

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

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO  
INDIVIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE DIQUATE E  
PARAQUATE POR UPLC-MS/MS EM FEIJÃO-CAUPI**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Giovana Milagros Espinoza Vela**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDIVIDUAL  
PARA DETERMINAÇÃO DE DIQUATE E PARAQUATE POR  
UPLC-MS/MS EM FEIJÃO-CAUPI**

**Giovana Milagros Espinoza Vela**

**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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ionara Regina Pizzutti**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

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

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

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDIVIDUAL PARA  
DETERMINAÇÃO DE DIQUATE E PARAQUATE POR UPLC-MS/MS  
EM FEIJÃO-CAUPI**

**Elaborada por  
Giovana Milagros Espinoza Vela**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ionara Regina Pizzutti  
(Orientadora)**  
Universidade Federal de Santa Maria

---

**Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho**  
Universidade Federal de Santa Maria

---

**Prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini**  
Universidade de Santa Cruz do Sul

**Santa Maria, 03 de fevereiro de 2014**

*Mudaste o meu pranto em dança, a minha veste  
de lamento em veste de alegria, para que o meu  
coração cante louvores a ti e não se cale.*

*Senhor, meu Deus, eu te darei graças para  
sempre.*

*Salmos 30:11-12*

*Dedico este trabalho a minha família amada, ainda que longe na distância sempre estiveram perto do meu coração caminhando juntos para a realização dos meus sonhos. Obrigada de todo coração amados pais, Juan e Doris (in memoriam), e por suposto a meus amados irmãos Doris, Paola e Gabriel. Amo muito vocês!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a Deus, porque sempre me colocou no lugar e tempo certos, fez uma excelente escolha colocando-me no Brasil.

Aos meus pais, porque sempre confiaram em mim, e porque sempre me impulsionaram a lutar quando já não tinha mais força. Mãe, tudo o que me ensinou sempre orienta minha vida. Obrigada sempre!

Aos meus adoráveis irmãos, Doris, Paola e Gabriel, porque compartilhamos muito mais que a família. Saudades enormes!

A minha tia favorita, Carmen, e a minha pequena (agora não tão pequena) prima Alexia, obrigada sempre por estar ai comigo compartilhando momentos felizes.

Aos meus sobrinhos maravilhosos, Lucas, Luciana, Gabriela e Ramsés, por esses sorrisos perfeitos que me fazem ver a vida com muitos cores.

A Organização dos Estados Americanos (OEA) e ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador internacional, Prof. Dr. Robert Burrow, pela orientação ao início da minha chegada na UFSM. Muito obrigada!

A minha querida Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ionara Regina, por confiar em mim e aceitar-me no seu laboratório e ser minha orientadora. Pelos dias falando espanhol, por seus sempre carinhosos abraços e por sua sincera preocupação. Sempre vou agradecer a Deus por me colocar no CEPARC.

A minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carmem Dicokw Cardoso, por seu apoio, carinho, pelos dias que me mostrou Santa Maria ao lado da linda nenê Sofia e por compartilhar lindos momentos comigo.

A família Pereira Da Costa, a dona Marta, Marlene e em especial ao Ivo, pelo carinho, pela “bulla” e por seus cuidados. Obrigada por tudo!

Aos meus queridos amigos e colegas no Peru, Ruth, Candy, Marita e a Dra. Rosario, pelo apoio, pelos conselhos e carinho sempre!

Ao Dr. Andre de Kok pelas contribuições neste trabalho, Thanks!

Aos meus colegas e amigos do CEPARC pela paciência com o idioma, especialmente ou Jonatan e Barbara por compartilhar muito mais do que o trabalho.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que de forma direta ou indireta fizeram parte desse tempo especial em Santa Maria, na UFSM e no CEPARC, obrigada por contribuir à obtenção deste primeiro passo.

*"Uma grama de prática vale mais do que  
toneladas de pregação."*

*(Mahatma Gandhi)*

*Eu não falhei. Eu apenas encontrei 10.000  
maneiras que não funcionam. "*

*(Thomas A. Edison)*

## RESUMO

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

### OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDIVIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE DIQUATE E PARAQUATE POR UPLC-MS/MS EM FEIJÃO-CAUPI

AUTORA: GIOVANA MILAGROS ESPINOZA VELA

ORIENTADORA: IONARA REGINA PIZZUTTI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 03 de fevereiro de 2014

Neste estudo, foi otimizado e validado um método para determinação de diquate e paraquate em feijão-caupi. Para se obter uma amostra bem homogênea, o feijão-caupi foi moído e em seguida preparou-se um *slurry* de matriz e água (razão 1:1,5; m/m). O procedimento de extração baseou-se no método QuPPE, no qual foram feitas modificações. Como solvente extrator, utilizaram-se metanol contendo ácido clorídrico 5 mol L<sup>-1</sup> (6:4 v/v) e utilizou-se padrões internos deuterados de diquate e paraquate. Após a adição do solvente extrator, para promover uma melhor extração, agitou-se vigorosamente de maneira manual por 2 minutos e logo levou-se por 15 minutos para banho de água à 80 °C. Deixou-se resfriar à temperatura ambiente e centrifugou-se por 5 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi utilizado para as análises. Todas as soluções analíticas de diquate e paraquate foram preparadas e armazenadas em frascos de polipropileno.

A determinação de diquate e paraquate foi feita em um sistema de cromatografia líquida acoplado a um espectrômetro de massas tandem (UPLC-MS/MS). A validação foi realizada pela análise de amostras de feijão-caupi fortificado em três concentrações (10, 20 e 50 µg kg<sup>-1</sup>), com 7 replicatas (n=7) para cada concentração.

Avaliou-se, para ambos herbicidas, a linearidade da curva analítica (r), exatidão (recuperação%), limite de detecção e de quantificação (LOD e LOQ) do instrumento e do método, precisão (RSD%) e efeito matriz (%).

No estudo de recuperação o diquate obteve médias entre 77-85% e apresentou RSD ≤ 20% para as amostras fortificadas, nas três concentrações de estudo. Por outro lado, paraquate apresentou médias entre 68-103% na recuperação e médias de RSD entre 14,4-25,4%. O LOQ do método foi 10 e 20 µg kg<sup>-1</sup> para diquate e paraquate, respectivamente.

Mesmo após a adição de padrões deuterados antes da etapa de fortificação o efeito matriz manteve-se presente tanto para diquate como para o paraquate. Dessa forma, para que o método possa ser implantado em análises de rotina, a confecção das curvas analíticas deve ser realizada a partir de soluções em extrato de matriz (*matrix-matched calibration*).

Este método foi aplicado para amostras provenientes de um estudo da EMBRAPA.

Palavras-chave: Feijão-caupi. Herbicidas. UPLC-MS/MS. Método Individual.  
Diquate. Paraquate.

## ABSTRACT

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

### OPTIMIZATION AND VALIDATION OF SINGLE RESIDUE METHOD FOR DETERMINATION OF DIQUAT AND PARAQUAT FOR UPLC- MS/MS IN COWPEA

AUTHOR: GIOVANA MILAGROS ESPINOZA VELA  
ADVISOR: IONARA REGINA PIZZUTTI  
Santa Maria, February 3<sup>rd</sup>, 2014

In this study, a method for determination of diquat and paraquat in Cowpea was optimized and validated. In order to obtain a good homogeneous sample, the Cowpea were milled and then prepared a slurry of matrix and water (ratio 1:1.5; m/m). The extraction procedure was based on the QuPPE-Method and modifications of the method were developed. As extraction solution, it was used methanol containing hydrochloric acid 5 mol L<sup>-1</sup> (6:4 v/v) plus isotopically labeled (IL) analogues of the targets analytes, which were used as internal standards (ISTDs). In order to promote a better extraction, the mixture between slurry plus extraction solvent was manually shaken for 2 min, vigorously, and then taken to a water bath, at 80°C, for 15 min. After, the mixture was cooled down to room temperature and then centrifuged for 4 min at 4000 rpm. The supernatant was used for the analysis. All analytical solutions of diquat and paraquat have been prepared and stored in polypropylene vessels. The determination of diquat and paraquat was done into a liquid chromatographic system coupled to a tandem mass spectrometer (UPLC-MS/MS). The validation was performed by analyzing spiked samples at three different concentrations (10, 20 and 50 µg kg<sup>-1</sup>), with seven replicates (n = 7) for each concentration. Assessed, both as to diquat and paraquat, was determined the linearity (r) of analytical curves, accuracy (as recovery %), instrument and method limits of detection and quantification (LOD and LOQ), precision (as RSD %) and matrix effects (%). In the recovery study of Diquat, the average recovery obtained was between 77 and 85% with RSD% values ≤ 20%, for all 3 spike concentrations. On the other hand, paraquat presented averages between 68-103% and averages of RSD between 14.4-25.4 %. The LOQ of the method was 10 and 20 µg kg<sup>-1</sup> for diquat and paraquat, respectively. The matrix effect was present for both pesticides even using isotopically labeled (IL) analogues of the target analytes, which were used as internal standard (ISTD), therefore requiring matrix-matched calibration standards for application in routine analysis.

