soluções analíticas utilizadas para a confecção das curvas de calibração devem ser preparadas em extratos “branco” da matriz, devido ao método ter evidenciado um significativo efeito matriz, constatando-se dessa maneira, a

necessidade de se utilizar curvas preparadas no extrato da matriz e não em solvente, evitando-se assim, resultados falsos nas análises.

O método validado foi aplicado para a determinação de resíduos de 45 agrotóxicos/produtos de degradação em amostras de leite UHT, mostrando-se bastante eficiente.

O método desenvolvido provou que é possível a realização de análises com menor quantidade de amostra e conseqüentemente com redução na quantidade solvente de extração, sais e sorventes. A diminuição de sais, sorventes e solvente durante as etapas de extração e limpeza, foram avaliadas visando diminuir os gastos e minimizar os impactos ambientais.

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o método de extração QuEChERS modificado otimizado neste trabalho, apresenta como vantagens em relação aos métodos tradicionais de extração, ser um procedimento simples e rápido, com um menor número de etapas analíticas, o que diminui a probabilidade de erros, além de ser barato e ambientalmente correto, devido ao baixo consumo de solventes orgânicos. Também mostrou-se adequado a análise de resíduos de agrotóxicos em leite, podendo ser utilizado em análises de rotina de laboratórios, visto que, todos os parâmetros de validação encontraram-se dentro dos limites exigidos para validação de métodos cromatográficos, atendendo satisfatoriamente os objetivos traçados neste trabalho.

6 DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS

As atividades laboratoriais normalmente geram resíduos líquidos e sólidos proveniente dos ensaios analíticos, que devem ser tratados e descartados de forma adequada.

Os resíduos líquidos gerados durante o desenvolvimento deste trabalho foram recolhidos separados e em frascos rotulados como resíduos halogenados e resíduos não-halogenados. Os resíduos sólidos foram colocados em sacos plásticos devidamente identificados. Ambos os resíduos sólidos e líquidos foram encaminhados ao Almoxarifado do Departamento de Química da UFSM para posterior tratamento e descarte.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar outros solventes de extração para avaliar a possibilidade da extração dos compostos que não foram satisfatoriamente extraídos com o método desenvolvido neste trabalho;
- Ampliar o escopo dos compostos a serem analisados;
- Avaliar a aplicabilidade do método para diferentes tipos de leites (*in natura*, desnatado e semi-desnatado);
- Avaliar diferentes quantidades de MgSO_4 , visando melhorar a recuperação de alguns compostos.
- Avaliar a possibilidade de aplicação deste método para outros tipos de leite (cabra, ovelha, búfala).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005. **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**. 2ª ed., 2005.

ABOU DONIA, M. A.; ABOU-ARAB, A. A. K.; ENB, A.; EL-SENAITY, M. H.; ABD-RABOU, N. S. Chemical composition of raw milk and the accumulation of pesticides residues in milk products. **Global Veterinaria**, v. 4, p. 06-14, 2010.

ALDER, L.; GREULICH, K.; KEMPE, 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.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J.; Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticides in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003a.

ANASTASSIADES, M.; MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of analyte protectants to improve gaschromatographic analysis of pesticides. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, p.163-184, 2003b.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 de junho de 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 02 jan. 2012.

ANVISA. Índice Monográfico – Cipermetrina, 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/629dd00047458760914ad53fbc4c6735/C10++Cipermetrina.pdf?MOD=AJPERES&useDefaultText=0&useDefaultDesc=0>> Acesso em: 05 mar. 2012.

ARGAUER, R. J.; LEHOTAY, S.J.; BROWN, R. T. Determining Lipophilic Pyrethroids and Chlorinated Hydrocarbons in Fortified Ground Beef Using Ion-Trap Mass Spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 3936-3939, 1997.

BAIRD, C e CANN, M. **Química Ambiental**. 4ª ed. - Porto Alegre: Bookman, 2011, 644 p.

BASTOS, L. H. P.; CARDOSO, M. H. W. M.; NÓBREGA, A. W.; JACOB, S. do C. Possíveis fontes de contaminação do alimento leite, por agrotóxicos, e estudos de monitoramento de seus resíduos: uma revisão nacional. **Cad. Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro, v. 19, p. 51-60, 2011.

BENDASSOLLI, J. A.; MORTATTI, J.; TRIVELIN, P. C. O.; IGNOTO, R. de F.; BONASSI, J. A.; TAVARES, G. A. Reciclagem de cobre proveniente de analisador automático de carbono e nitrogênio. **Química Nova**, vol. 25, p. 312-315, 2002.