This study was applied for samples from EMBRAPA study.

Keywords: Cowpea. Herbicides. UPLC-MS/MS. Single Residue Method. Diquat. Paraquat.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Reclamações do consumidor canadense frente a riscos de Segurança Alimentar.....	25
Figura 2	Fotografia das sementes de feijão-caupi.....	28
Figura 3	Distribuição das marcas comerciais de herbicidas por classe ambiental.....	34
Figura 4	Mecanismo de ação do diquate e paraquate.....	45
Figura 5	Esquema do procedimento de extração, método QuPPE versão 7 modificado.....	70
Figura 6	Curvas analíticas preparadas a partir das soluções analíticas de (a) diquate e (b) paraquate em solvente orgânico e extrato de matriz.....	81
Figura 7	Cromatograma obtido para diquate para transição de quantificação (a) e (b) de confirmação, por UPLC-MS/MS, na concentração de 100 ng mL <sup>-1</sup> em solvente (1) e extrato de matriz (2).....	82
Figura 8	Cromatograma obtido para paraquate para transição de quantificação (a) e (b) de confirmação, por UPLC-MS/MS, na concentração de 100 ng mL <sup>-1</sup> em solvente (1) e extrato de matriz (2).....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação científica do feijão-caupi.....	29
Tabela 2	Características gerais do diquate e paraquate.....	43
Tabela 3	Parâmetros de validação das diferentes agências regulamentadoras.....	51
Tabela 4	Valores de recuperação (%) em função da concentração.....	54
Tabela 5	Preparo da curva analítica a partir de soluções analíticas preparadas em solvente orgânico.....	60
Tabela 6	Preparo da curva analítica a partir de soluções analíticas preparadas em extrato de matriz.....	61
Tabela 7	Agrotóxicos analisados por UPLC ESI MS/MS modo positivo, tempo de retenção e parâmetros MRM.....	65
Tabela 8	Agrotóxicos dessecantes aplicados em pré-colheita para teste no cultivo do feijão-caupi.....	71
Tabela 9	Valores de recuperação obtidos para diquate e paraquate nos três níveis de fortificação em estudo, segundo o solvente extrator do QuPPE v7 original.....	74
Tabela 10	Valores de recuperação obtidos para diquate e paraquate nos três níveis de fortificação em estudo, segundo a proporção do solvente extrator modificado.....	75
Tabela 11	Valores de recuperação obtidos para diquate e paraquate no nível 50 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) de fortificação, empregando ou não banho de água a 80 °C por 15 min.....	76
Tabela 12	Valores de recuperação obtidos para diquate e paraquate no nível 50 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) de fortificação, com e sem resfriamento a temperatura ambiente antes da centrifugação.....	77
Tabela 13	Valores de recuperação obtidos para diquate e paraquate nos três níveis de fortificação em estudo, empregando ou não filtração.....	78
Tabela 14	Parâmetros relativos às curvas analíticas, obtidos para diquate e paraquate, a partir de soluções preparadas no solvente orgânico e no extrato da matriz e analisadas por UPLC-MS/MS.	79
Tabela 15	Percentual de efeito matriz observado na faixa de concentração estudada nas curvas analíticas.....	82

Tabela 16	Valor de LOD estimado do método (LOD <sub>m</sub> ) e do instrumento (LOD <sub>i</sub> ), e LOQ estimado do instrumento (LOQ <sub>i</sub> ), e do método (LOQ <sub>m</sub> ), para diquate e paraquate, em solvente orgânico.....	84
Tabela 17	Valor de LOD estimado do método (LOD <sub>m</sub> ) e do instrumento (LOD <sub>i</sub> ), e LOQ estimado do instrumento (LOQ <sub>i</sub> ), e do método (LOQ <sub>m</sub> ), para diquate e paraquate, em extrato de matriz.....	84
Tabela 18	Média dos percentuais de recuperação e RSD (%) obtidos a partir da fortificação de feijão-caupi nos 3 níveis estudados (10, 20 e 50 µg kg <sup>-1</sup> ).....	85
Tabela 19	Valor de LMR para diquate e paraquate segundo EU, ANVISA e do método modificado.....	85
Tabela 20	Comparação entre métodos QuPPE original e o modificado com relação ao percentual de recuperação nos três níveis de fortificação (10, 20 e 50 µg kg <sup>-1</sup> ).....	86
Tabela 21	Concentrações de diquate e paraquate encontrados nas amostras de feijão-caupi.....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFSSA	Agência Francesa de Segurança Sanitária dos Alimentos do francês <i>Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API	Ionização a Pressão Atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Ionization</i>
CFIA	Agência Canadense de Inspeção Alimentar, do inglês <i>Canadian Food Inspection Agency</i>
CV%	Coeficientes de variação
d.i.	Diâmetro interno
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA	Agencia de Proteção Ambiental, do inglês <i>Environmental Protection Agency</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESI	Ionização por eletrospray, do inglês <i>Electrospray Ionization</i>
EU	União Européia, do inglês <i>European Union</i>
EUA	Estados Unidos da América
EURACHEM	Comitê Europeu para Análise Química
EURL-SRM	Laboratório de Referência da União Européia para métodos Individuais de Análise de Resíduos de Pesticidas, do inglês <i>EU Reference Laboratory for Pesticides Requiring Single Residue Methods</i>
FAO	Organização do Alimento e Agricultura, do inglês <i>Food and Agriculture Organization</i>
GC	Cromatografia gasosa, do inglês <i>Gas Chromatography</i>
HILIC	Cromatografia líquida de interação hidrofílica do inglês <i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.
ICH	Conferência Internacional em Harmonização, do inglês <i>International Conference on Harmonisation.</i>
IDA	Ingestão diária aceitável
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IL	Marcação isotópica, do inglês <i>Isotopically Labeled</i>
ISO	Organização Internacional para Padronização, do inglês <i>International Organization for Standardization</i>
ISTD	Padrão interno, do inglês <i>Internal Standard</i>
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LC	Cromatografia Líquida, do inglês <i>Liquid Chromatography</i>
LMR	Limites máximos de resíduos, do inglês <i>Maximum Residue Level</i>
LOD	Limite de detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>Limit of Quantitation</i>
m/z	Razão massa/carga, do inglês <i>Mass to Charge Ratio</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDIC	Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior

MRM	Monitoramento de reações múltiplas, do inglês <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	Espectrometria de massas, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	Espectrometria de massas tandem, do inglês <i>Tandem Mass Spectrometry</i>
NFPA	Associação Nacional dos Alimentos Processados
P.I.	Padrão interno, do inglês <i>Internal Standard</i>
P.I.1	Padrão interno na concentração de 40 mg L <sup>-1</sup>
P.I.2	Padrão interno na concentração de 2 mg L <sup>-1</sup>
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos
pp	Polipropileno
ppm	Partes por milhão
QuEChERS	Método rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, do inglês <i>quick, easy, cheap, effective, rugged and safe</i> ;
QuPPE	Método rápido para agrotóxicos polares, do inglês <i>Quick Polar Pesticides Method</i>
r <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>relative standard deviation</i>
UPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UPLC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês <i>Ultra Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry</i>
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, do inglês <i>United States Department of Agriculture</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
1.1	Objetivos.....	23
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>24</b>
2.1	Segurança alimentar sanitária.....	24
2.1.1	Segurança alimentar sanitária no mundo e no Brasil.....	26
2.2	Feijão-caupi.....	27
2.2.1	Classificação científica.....	28
2.2.2	Importância nutricional.....	29
2.2.3	Importância sócio econômica.....	30
2.2.4	Manejo fitossanitário na cultura do feijão-caupi.....	32
2.3	Herbicidas.....	33
2.3.1	Classificação dos Herbicidas.....	34
2.3.1.1	Em relação ao espectro de ação.....	34
2.3.1.2	Em relação à seletividade.....	35
2.3.1.3	Em relação à época de aplicação.....	37
2.3.1.4	Em relação à translocação na planta.....	38
2.3.1.5	Em relação ao mecanismo de ação.....	39
2.3.1.6	Em relação ao caráter iônico.....	41
2.3.1.7	Classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental.....	42
2.4	Diquate e paraquate.....	43
2.4.1	Aspectos gerais.....	43
2.4.2	Mecanismo de ação.....	45
2.4.3	Características toxicológicas.....	46
2.4.4	Regulamentação.....	47
2.5	Determinação de resíduos de agrotóxicos nos alimentos.....	48
2.5.1	Método individual para determinação de agrotóxicos em alimentos.....	48
2.6	Validação de métodos analíticos.....	49
2.6.1	Conceito de validação.....	49
2.6.2	Parâmetros de validação.....	50
2.6.2.1	Linearidade e curva analítica.....	51
2.6.2.1.1	Padrão interno (P.I).....	52

2.6.2.2	Seletividade.....	53
2.6.2.3	Limite de Detecção e de Quantificação.....	53
2.6.2.4	Exatidão.....	54
2.6.2.5	Precisão.....	55
2.6.3	Efeito Matriz.....	56
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
3.1	Instrumentação.....	57
3.2	Gases.....	58
3.3	Materiais.....	58
3.4	Solventes e reagentes.....	59
3.5	Preparo das soluções analíticas.....	59
3.6	Otimização do preparo da amostra.....	61
3.7	Otimização do preparo do solvente extrator.....	62
3.8	Otimização dos parâmetros de extração.....	62
3.8.1	Temperatura.....	62
3.8.2	Filtração.....	63
3.9	Análise dos solventes e reagentes.....	63
3.10	Otimização das condições cromatográficas.....	63
3.11	Validação do método QuPPE versão 7 modificado.....	65
3.11.1	Curva analítica e linearidade.....	65
3.11.2	Avaliação do efeito matriz do feijão-caupi.....	66
3.11.3	Determinação da estimativa do LOD e LOQ do instrumento e do método.....	67
3.11.4	Ensaio de fortificação e extração para a avaliação da recuperação....	68
3.12	Extração pelo método QuPPE versão 7 modificado.....	69
3.13	Análise de amostras de feijão-caupi por meio do método otimizado e validado.....	71
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>74</b>
4.1	Otimização do preparo das amostras.....	74
4.2	Otimização do preparo do solvente extrator.....	74
4.3	Otimização dos parâmetros de extração.....	75
4.3.1	Temperatura.....	75
4.3.2	Filtração.....	77
4.4	Análise dos solventes e reagentes.....	78
4.5	Validação do método QuPPE versão 7 modificado.....	78

4.5.1	Curva analítica e linearidade.....	79
4.5.2	Avaliação do efeito matriz do feijão-caupi.....	80
4.5.3	Determinação da estimativa do LOD e LOQ do instrumento e do método.....	83
4.5.4	Ensaio de recuperação.....	84
4.6	Método de extração QuPPE versão 7 modificado.....	86
4.7	Aplicação do método otimizado e validado em amostras de feijão-caupi.....	86
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Na atualidade a importância da segurança alimentar aumentou em vista dos processos modernos da industrialização e das novas tendências do consumidor frente aos alimentos, especialmente na sua vertente que enfatiza os aspectos qualitativos, *food safety*, que podem se definidos como a garantia do consumidor em adquirir alimentos livres de contaminantes químicos, biológicos ou outros, na qual se destacam sempre os atributos ligados à saúde. No Brasil podem se facilmente confundir os termos *food safety* e *food security* já que os dois, *safety* e *security* são sinônimos em inglês. Neste trabalho, será definida *food safety* como sendo a segurança alimentar sanitária, devido ao fato de que segurança alimentar se refere a uma situação quando todas as pessoas, a qualquer momento, têm acesso físico, social e econômico a suficientes alimentos, seguros e nutritivos, que permitam satisfazer as suas necessidades em nutrientes e preferências alimentares (ARAÚJO, 2007), que não é o enfoque deste trabalho.

A necessidade de adquirir-se alimentos de qualidade, incluídos na vertente da definição de *food safety*, tem impulsionado o desenvolvimento de sistemas agrícolas de produção cada vez mais eficientes. Assim, o uso de agrotóxicos para o controle de pragas durante o cultivo e após a colheita tornou-se uma ferramenta essencial para garantir o crescimento e a qualidade na produção de alimentos.

Vários países no mundo criaram programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos e, no Brasil, onde existe um grande potencial agrícola e onde se localiza o maior mercado que aplica agrotóxicos do mundo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou, em 2001, o Programa Nacional de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) com a finalidade de avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor, fortalecendo a capacidade do Governo em atender a segurança alimentar, evitando possíveis agravos à saúde da população (ANVISA, 2009).

O feijão é um dos principais produtos agrícolas presente na mesa do consumidor brasileiro depois do arroz. Ainda que as estatísticas não mostrem

diferenças entre o feijão comum e o caupi, em 2012 o Brasil exportou 30 toneladas de feijão-caupi para a Bolívia, para fins de semeadura naquele país, além de um volume de 5.644 toneladas para consumo humano o qual alcançou um valor médio de US\$ 714/tonelada. Por este motivo, torna-se indispensável realizar-se um controle rigoroso para avaliação da possível contaminação desta cultura por resíduos de agrotóxicos (WANDER, 2013).

Atualmente, existem mais de 80 substâncias pertencentes a diferentes classes químicas, registrados como ingredientes ativos para o cultivo do feijão comum no Brasil, e que são avaliados pelos laboratórios participantes do PARA. O uso incorreto destas substâncias pode contaminar o meio ambiente, ocasionando efeitos adversos à saúde dos seres vivos e problemas associados com a presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos (AGROFIT, 2012).

Para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos, são empregadas, geralmente, técnicas cromatográficas para a análise, como a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida (LC). Além disso, têm sido desenvolvidas técnicas de análise de agrotóxicos em alimentos cada vez mais rápidas, seletivas e sensíveis devido à necessidade de se detectar simultaneamente um grande número de analitos (métodos multiresíduos) em baixos níveis de concentração. Dentre elas, pode-se destacar a cromatografia líquida de ultra eficiência (*Ultra-High Pressure Liquid Chromatography* - UPLC) e os métodos cromatográficos com detecção por espectrometria de massas tandem (MS/MS).

Como nem todos os agrotóxicos podem ser determinados através de métodos multiresíduos, como é o caso dos herbicidas do grupo bipyridílicos, especialmente o diquate e o paraquate, por serem muito polares, a *European Union Reference Laboratory for Pesticides Requiring Single Residue Methods* (EURL-SRM) têm desenvolvido um método específico “Método rápido para análises de resíduos de numerosos agrotóxicos altamente polares em alimentos provenientes de plantas envolvendo extração simultânea com metanol e determinação por UPLC-MS/MS” (Método-QuPPE).

## 1.1 Objetivos

Este estudo teve como objetivo a otimização e a validação de um método cromatográfico individual para determinação de diquate e paraquate em feijão-caupi, por cromatografia líquida UPLC-MS/MS. Buscou-se também analisar resíduos desses herbicidas em amostras de feijão-caupi proveniente de 3 estados do Brasil, quando pulverizado em condições de cultivo a campo e fornecido pela EMBRAPA, em amostras provenientes de experimentos de campo desses herbicidas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Segurança alimentar sanitária

A segurança alimentar sanitária tem crescido em importância, juntamente com os novos processos de industrialização e com a tendência de comportamento do consumidor sobre garantir que os alimentos adquiridos sejam de qualidade, livres de riscos de alérgicos, químicos, materiais estranhos e microbiológicos. Este comportamento baseia-se no fato de que o aumento na produção de alimentos gerou um acréscimo no uso de insumos químicos, principalmente de agrotóxicos (inseticidas, fungicidas, herbicidas), antibióticos, hormônios e outros medicamentos veterinários. Esses produtos podem comprometer a sanidade dos alimentos seja por sua própria formulação (uso de substâncias proibidas pelo *Codex Alimentarius* e/ou outros órgãos), dosagem maior do que a recomendada, ou pelo seu poder acumulativo, fazendo com que seus resíduos se mantenham no alimento por muito tempo, de modo que termina contaminando o consumidor (STOPELLI, 2005).