BOGIALLI, S.; CURINI, R.; CORCIA, A. Di; LAGANA`, A.; STABILE, A.; STURCHIO, E. Development of a multiresidue method for analyzing herbicide and fungicide residues in bovine milk based on solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1102, p. 1-10, 2006.

BRASIL, 1999. Instrução Normativa nº 42 de 20 de dezembro de 1999. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em carne-PNCRC, mel-PCRL, Leite-PNCRL e Pescado-PCRP. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília p. 213, 22 dez. 1999. Seção 1.

BRASIL, 2002a. 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: 30/11/2011.

BRASIL, 2002b. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Ministério da Agricultura e Abastecimento, gabinete do ministro. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 13, 18 set. 2002. Seção 1.

BRASIL, 2010. MAPA/PNCRC. Instrução Normativa nº 08 de 29 de abril de 2010. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aprova os Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado para o exercício de 2010. **Diário Oficial União**, p. 27, 03 maio 2010. Seção 1.

BRASIL, 2011a. **Intercâmbio comercial do agronegócio: principais mercados de destino**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Relações Internacionais do Agronegócio. Brasília, 2011.

BRASIL, 2011b. **Brasil projeções do agronegócio 2010/2011 a 2020/2021**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Assessoria de gestão estratégica. Brasília, 2011.

BRASIL, 2011c. Instrução Normativa nº 06 de 25 de fevereiro de 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Publicar os resultados do acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes dos subprogramas de monitoramento e exploratório em Carnes (Bovina, Suína, Aves e Equina), Leite, Ovos, Mel e Pescado do exercício de 2010. **Diário Oficial União**, p. 4, 28 fevereiro 2011. Seção 1.

BRITO, N. M; JUNIOR, O. P. de A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégias e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, 2003.

BRONDI, S. H. G; MACEDO, A. N. de; SOUZA, G. B. de; NOGUEIRA, A. R. A; Application of QuECHERS method and gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of cypermethrin residue in milk. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 46, p. 1–7, 2011.

CISCATO, C. H. P.; GEBARA, A. B.; SPINOSA, H. S. Pesticide residues in cow Milk consumed in São Paulo city (Brazil). **J. Environ. Sci. Health B**, v. 37, p. 323-330, 2002.

CHEN, A. W.; FINK, J. M.; LETINSKI, D. J. Analytical methods to determine residual cypermethrin and its major acid metabolites in bovine milk and tissues. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 3534-3539, 1996.

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

CHUNG, S. W. C. e CHEN, B. L. S. Determination of organochlorine pesticide residues in fatty foods: A critical review on the analytical methods and their testing capabilities. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 5555– 5567, 2011.

CODEX ALIMENTARIUS, **Pesticide Residues in Food and Feed**. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/pesticides/index.html>> Acesso em: 16 jan. 2012.

CODEX ALIMENTARIUS. **Pesticides Residues in Food and Feed – Glossary of terms**. 2010. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/reference/glossary.html>>. Acesso em: 1º fev. 2012.

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

Compendium of Pesticides Common Names. Disponível em: <<http://www.alanwood.net/pesticides/index.html>> Acesso em: 28 jan. 2012.

CORILO, Y. E. **Espectrometria de Massas – Capítulo 2: Analisadores de Massas**. 2009. Disponível em: <<http://www.espectrometriademassas.com.br>>. Acesso em 1º fev. 2012.

CONSELHO DAS COMUNIDADES EUROPEÍAS. Regulamento (CEE) N° 315/93 do Conselho das Comunidades Europeias de 8 de fevereiro de 1993, que proíbe a colocação no mercado de gêneros alimentícios que contenham uma quantidade inaceitável de substâncias residuais, conhecidas por contaminantes. Disponível em: <http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/contamination_environmental_f_actors/l21113_pt.htm#amendingact> Acesso em: 20 dez. 2011.

COSCOLLÀ, C.; CASTILLO, M.; PASTOR, A.; YUSÀ, V. Determination of 40 currently used pesticides in airborne particulate matter (PM 10) by microwave-

assisted extraction and gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 693, p. 72-81, 2011.

COSTA, A. da S. **Avaliação da Presença de Resíduos de Antimicrobianos em Leite e Bebida Láctea UHT por Teste de Inibição Microbiana Comercial**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

CQUALI LEITE, 2008. **Composição química do leite**. Disponível em: <<http://www.qualidadedoleite.gov.br/data/Pages/MJ8F0048E8ITEMIDFBD8A1EB007A4CADBEF09F29C15C6431PTBRIE.htm>> Acesso em: 28 nov. 2011.