Deve-se notar que o conceito que define a segurança alimentar sanitária está explicado no conceito de *food safety* que enfatiza os aspectos qualitativos dos alimentos. Assim, pode-se definir *food safety* como a garantia do consumidor em adquirir alimentos com atributos de qualidade que sejam do seu interesse, entre os quais se destacam os atributos ligados à saúde.

É importante diferenciar os conceitos referentes à “Segurança alimentar” e “*Food security*” já que a designação “Segurança Alimentar” tem sido utilizada de forma imprecisa em alguns países. A Organização Mundial da Saúde (OMS), já referia em 2004 que *Food security* é por vezes confundida com *Food safety*, porque as palavras *security* e *safety* são sinônimos em inglês.

Segundo a OMS, *Food Safety* é quando todas as pessoas em todos os momentos têm acesso a alimentos seguros e suficientes, nutritivos para manter uma vida saudável e ativa. Comumente, o conceito de segurança alimentar é definido como incluindo o acesso físico e econômico a uma alimentação que atenda às necessidades alimentares das pessoas, bem como as suas preferências alimentares.

Segundo Araujo (2007), em português estes dois conceitos se designam seguindo o exemplo da tradução francesa, exemplificada pela nome da AFSSA, *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*, pelo qual seria apropriado designar *Food safety* por segurança alimentar sanitária, deixando para apenas segurança alimentar a designação abrangente de *Food security* (ARAUJO, 2007).

Um exemplo da preocupação do consumidor frente à segurança alimentar sanitária nos apresenta a *Canadian Food Inspection Agency* (CFIA), um órgão governamental que fornece dados obtidos pelos próprios consumidores desde abril 2006 até março 2013, com a finalidade de ajudar a remover os produtos perigosos do mercado e alertar outros consumidores. Pode-se observar que as maiores preocupações são referidas a materiais estranhos (metal, vidro ou cabelo, média de 1,186 reclamações) seguida de reclamações microbiológicas (482) e, em terceiro lugar, as por químicos (média de 160 casos). (Figura 1) (CFIA, 2013).

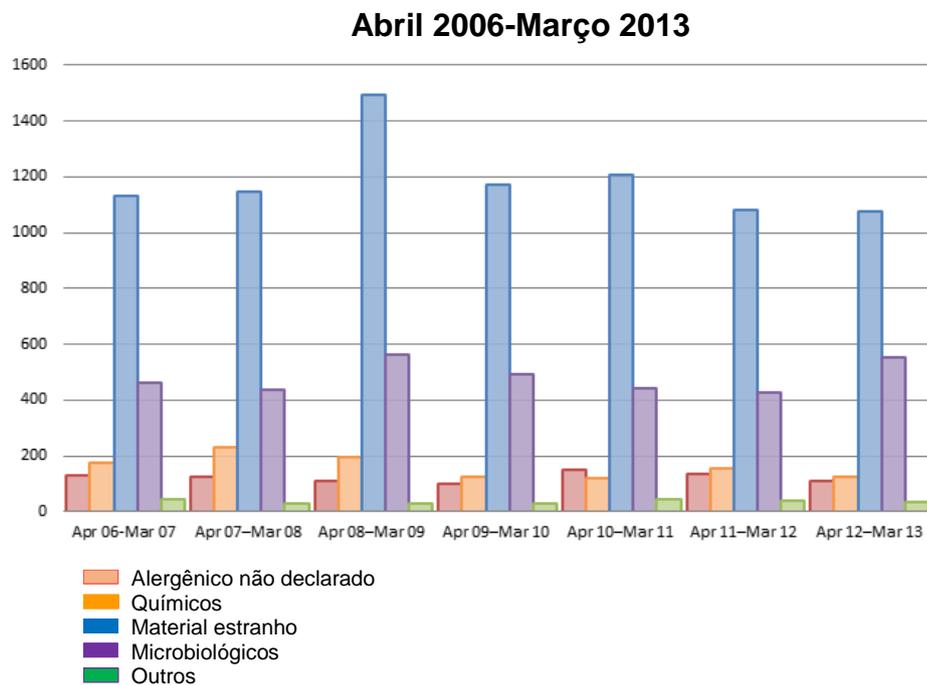


Figura 1 - Reclamações do consumidor canadense frente à riscos de Segurança Alimentar (CFIA).

### 2.1.1 Segurança alimentar sanitária no mundo e no Brasil

Muitos países desenvolvidos realizam regularmente estudos de dieta total, como um método de avaliação da exposição da população a vários contaminantes nos alimentos, incluindo agrotóxicos. Esses estudos são considerados importantes para acompanhamento das exposições alimentares a produtos químicos, e o risco associado à saúde pública é caracterizado pela comparação da estimativa de valores internacionais de orientação de saúde, como a ingestão diária aceitável e ingestão semanal tolerável provisória (VANNOORT, THOMSON, 2009; BETSY, RAO, POLASA 2012).

Quando uma cultura é tratada com um agrotóxico, uma quantidade muito pequena deste, ou seus metabolitos e produtos de degradação, podem permanecer na cultura, até após a colheita. Isto é conhecido como “resíduo”. Os resíduos de agrotóxicos podem estar presentes em frutas e legumes frescos ou enlatados, alimentos processados e produtos feitos a partir da colheita (por exemplo, suco, pão ou qualquer outro alimento ou bebida produzida), produtos de origem animal frescos ou transformados (se os animais foram alimentados com cultura grão/planta tratadas com agrotóxicos). Enquanto o uso de agrotóxicos pode levar a resíduos em alimentos, deve-se lembrar que algumas plantas contêm suas próprias defesas naturais que têm toxinas semelhantes aos encontrados em agrotóxicos químicos (HSE, 2012).

De fato, os alimentos são considerados a principal fonte de exposição dos seres humanos aos agrotóxicos (BOOBIS et al., 2008; JARDIM, ANDRADE, DE QUIROZ; 2009).

Neste contexto, diversos países têm implantado programas de análise de resíduos nos alimentos. Nos Estados Unidos, numerosos programas de análises de resíduos têm sido implantados, podendo-se destacar o programa do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), o programa da Associação Nacional dos Alimentos Processados (NFPA) e o programa da Administração de Drogas e Alimentos (FDA). Este último, implantado em 1987 e responsável pela publicação de relatórios anuais, usa limite máximo partes por milhão (ppm), dependendo do tipo de agrotóxico (STOPELLI, MAGALHAES; 2005).

No Brasil, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA) foi iniciado em 2001 com o objetivo de cumprir a legislação disposta no Decreto 4.074/02 e na Resolução – RDC nº 44/00. Os objetivos específicos do PARA são (1) analisar resíduos de agrotóxicos *in natura*; (2) verificar se os alimentos contaminados ultrapassam o limite máximo de resíduo (LMR); (3) verificar a presença de resíduos de agrotóxicos não autorizados pela legislação em vigor; (4) rastrear possíveis problemas e subsidiar ações de fiscalização de vigilância sanitária; (5) melhorar a estimativa de exposição por meio da dieta, como parte da reavaliação dos agrotóxicos já registrados; (6) monitorar o uso de produtos agrotóxicos realizando um mapeamento de risco; (7) subsidiar com base científica e informações laboratoriais concretas as negociações internacionais, principalmente, no âmbito do *Codex Alimentarius* e do Mercosul; (8) fornecer subsídios ao Ministério da Agricultura que permitam orientar e fiscalizar os produtores na utilização dos agrotóxicos; e (9) disponibilizar informações à sociedade (STOPELLI, MAGALHAES; 2005).

## 2.2 Feijão-caupi

O feijão-caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp, é uma Fabácea utilizada para alimentação humana, animal e como adubo verde incorporado ao solo. Originário da África, ele foi introduzido no Brasil no século XVI, no Estado da Bahia, por colonizadores portugueses, de onde se expandiu para todo o país (FREIRE, 2011).

Seu cultivo ocorre principalmente na África, Ásia e nas Américas, onde o seu alto conteúdo de proteínas, adaptação a diferentes agrossistemas, resistência à secas e ao sombreamento e a capacidade de melhorar a fertilidade dos solos, promovem uma alternativa interessante para agricultores de pequeno e grande porte (IITA, 2009).

Devido à disseminação do feijão-caupi nas diferentes regiões do país existe uma variedade de nomes populares com os quais é também conhecido como exemplo feijão-macássar ou macassa, feijão-de-corda na região Nordeste; feijão-da-colônia, feijão-da-praia, feijão-de-estrada na região Norte; feijão-miúdo na região Sul; feijão-catador e feijão-gurutuba em algumas regiões da Bahia e norte de Minas Gerais, e feijão-fradinho nos estados da Bahia e do Rio de Janeiro.

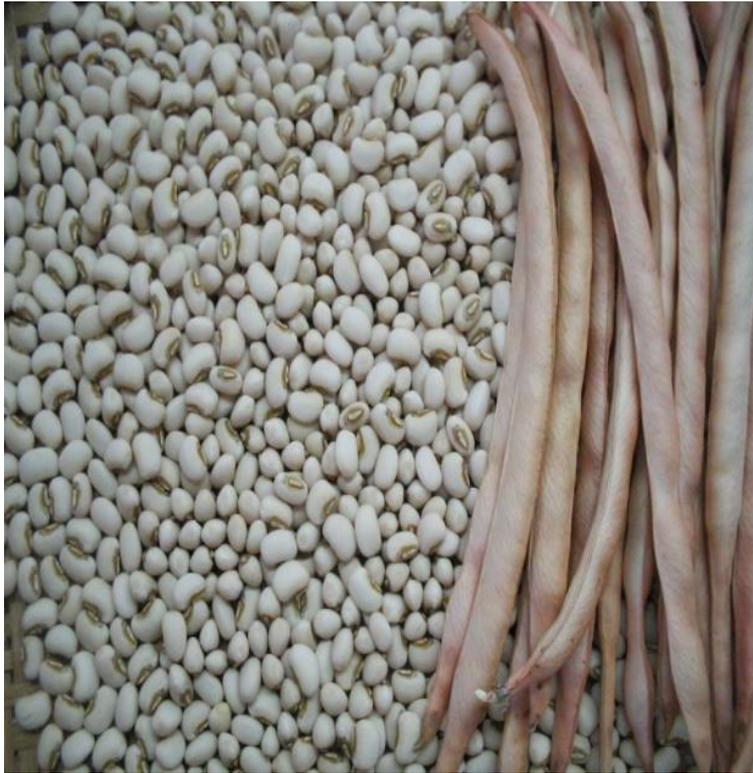


Figura 2 - Sementes de feijão-caupi (Embrapa Arroz e Feijão)

### 2.2.1 Classificação científica

Historicamente, houve uma grande dificuldade para a classificação científica do feijão-caupi. Inicialmente foi classificado nos gêneros *Phaseolus* e *Dolichos*, e finalmente classificado no gênero *Vigna* que é à atual classificação cientificamente aceita (Tabela 1) (FREIRE, 2011).

Tabela 1 - Classificação científica do feijão-caupi.

<b>Ordem</b>	<b>Fabales</b>
<b>Família</b>	Fabaceae
<b>Subfamília</b>	Faboideae
<b>Tribo</b>	Phaseoleae
<b>Subtribo</b>	Phaseolineae
<b>Gênero</b>	Vigna
<b>Subgênero</b>	Vigna
<b>Secção</b>	Catyang
<b>Espécie</b>	<i>Vigna unguiculata (L.) Walp</i>
<b>Subespécie</b>	unguiculata
<b>Cultigrupos</b>	Unguiculata, Sesquipedalis, Biflora e Textilis

### 2.2.2 Importância nutricional

O feijão-caupi é considerado uma das leguminosas mais adaptadas, rústicas e nutritivas entre as espécies cultivadas destinadas à alimentação humana devido ser uma excelente fonte de proteínas (23-25% em média). Apresenta todos os aminoácidos essenciais, carboidratos (62%, em média), vitaminas e minerais, além de possuir grande quantidade de fibras dietéticas, baixa quantidade de gordura (teor de óleo de 2%, em média) (FROTA et al., 2008).

Pelo seu valor nutritivo, o feijão-caupi é cultivado principalmente para a produção de grãos, secos ou verdes, visando o consumo humano *in natura*, na forma de conserva ou desidratado. Além disso, o feijão-caupi também é utilizado como forragem verde, feno, ensilagem, farinha para alimentação animal e humana ou ainda como adubação verde e proteção do solo.

### 2.2.3 Importância Sócio-econômica

A produção de feijão-caupi no Brasil destina-se ao consumo doméstico e tem grande importância como alimento e na geração de renda na agricultura familiar, concentrando-se nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, estendendo-se atualmente à Região Centro-Oeste. A comercialização de grãos está normatizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Atualmente seu consumo expande-se de forma mais intensa para as regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (AGEITEC, 2011).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento a produção nacional de feijão comum, na primeira safra de 2013 foi de aproximadamente em 1.294,4 mil toneladas, representando um crescimento de 4,8% em comparação com a safra anterior, fato este que demonstra o intenso crescimento e difusão desta cultura por todo o país (CONAB, 2013).

Conforme registros da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) em 2013, a produção mundial de feijão-caupi em 2011 foi em torno de 5 milhões de toneladas. No entanto, acredita-se que esta estimativa esteja subestimada, considerando que vários países, como Índia, Myanmar e Brasil, não fornecem dados estatísticos que separem feijão-caupi e feijão-comum, de forma que não apresentam estatísticas de feijão-caupi, apesar de ter um volume expressivo de produção. De um total de 239 países constantes na base de dados FAOSTAT, apenas 33 apresentaram estatísticas específicas de feijão-caupi em 2011. Dos países que apresentam dados detalhados para feijão-caupi em 2011, os maiores produtores são Nigéria (1,8 milhões de toneladas), Níger (1,5 milhões de toneladas), Burkina Faso (440 mil toneladas), Myanmar (220 mil toneladas), Tanzânia (170 mil toneladas), Camarões (150 mil toneladas) e Mali (130 mil toneladas) (WANDER, 2013; FAO, 2013).

Segundo os dados da Embrapa Arroz e Feijão em 2012, a produção nacional de feijão-caupi oscilava entre 400 e 600 mil toneladas, entre 2002 e 2011. Em 2011, no entanto, houve um aumento considerável da produção, alcançando quase 800 mil toneladas. Esse recorde histórico deveu-se ao aumento da produção em regiões importantes, como o Nordeste, além do início de uma produção diferente, nova para

o Brasil, que é o cultivo em escala comercial em alguns estados do Centro-Oeste, principalmente, Mato Grosso (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO 2012).

Em 2010, apenas os Estados Unidos e o Egito apresentaram registros de exportação de grãos secos de feijão-caupi. Nos registros da FAO, também estes mesmos países foram os únicos que registraram importação de feijão-caupi. Isso demonstra uma fragilidade das estatísticas internacionais relacionadas ao feijão-caupi. Em outras situações, são apresentados de forma separada (WANDER, 2013; FAO 2013).

Segundo o Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC), o Brasil não registrava exportação de feijão-caupi até 2011, apesar de ser um importante produtor. Em 2012, no entanto, isso passou a mudar. A cultura despertou o interesse de alguns produtores do Centro-Oeste, principalmente, no estado do Mato Grosso, que passaram a cultivar este alimento em escala comercial, vislumbrando oportunidades de exportação (WANDER, 2013; MDIC, 2013).

Em 2012, o Brasil exportou 30 toneladas de feijão-caupi para a Bolívia, para fins de semeadura naquele país. Não houve registros de exportação de feijão-caupi para semeadura nos demais anos analisados, assim mesmo também exportou, pela primeira vez, um volume de 5.644 toneladas de feijão-caupi para consumo humano, alcançando um valor médio de US\$ 714/tonelada. Os principais destinos foram Índia (75%) e Egito (24%) e o principal canal de saída foi o porto de Santos-São Paulo (WANDER, 2013).

A ausência de separação das estatísticas de produção do feijão-caupi e feijão-comum, ainda é um empecilho às exportações brasileiras de feijão-caupi, pois o mundo desconhece que nosso país produz esta cultura, já que os órgãos oficiais não expõem os dados. No entanto, graças aos esforços de alguns produtores e de algumas empresas, o feijão-caupi do Brasil iniciou as exportações, abrindo mais uma alternativa de comercialização para o produtor.