CUADROS-RODRIGUEZ, L.; GAÈMIZ-GRACIA, L.; ALMANSA-LÓPEZ, E. M.; BOSQUE-SENDRA J. M. Calibration in Chemicals measurement processes. II. A methodological approach. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, p. 620-636, 2001.

DAGNAC, T.; GARCIA-CHAO, M.; PULLEIRO, P.; GARCIA-JARES, C.; LLOMPART, M. Dispersive solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multi-residue analysis of pesticides in raw bovine milk. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 3702-3709, 2009.

DI BELLA, G.; LICATA, P.; BRUZZESE, A.; NACCARI, C.; TROMBETTA, D.; LO TORCO, V.; DUGO, G.; RICHETTI, A.; NACCARI, F. Levels and congener pattern of polychlorinated biphenyl and organochlorine pesticide residues in bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) from the Straits of Messina (Sicily, Italy). **Environment International**, v. 32, p. 705–710, 2006.

EFSA – European Food Safety Authority. **Maximum residue levels**. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/pesticides/mrls.htm>> Acesso em: 20 dez. 2011.

EMBRAPA. **Composição do leite**. 2007. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html>. Acesso em: 28 set. 2011.

EMBRAPA. **Principais países produtores de leite no mundo–2009**. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0212.php>> Acesso em: 1º nov. 2011.

EMBRAPA. **Sistema de criação de bovinos de leite para a região sudoeste do Rio Grande do Sul**. 2008. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/BovinoLeiteRegiaoSudoesteRioGrandeSul/importancia.htm>> Acesso em: 1º nov. 2011.

EU **Pesticides database**. Disponível em: <http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=commodity.selection> Acesso em: 14 jan. 2012.

FALANDYSZ, J.; WYRZYKOWSKA, B.; WARZOCHA, J.; BARSKA, I.; GARBACIK-WESOLOWSKA, A.; SZEFER, P. Organochlorine pesticides and PCBs in perch

Perca fluviatilis from the Odra/Oder river estuary, Baltic sea. **Food Chemistry**, v. 87, p. 17–23, 2004.

FAO (**Food and agriculture organization of the United Nations**), 2005. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/375/default.aspx>>. Acesso em: 30 nov. 2011.

FERNANDEZ-ALVAREZ, M.; LLOMPART, M.; LAMAS, J. P.; LORES, M.; GARCIA-JARE, C.; CELA, R.; DAGNAC, T. Development of a solid-phase microextraction gás chromatography with microelectron-capture detection method for a multiresidue analysis of pesticides in bovine milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 617, p. 37–50, 2008.

GONZÁLEZ-RODRIGUES, F.; LIÉBANAS, A. J. F.; FRENCH, G. A.; LÓPEZ, S. J. F. Determination of pesticides and some metabolites in different kinds of milk by solid-phase microextraction and low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 164-172, 2005.

GOULART, S. M.; QUEIROZ, M. E. L. R. de; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J.H. de. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, p. 1320–1323, 2008.

HAJSLOVÁ, J.; HOLADOVA, K.; KOCOUREK, V.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; CUHRA, P.; KEMPNY, M. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 800, p. 283–295, 1998.

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

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro, RJ: 7ª ed. Editora LTC, 2008, 886 p.

HECK, M.C.; SANTOS, S. dos; JUNIOR, S. B.; COSTABEBER, I.; EMANUELLI, T. Estimation of children exposure to organochlorine compounds through milk in Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Chemistry**, v. 102, p. 288–294, 2007.

HERCEGOVA, A.; DOMOTOROVA, M.; MATISOVA, A. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 54-73, 2007.

HONG, J.; KIM, H.; KIM, D.; SEO, J.; KIM, K. Rapid determination of chlorinated pesticides in fish by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, p. 27–35, 2004.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2010**. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão/Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Volume 38. Brasil, 2010.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, revisão 02, 2007.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, A. A.; QUEIROZ, N. C. S. Resíduos de Agrotóxicos em alimentos: Uma preocupação ambiental Global - Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, 2009, v. 32, n. 4, p. 996-1012.

JARDIM, A. N.O. e CALDAS, E. D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para a saúde. **Química Nova**, 2009, v. 32, n. 1, p. 1898-1909.

JIMENEZ, J.J.; BERNAL, J.L.; NOZAL, M. J. del; TORIBIO, L.; E. ARIAS, E. Analysis of pesticide residues in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with electron capture and nitrogen-phosphorus detection. **Journal of Chromatography A**, v. 919, p. 147-156, 2001.

JUHLER, R. K. Optimized method for the determination of organophosphorus pesticides in meat and fatty matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 786, p. 145-153, 1997.

KAN, A. C.; MEIJER, L. A. G. The risk contamination of food with toxic substances present in animal feed. **Animal Feed Science and Terminology**, v. 133, p. 84 -108, 2007.

KOLBERG, D. I. S. Desenvolvimento e validação de método multiresíduo empregando GC-MS (NCI-SIM) para determinação de pesticidas em grãos de trigo e seus produtos processados. **Tese de Doutorado em Química**, UFSM, Santa Maria, 2008.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 1663, 2007.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: RiMa, 2004, 62p.

LÁZARO, R.; HERRERA, A.; ARIÑO, A.; CONCHELLO, M. P.; BAYARRI, S. Organochlorine Pesticide Residues in Total Diet Samples from Aragón (Northeastern Spain). **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 2742-2747, 1996.

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

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

LEHOTAY, S. J.; KOK, A de.; HIEMSTRA, M., VAN BODEGRAVEN, P. 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, 2005b.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKÁ, K.; YUN, S.J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 630-638, 2005c.

LEHOTAY, S. J. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 90, p. 485-520, 2007.

LINGEMAN, H. **How to select a technique**. Chromedia 2012. Disponível em: <<http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=xqegzCsHqnOxmOIIcCbC&subNav=yarwnEsHqnOxmOIIcCbCxBWT>>. Acesso em: 05 mar. 2012.

LISKA, I. ; J. SLOBODNIK, J. Comparison of gas and liquid chromatography for analysing polar pesticides in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 733, p. 235-258, 1996.

LOSADA, A.; FERNÁNDEZ, N.; DIEZ, M. J.; TERÁN, M. T.; GARCÍA, J. J.; SIERRA, M. Organochlorine pesticide residues in bovine milk from León (Spain). **The Science of the Total Environment**, v. 181, p. 133-135, 1996.

MADALENA, F. E. Valores econômicos para a seleção de gordura e proteína do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v. 29, n.3, p. 678-684, 2000.

MANSSON, H. L. Fatty acids in bovine milk fat. **Food & Nutrition Research**, v. 52, p. 1-3, 2008.

MARASCHIN, L. Avaliação do grau de contaminação por pesticidas na água dos principais rios formadores do Pantanal Mato-Grossense. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da Universidade Federal do Mato Grosso. 2003.

MARTINS, P.C.; YAMAGUCHI, L. C.; ARCURI, P.B.; ARCURI, E.F. **Pagamento por qualidade no Brasil: motivações e obstáculos**, 2004. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/mercado/conjuntura-de-mercado/pagamento-por-qualidade-no-brasil-motivacoes-e-obstaculos-20987n.aspx>>. Acesso em: 29 nov. 2011.

MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, p. 259-272, 2004.

MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY S. J.; ANASTASSIADES, M. Combination of analyte protectants to overcome matrix effects in routine GC analysis of pesticide residues in food matrixes. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 8129-8137, 2005.

McLEOD, H. A.; WALES, P. J. A Low Temperature Cleanup Procedure for Pesticides and Their Metabolites in Biological Samples. **J. Agr. Food Chem.**, v.20, p. 624-627, 1972.

MCKINLAY, R.; PLANT, J. A.; BELL, J. N.; VOULVOULIS, N. Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment. **Environment International**, v. 34, p. 168-183, 2008.

PACÁKOVÁ, V.; STULÍK, K.; JISKRA, J. High-performance separations in the determination of triazine herbicides and their residues. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 17-31, 1996.

PAGLIUCA, G.; Teresa GAZZOTTI, T.; ZIRONI, E.; STICCA, P. Residue analysis of organophosphorus pesticides in animal matrices by dual column capillary gas chromatography with nitrogen–phosphorus detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1071, p. 67–70, 2005.

PAN Pesticide Database. Disponível em: <<http://www.pesticideinfo.org>> Acesso em: 28 jan. 2012.

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

PATEL, K.; FUSSELL, R. J.; HETMANSKI, M.; GOODALL, D. M.; KEELY B. J. Evaluation of gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry for the determination of organochlorine pesticides in fats and oils. **Journal of Chromatography A**, v. 1068, p. 289–296, 2005.