## 2.2.4 Manejo fitossanitário na cultura do feijão-caupi

O manejo fitossanitário, inclusive o controle químico, adotado pelos produtores de feijão-caupi tem sido baseado na cultura do feijão-comum, em função das pragas, doenças e plantas daninhas serem semelhantes em ambos os cultivos. No Brasil, não há agrotóxicos registrados para uso na cultura do feijão-caupi. Todavia, o controle químico de plantas daninhas no feijão-caupi tem apresentado problemas como severa intoxicação das plantas (FREITAS et al., 2009).

As plantas daninhas constituem um dos fatores que mais influencia o crescimento, desenvolvimento e produtividade do feijão-caupi. Essas plantas competem por luz, nutrientes e água reduzindo quantitativamente a produção, além de aumentar os custos operacionais de colheita, secagem e beneficiamento dos grãos. Quando não controladas, as plantas daninhas podem reduzir o rendimento de grãos em até 90%, além de promover o aumento da altura e acamamento de plantas. O período crítico de competição das plantas daninhas no feijão-caupi pode ocorrer entre 11 e 35 dias, após sua emergência (FREITAS et al., 2009; EMBRAPA, 2005)

Entre os diversos métodos de controle de plantas daninhas destaca-se o controle químico, através do uso de herbicidas, que na cultura do feijão-caupi é limitado devido à escassez de trabalhos envolvendo o uso de herbicidas nesta cultura e da falta de agrotóxicos registrados junto ao MAPA, o que impede a recomendação e o uso de tais produtos no campo (SILVA, ALBERTINO; 2009).

O uso de herbicidas no controle de plantas daninhas apresenta inúmeras vantagens, como menor dependência da mão-de-obra, cada vez mais cara e escassa na quantidade e qualidade necessárias, eficiência mesmo em épocas chuvosas, melhor controle de plantas daninhas na linha de plantio sem afetar o sistema radicular das culturas, além de permitir o cultivo mínimo ou plantio direto das culturas e ser eficiente no controle de plantas daninhas de propagação vegetativa (SILVA, VIVIAN, OLIVEIRA; 2007).

O produtor deve levar em conta que esse método de controle de plantas daninhas é um complemento de outras práticas de manejo e deve ser utilizado com um intuito maior do que de eliminar as necessidades dos métodos de controle manual ou mecânico das plantas daninhas. (AGEITEC, 2011).

## 2.3 Herbicidas

Os herbicidas podem ser definidos como produtos químicos utilizados para matar plantas daninhas ou interromper o crescimento normal destas plantas.

Os herbicidas fornecem uma maneira conveniente, econômica e eficaz para ajudar a controlar as ervas daninhas, mas também podem não ser uma necessidade em algumas lavouras. Porém sem o uso de controle químico, os métodos de controle mecânico e culturais tornam-se muito mais importante. Muitos fatores determinam quando, onde e como um herbicida específico pode ser usado de forma mais eficaz. Compreender alguns desses fatores permite usar herbicidas para a sua vantagem máxima (PENN STATE, 2013; WSSA, 2011).

No Brasil, o aumento crescente da utilização de agrotóxicos, principalmente dos herbicidas, se dá principalmente em razão da expansão da fronteira agrícola e do aumento de terras onde é praticado o plantio direto.

De acordo com os dados declarados pelas empresas registradas no Sistema de Relatórios Semestrais de Comercialização de Agrotóxicos do Ibama, os ingredientes ativos com ação herbicida lideram a lista dos agrotóxicos mais comercializados, cuja quantidade total comercializada, em 2009, superou 127 mil toneladas. Essa quantidade de herbicidas engloba 90 ingredientes ativos, distribuídos entre 445 marcas comerciais (Figura 3) (IBAMA, 2009).

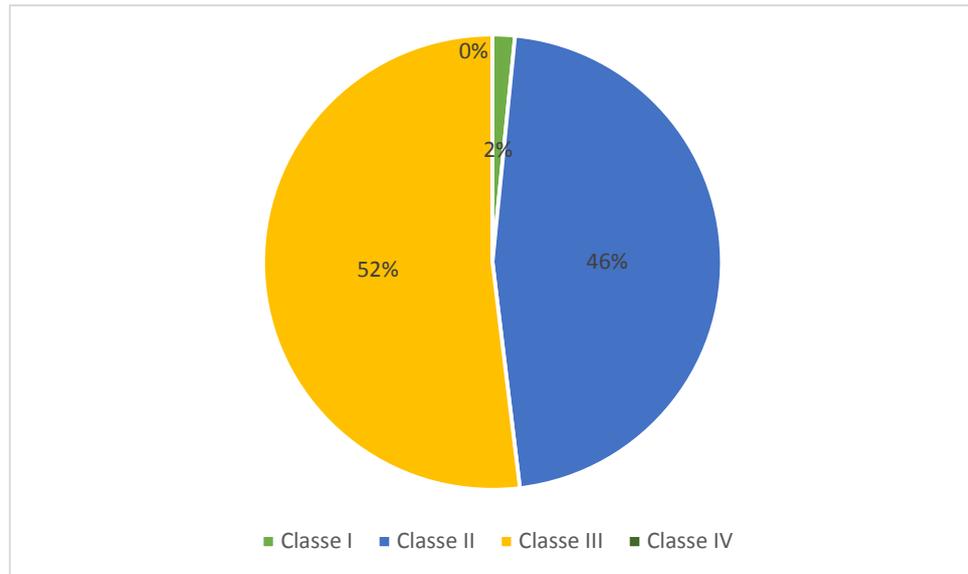


Figura 3 - Distribuição das marcas comerciais de herbicidas por classe ambiental: Classe I – Produto Altamente Perigoso, Classe II – Produto Muito Perigoso, Classe III – Produto Perigoso e Classe IV – Produto Pouco Perigoso, (IBAMA, 2009),

### 2.3.1 Classificação dos herbicidas

Herbicidas podem ser classificados de diversas maneiras, inclusive por espectro de controle de ervas daninhas, uso rotulado de culturas, famílias químicas, modo de ação, a época de aplicação-método, e outros.

#### 2.3.1.1 Em relação ao espectro de ação

Essa classificação refere-se ao grupo de plantas que o herbicida controla. Quando foram desenvolvidos os primeiros herbicidas orgânicos de ação seletiva, esses produtos passaram a ser denominados de graminicidas e latifolicidas. Além desses produtos, existem aqueles herbicidas que não são seletivos, sendo denominados de herbicidas de amplo espectro (ou de ação total). Esses produtos são assim caracterizados (CARVALHO, 2013):

- **Graminícidas** – herbicidas que controlam, predominantemente, plantas de folhas estreitas (monocotiledôneas), tendo ação sobre algumas folhas largas (eudicotiledôneas). São exemplos os herbicidas trifluralina, pendimetalina, orizalina, butilato, DCPA, entre outros;
- **Graminícidas exclusivos** – herbicidas que controlam exclusivamente (monocotiledôneas), sendo, portanto, seletivos (eudicotiledôneas). São exemplos os herbicidas fenoxaprop-p-etílico, setoxidim, aloxidim-sódio, dalapom, asulam, entre outros;
- **Latifolícidas** – herbicidas que controlam, predominantemente (eudicotiledôneas), tendo ação sobre algumas (monocotiledôneas). São exemplos os herbicidas atrazina, diurom, simazina, linurom, bromacila , entre outros;
- **Latifolícidas exclusivos** – herbicidas que controlam exclusivamente (eudicotiledôneas), sendo, portanto, seletivos para folhas estreitas (monocotiledôneas). São exemplos os herbicidas bentazona, lactofem, fomesafem , metribuzim , cianazina, entre outros;
- **De amplo espectro** – herbicidas que controlam, indistintamente, plantas daninhas. São exemplos os herbicidas glifosato, glufosinato-amônio paraquate, diquate, alacloro, hexazinona, ametrina, oxifluorfem , tebutiurom , terbacil, entre outros.