PEREDA, J. A. O.; RODRÍGUES, M. I. C.; ÁLVARES, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. DE F.; PERALES, L. DE LA H.; CORTECERO, M. D.S. **Tecnologia de alimentos**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 279 p.

PÉREZ-CARRERA, E.; LEÓN, V. M. L.; PARRA, A. G.; GONZÁLEZ-MAZO, E. Simultaneous determination of pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in seawater and interstitial marine water samples, using stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1170, p. 82–90, 2007.

PICÓ, Y.; BLASCO, C.; FONT, G. Environmental and food applications of LC-tandem mass Spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview. **Mass Spectrometry Reviews**, v.23, p. 45-85, 2004.

PICÓ, Y.; FERNÁNDEZ, M.; RUIZ, M. J.; FONT, G. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment, **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 70, p. 117–131, 2007.

PICÓ, Y.; FONT, G.; RUIZ, M.J.; FERNANDEZ, M. Control of pesticides residues by liquid chromatography-mass spectrometry to ensure food safety. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, p. 917-960, 2006.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Efeito matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, 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, p. 909-913, 2010.

PITARCH, E.; MEDINA, C.; PORTOLES, T.; LÓPEZ, F. J.; HERNÁNDEZ, F. Determination of priority organic micro-pollutants in water by gás chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 583, p. 246–258, 2007.

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, p. 1620-1634, 2009.

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 de Doutorado em Química**, UFSM, Santa Maria, 2011.

PRZYBYLSKI, C.; SEGARD, C.; Method for routine screening of pesticides and metabolites in meat based baby-food using extraction and gas chromatography-mass spectrometry **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 1858-1867, 2009.

RASHID, A.; NAWAZ, S.; BARKER, H.; AHMAD, I.; M. ASHRAF, M. Development of a simple extraction and clean-up procedure for determination of organochlorine pesticides in soil using gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2933–2939, 2010.

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

RIBEIRO, F. A. de L., FERREIRA, M. M. C. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p. 164-171, 2008.

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

RODRIGUES, F. DE M.; MESQUITA, P. R. R.; OLIVEIRA, L. S. de; OLIVEIRA F. S. de; MENEZES FILHO, A.; PEREIRA, P. A. DE P.; ANDRADE, J. B. de. Development of a headspace solid-phase microextraction/gas chromatography–mass spectrometry method for determination of organophosphorus pesticide residues in cow milk. **Microchemical Journal**, v. 98, p. 56–61, 2011.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. **Introdução À Química Ambiental**. 2. ed. - Porto Alegre: Ed. Bookman, 2009, 256 p.

SANCO. **Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. Document N°. 10684/2009.

SANTOS, T. R. B.; FARIAS, N. A. R.; FILHO, N. A. C.; PAPPEN, F. G.; JUNIOR, I. S. V. Abordagem sobre o controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 65-70, 2009.

SCOTT, R. P. W. Analytical Spectroscopy - The quadrupole mass spectrometer. 2008. Disponível em: <<http://www.analyticalspectroscopy.net/ap8-23.htm>>. Acesso em: 05 fev. 2012.

SILVA, P. H. F. da; PORTUGAL, J. A. B; CASTRO, M. C.D. **Qualidade e competitividade em laticínios**. Juiz de Fora: Apamig/ILCT, 1999. 118p.

SOLER C.; PICÓ, Y. Recent trends in liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine pesticides and their metabolites in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 103-115, 2007.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Algunos aspectos de La detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 31-49, 2009.

STASHENKO, E. E. e MARTÍNEZ, J. R. GC-MS: Mas de um analisador de masas, ¿ para qué? **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 25-48, 2010.

STEFANELLI, P.; SANTILIO, A.; CATALDI, L.; DOMMARCO, R. Multiresidue analysis of organochlorine and pyrethroid pesticides in ground beef meat by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 44, p. 350–356, 2009.

STEPAN, R.; TICHA, J.; HAJŠLOVA, J. Baby food production chain: Pesticide residues in fresh apples and products. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 12, p. 1231-1242, 2005.

The e-Pesticide Manual, Version 3.0, 2003-04, 13^a Edition, Editor CDS Tomlin.

TSIPLAKOU, E.; ANAGNOSTOPOULOS C. J.; LIAPIS, K.; HAROUTOUNIAN, S. A.; ZERVAS, G. Pesticides residues in milks and feedstuff on farm animals drawn from Greece. **Chemosphere**, v. 80, p. 504-512, 2010.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 4 ed. – Santa Maria: Ed. UFSM, 2010, 195 p.

UNITED NATIONS, New York, 2011. **World Population Prospects The 2010 Revision**, Volume II: Demographic Profiles. Disponível em: <http://esa.un.org/unpd/wpp/Documentation/pdf/WPP2010_Volume-II_Demographic-Profiles.pdf> Acesso em: 12 mar. de 2012.

VENANT, A.; E.V. NESTE, E. V.; BORREL, S.; MALLET, J. Determination of residues of deltamethrin in milk and butter. **Food Addit. Contam.** v. 7, p. 117, 1990.

YAGÜE, C.; BAYARRI, S.; LÁZARO, R.; CONCHELLO, P.; ARIÑO, A.; HERRERA, A. Multiresidue Determination of Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Milk by Gas Chromatography with Electron-Capture Detection after Extraction by Matrix Solid-Phase Dispersion. **Journal of AOAC International**, v. 84, p. 1561-1568, 2001.

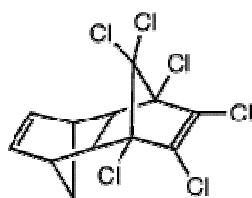
WALORCZYK, S. Development of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry II. Improvement and extension to new analytes. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, p. 202–214, 2008.

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

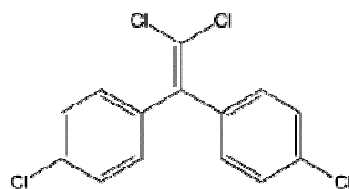
ZROSTLIKOVA, J.; HAJŠLOVA, J.; GODULA, M.; MASTOYSKA, K. Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 937, p. 73-86, 2001.

ANEXOS

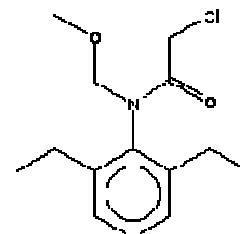
Anexo A : Fórmulas estruturais dos agrotóxicos estudados.