### 2.3.1.2 Em relação à seletividade

Por seletividade entende-se a incapacidade do herbicida controlar determinada planta daninha, ou seja, por algum motivo, normalmente metabólico, a planta é capaz de metabolizar o produto, reduzindo o potencial tóxico ou mesmo inativando o produto. Quanto à seletividade, os herbicidas podem ser divididos em (CARVALHO, 2013; IBAMA 2009):

- **Seletivos** – que controlam as plantas daninhas e não causam efeitos deletérios drásticos à determinada cultura agrícola que esteja sendo cultivada. São herbicidas seletivos: 2,4-D para cana-de-açúcar,

atrazina e nicosulfurom para milho, fomesafem para feijão, imazetapir para soja etc.

- **Não-seletivos** – que além de controlar as plantas daninhas podem causar efeitos deletérios drásticos, podendo causar a morte da cultura agrícola que está sendo cultivada. São herbicidas não seletivos: glifosfato, paraquate, glufosinato-amônio, entre outros.

É importante ressaltar que a seletividade pode ser dividida em três tipos:

**a) Seletividade genuína (fisiológica ou biológica)** – aquela em que a planta é capaz de metabolizar o herbicida a substâncias pouco tóxicos ou não tóxicos, permitindo tolerância à exposição ao produto em determinadas condições.

**b) Seletividade adquirida (transgenia)** – modificação genética nas culturas através da introdução de genes que conferem sua tolerância a determinado herbicida. São exemplos: o glifosato para soja; o glufosinate-ammonium e o glifosato para milho; o glufosinate-ammonium e o glifosato para algodão. Já está liberada pelo MAPA, mas ainda não está sendo comercializada, a soja tolerante a herbicidas do grupo das imidazolinonas;

**c) Seletividade toponômica (de posição)** – embora seja a seletividade relacionada à prática agrônômica de manejar a aplicação de um produto essencialmente tóxico (não-seletivo) no tempo e no espaço, considera-se seletividade toponômica aquela em que o herbicida não entra em contato com a cultura, apenas com as sementes das plantas daninhas, ou as próprias plantas daninhas. Nesse caso, o herbicida é aplicado após o plantio da cultura, diretamente sobre o solo ou sobre as plantas daninhas em aplicação dirigida, ficando retido nas camadas superficiais do solo, onde está a maioria das sementes das plantas daninhas; sendo que, as sementes da cultura ficam abaixo do perfil de ação do produto. Exemplos são: o pendimetalina em milho, diurom em algodão, entre outros. A seletividade, não se pode esquecer, é quase sempre relativa, pois depende do estágio de desenvolvimento das plantas, das condições climáticas, do tipo de solo, da dose aplicada, do uso correto da tecnologia de aplicação, entre outras coisas.

### 2.3.1.3 Em relação à época de aplicação

Normalmente, o que se houve a respeito de época de aplicação de herbicidas é em pré e pós-emergência. Porém, tecnicamente, deve ser separado mais detalhadamente, pois existem diferentes situações para pré-emergência e pós-emergência, além do manejo antes do plantio. Dessa maneira, é importante dividir os herbicidas sob dois momentos de aplicação em relação à cultura (pré-plantio e pós-plantio) e quatro momentos de aplicação em relação à cultura e às plantas daninhas (pré-emergência e pós-emergência da cultura e pré-emergência e pós-emergência das plantas daninhas). Além disso, dependendo da tecnologia utilizada (no caso da transgenia), pode-se utilizar a pós-emergência em área total ou, ainda, em pós-dirigida para culturas não tolerantes.

Em função do exposto, procura-se dividir os produtos, em relação às condições agronômicas para aplicação, em herbicidas de (CARVALHO, 2013):

- **Pré-plantio (PP)** – são herbicidas usados na dessecação de comunidades infestantes ou coberturas vegetais antes do plantio da cultura principal. Assim, devem ser aplicados após a emergência das plantas daninhas, sendo também classificados como pós-emergentes. Portanto, são herbicidas aplicados em pré-plantio da cultura e pós-emergência das plantas daninhas, geralmente. São exemplos os herbicidas glifosato, paraquate, diquate e glufosinato-amônio;
- **Pré-plantio incorporado (PPI)** – são herbicidas aplicados ao solo que necessitam ser incorporados logo após a aplicação, porém em desuso devido às dificuldades de manejo e substituição por novos produtos que dispensam a incorporação no solo. Assim, devem ser aplicados antes da emergência das plantas daninhas, sendo também classificados como pré-emergentes. Portanto, são herbicidas aplicados em pré-plantio da cultura e pré-emergência das plantas daninhas. Normalmente, são produtos voláteis e fotodecomponíveis, por isso necessitam de incorporação. São exemplos os herbicidas trifluralina, pendimetalina, molinato, butilato, pebulato, vernolato, entre outros;

- **Pré-emergência (PRE)** – são herbicidas aplicados ao solo antes da emergência das plantas daninhas, mas após o plantio da cultura. Portanto, são herbicidas aplicados em pós-plantio da cultura e pré-emergência das plantas daninhas. Esses produtos requerem bom preparo do solo e médio-bom teor de umidade no solo. São exemplos os herbicidas atrazina , diurom , metribuzim , alacloro, acetocloro , linurom, bromacila , entre outros;
- **Pós-emergência (POS)** – são herbicidas aplicados após a emergência das plantas daninhas e após o plantio da cultura. Portanto, são herbicidas aplicados em pós-plantio da cultura e pós-emergência de plantas daninhas. São divididos em:
  - 1) Pós-emergência em área total** – são herbicidas seletivos à cultura (seletividade genuína ou adquirida) que podem ser aplicados sem proteção na barra. São exemplos os herbicidas glifosato e glufosinato-amônio (em culturas transgênicas) e os herbicidas aloxidim-sódio, clopropoxidim, setoxidim, fenoxaprop-p-etílico, propanil, asulam, bentazona, entre outros (em culturas tolerantes);
  - 2) Pós-emergência dirigida** – são herbicidas não-seletivos para a cultura que devem ser aplicados na entrelinha, normalmente, com proteção na barra. São exemplos os herbicidas glifosato, paraquate, diquate, dicamba, dalapom, entre outros.
- **PRE ou POS** – são herbicidas que podem ser aplicados tanto em pré emergência quanto em pós-emergência devido a suas propriedades físico-químicas. São exemplos os herbicidas ametrina, diurom , hexazinona, oxadiazona , dinozeb, bifenox, clorambem , entre outros. Deve-se ressaltar que a seletividade para a cultura é que definirá o momento crítico para aplicação.

#### 2.3.1.4. Em relação à translocação na planta

Podem ser divididos em (EMBRAPA, 2008; HRAC, 2013):

- **Tópicos (ou de contato)** – são herbicidas que, após serem absorvidos, agem próximo ao local de contato com a planta devido à falta de mobilização ou à mobilização extremamente baixa dentro da planta;
- **Sistêmicos** – são herbicidas que, após serem absorvidos, apresentam capacidade de translocação através da planta, até atingir seu local de ação, agindo próximo ou longe do local de contato com a planta.

### 2.3.1.5. Em relação ao mecanismo de ação

Diversas são as classificações de herbicidas com base no mecanismo de ação. Mas antes de listar os mecanismos de ação dos herbicidas, é importante fazer a distinção entre modo de ação e mecanismo de ação (IBAMA, 2009; CARVALHO, 2013; EMBRAPA, 2008; HRAC, 2013).

**Modo de ação** – conjunto de eventos metabólicos que resultam na expressão final do herbicida sobre as plantas, incluindo os sintomas visíveis. Portanto, o modo de ação representa todo o comportamento do herbicida desde seu contato com a planta até a expressão final do seu efeito tóxico;

**Mecanismo de ação** – primeiro evento metabólico (sítio de ação) das plantas onde o herbicida atua. Assim, o mecanismo de ação está inserido no modo de ação do herbicida.

O mecanismo de ação pode ser dividido em dois grupos:

- **Enzimático** – quando a ação do herbicida ocorre sobre alguma enzima do metabolismo da planta;
- **Não-enzimático** – quando a ação do herbicida ocorre sobre algum evento metabólico da planta sem ocorrer a ligação com uma enzima específica.