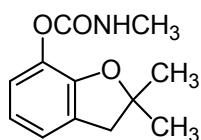
Aldrin



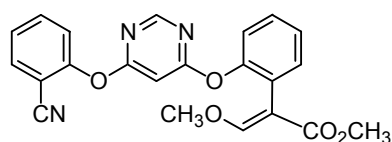
4,4-DDE



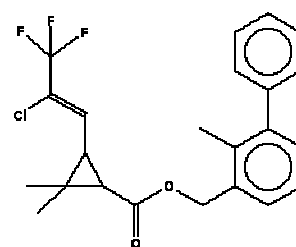
Alacloro



Carbofuran

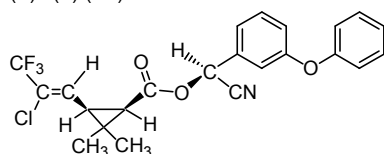


Azoxistrobina

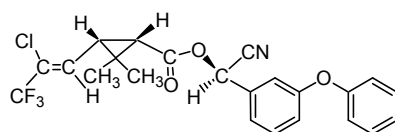


Bifentrina

(S) (Z)-(1R)-cis-

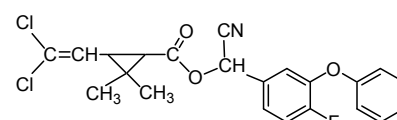


+

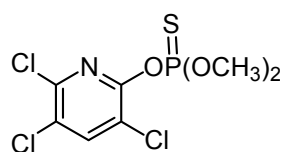


(R) (Z)-(1S)-cis-

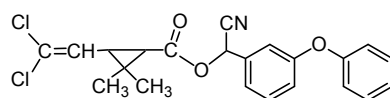
Cialotrina-lambda



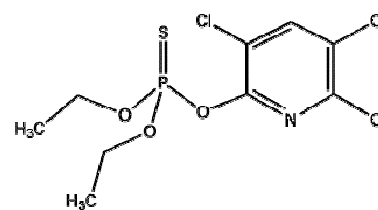
Ciflutrina



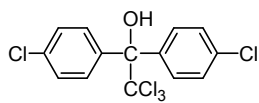
Clorpirifós metil



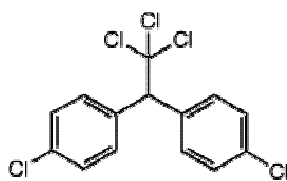
Cipermetrina



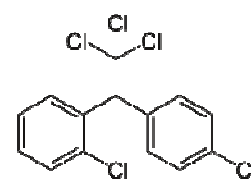
Clorpirifós etil



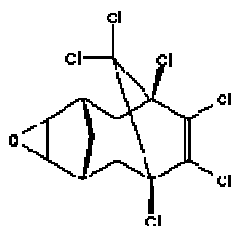
Dicofol



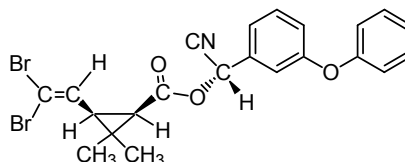
4,4-DDT



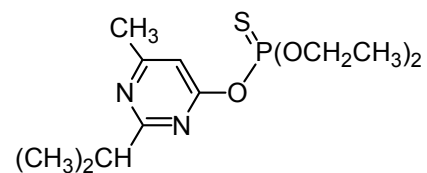
2,4-DDT



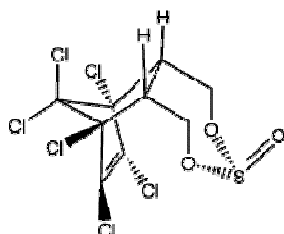
Dieldrin



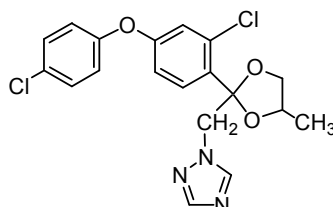
Deltametrina



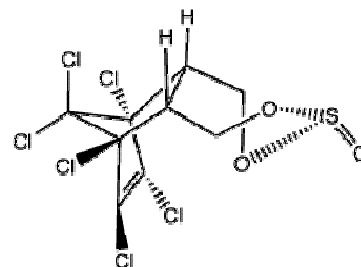
Diazinona



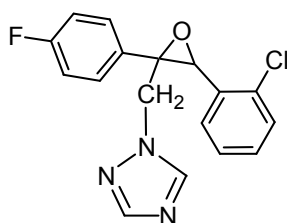
Endosulfan beta



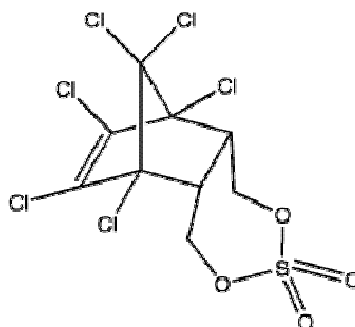
Difenoconazole



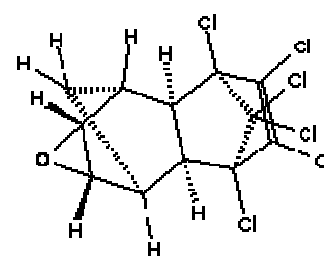
Endosulfan alfa



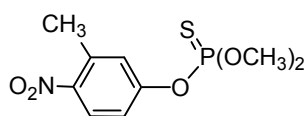
Epoxiconazole



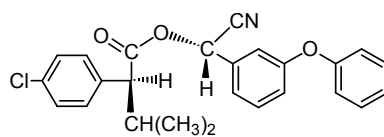
Endosulfan sulfato



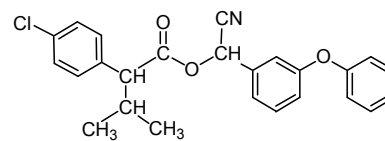
Endrin



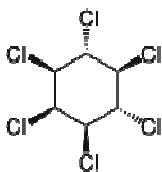
Fenitrotona



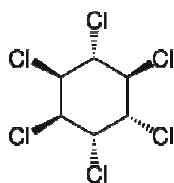
Esfenvalerato



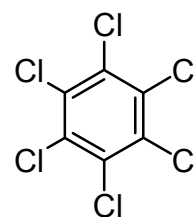
Fenvalerato



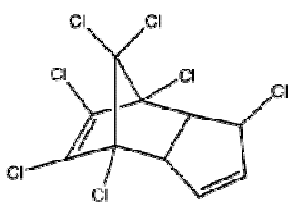
HCH delta



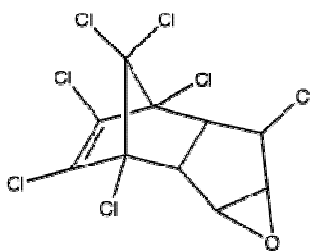
HCH alfa



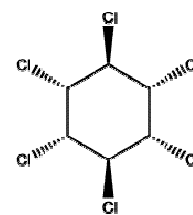
Hexachlorobenzeno



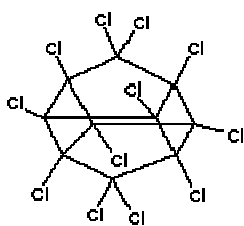
Heptachloro



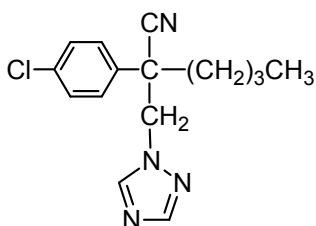
Heptachloro epóxido endo/exo



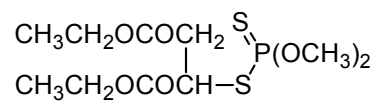
Lindano



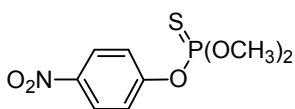
Mirex



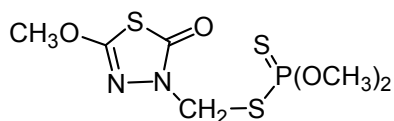
Miclobutanil



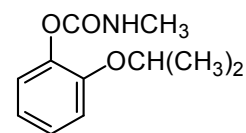
Malationa



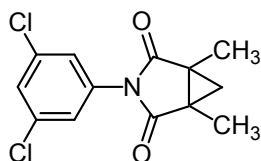
Parationa Metilica



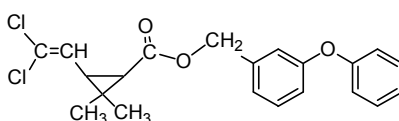
Metidationa



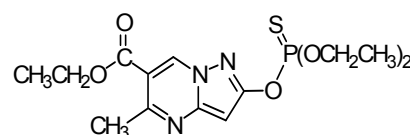
Propoxur



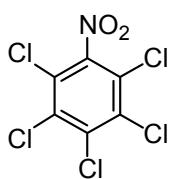
Procimidona



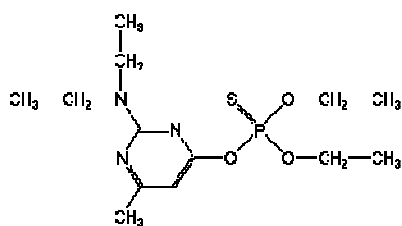
Permetrina



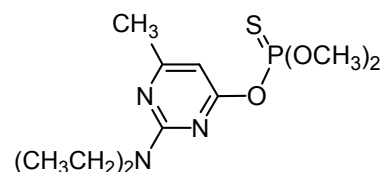
Pirazofós



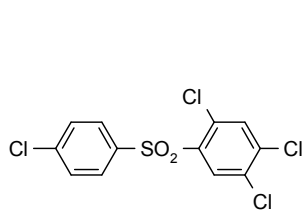
Quintozeno (PI)



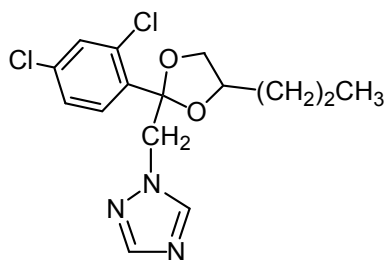
Pirimifós Etilico



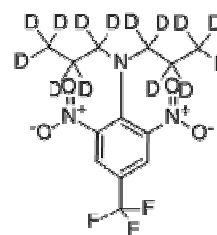
Pirimifós Metílico



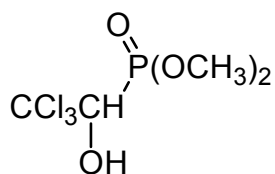
Tetradifona



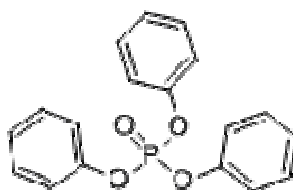
Propiconazole



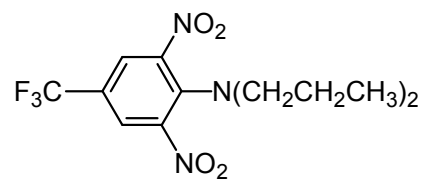
Trifluralina - d14



Triclorfom



Trifenilfosfato (PI)



Trifluralina

Fonte: PAN Pesticide Database; The e-Pesticide Manual; Compendium of Pesticides Common Names.