No Brasil os herbicidas registrados segundo seu mecanismo de ação são classificados em:

- **Inibidores da ACCase** – atuam inibindo a ação da enzima acetil coenzima A carboxilase (ACCase);

- **Inibidores da ALS ou AHAS** – atuam inibindo a ação da enzima acetolactato sintase (ALS) que também pode receber o nome de acetohidroxi ácido sintase (AHAS), dependendo da reação que inibe;
- **Inibidores do FSII** – atuam inibindo o transporte de elétrons no fotossistema II (não-enzimático);
- **Inibidores do FSI** – atuam inibindo o transporte de elétrons no fotossistema I (não-enzimático);
- **Inibidores da PROTOX (ou PPO)** – atuam inibindo a ação da enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX ou PPO);
- **Inibidores da biossíntese de carotenoides** – atuam inibindo duas enzimas, uma conhecida (4-HPPD) e outra ainda desconhecida, sendo, assim, subdivididos em dois grupos:
  - 1) **Inibidores da HPPD** – atuam inibindo a ação da enzima 4-hidroxifenil-piruvato dioxigenase (4-HPPD);
  - 2) **Inibidores da síntese de carotenoides com ação em enzima desconhecida** – ação semelhante aos herbicidas inibidores HPPD;
- **Inibidores da EPSPs** – atuam inibindo a ação da enzima 5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs);
- **Inibidores da GS** – atuam inibindo a ação da enzima glutamina sintetase (GS);
- **Inibidores da divisão celular** – atuam inibindo a divisão celular (não-enzimáticos), sendo divididos em dois grupos:
  - 1) **Inibidores do arranjo de microtúbulos** – atuam inibindo a formação das fibras dos microtúbulos, impedindo a movimentação dos cromossomos e causando, assim, a interrupção da divisão celular na prófase;
  - 2) **Inibidores da biossíntese de ácidos graxos de cadeia muito longa** – o mecanismo exato de ação ainda não é conhecido, mas se sabe que afetam a síntese proteica, inibindo, assim, a divisão celular;
- **Inibidores da biossíntese de lipídeos (não-ACCase)** – atuam inibindo a síntese de lipídeos, proteínas, isoprenoides e flavonoides, mas o mecanismo exato de ação não é conhecido;

- **Mimetizadores de auxinas (ou auxinas sintéticas)** – apresentam ação semelhante à auxina (não-enzimático), porém potencializada, induzindo mudanças metabólicas e bioquímicas no metabolismo de ácidos nucleicos e na plasticidade da parede celular;
- **Mecanismo desconhecido** – o MSMA é um herbicida cujo mecanismo de ação ainda não foi descrito.

### 2.3.1.6. Em relação ao caráter iônico

Dependendo do caráter iônico, os herbicidas podem ser (CARVALHO, 2013):

- **Ionizáveis** – apresentam cargas dependentes de pH. Herbicidas ionizáveis podem ser:
  - 1) Ácidos** – dissociam-se em um ânion ( $HA^-$ ), liberando  $H^+$ . São exemplos de herbicidas ácidos: glifosato, setoxidim, cletodim, diclofop - metílico, chlorimuron-ethyl, nicossulfurom, metsulfurom - metílico, imazapique, imazetapir, diclosulam, flumetsulam, glufosinato-amônio, 2,4-D, picloram, quincloraque , entre outros;
  - 2) Básicos** – dissociam-se em um cátion ( $HB^+$ ), liberando  $OH^-$ . São exemplos de herbicidas básicos: atrazina , ametrina e metribuzim ;
- **Não-ionizáveis** – não apresentam cargas dependes de pH. Herbicidas não-ionizáveis podem ser:
  - 1) Não-iônicos** – não apresentam carga livres (apolares). São exemplos de herbicidas não-iônicos: diurom , linurom, tebutiurom , clomazona, alacloro etolacloro , molinato , tiobencarbe , entre outros;
  - 2) Catiônicos** – apresentam cargas positivas. São exemplos de herbicidas catiônicos: paraquate e diquate.

### **2.3.1.7 Classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental**

A avaliação do potencial de periculosidade ambiental, conduzida pelo Ibama, se baseia nas características do produto como as propriedades físico-químicas e sua toxicidade para os variados organismos encontrados na natureza; o quanto o produto se acumula em tecidos vivos; se persiste por muito tempo no ambiente; e se consegue se deslocar (solo, ar ou água). Ainda são analisados os perigos de causar mutações, câncer, más-formações em fetos ou embriões, e se podem colocar em risco a reprodução de aves e de mamíferos.

Para efeito de classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental de um agrotóxico, seus componentes e afins, são atribuídas 19 características individuais, entre as citadas, que resultarão na classificação final do produto, obedecendo à seguinte graduação (IBAMA, 2009):

Classe I – Produto Altamente Perigoso

Classe II – Produto Muito Perigoso

Classe III – Produto Perigoso

Classe IV – Produto Pouco Perigoso

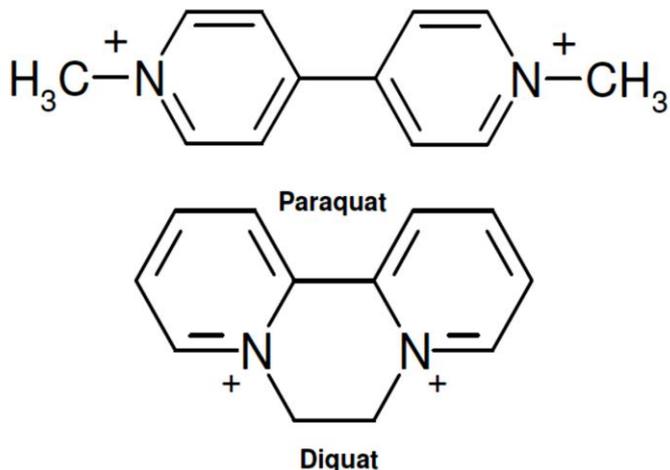
Dessa forma, todos os agrotóxicos registrados no País dispõem de uma dessas quatro classificações que têm a principal função de prevenir e/ou proteger o meio ambiente de possíveis danos causados por agentes químicos. Quanto menor a classe, maior será o perigo de dano ambiental da sua utilização. A classificação ambiental é informada na coluna central do rótulo e na bula dos agrotóxicos.

## 2.4 Diquate e paraquate

### 2.4.1 Aspectos gerais

As principais características destes agrotóxicos também conhecidos como biperidílos estão resumidas na Tabela 2 (AGROFIT, 2003; KOLBERG *et al.*, 2012; MELO, 2010; MENK, 2007; EPA, 1997; CENTRO DE INFORMAÇÃO DO PARAQUAT, 2012; ANVISA, 2011).

Tabela 2 - Características gerais do diquate e paraquate

Características	Diquate	Paraquate
Ingrediente ativo ou nome comum	Dibrometo de diquate	Dicloreto de paraquate
Nº CAS	85-00-7	1910-42-5
Fórmula	$C_{12}H_{12}Br_2N_2$	$C_{12}H_{14}Cl_2N_2$
Formula estrutural	 <p>The image displays two chemical structures. The top structure is Paraquat, consisting of two pyridinium rings connected by a single bond. Each nitrogen atom in the pyridinium rings is bonded to a methyl group (CH<sub>3</sub>) and carries a positive charge (+). The bottom structure is Diquat, which consists of two pyridinium rings fused to a central six-membered ring. Each nitrogen atom in the pyridinium rings carries a positive charge (+).</p>	
Identificação do ingrediente ativo	<p>São sólidos cristalinos, incolores, higroscópicos e em suas formulações comerciais são líquidos de cor marrom.</p> <p>Em formulações aquosas não são explosivos e nem inflamáveis, são estáveis em meio levemente ácido ou neutro, mas podem ser hidrolisados em soluções fortemente alcalinas.</p>	

Densidade (g L) (20 °C)	1200	1240-1260
Ponto fusão (°C)	300 com decomposição	~300 com decomposição
Solubilidade (g L <sup>-1</sup> ) (25 °C)	Estes herbicidas, por serem sais de amônio quaternário têm elevada polaridade, sendo altamente solúveis em água (620 - 700), ligeiramente solúveis em metanol e praticamente insolúvel em solventes orgânicos	
pH de formulações líquidas	6,0-7,0	6,5-7,5
Volatilidade	Não volátil	
Grupo químico	Bipiridílio	
Classe	Herbicida	
Classificação toxicológica	Classe II	Classe I
Uso agrícola	<p>Aplicação em pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de beterraba, café, cebola, citros, feijão e pêssego.</p> <p>Aplicação como dessecante das culturas de arroz, batata, feijão e soja.</p>	<p>Aplicação em pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de abacate, abacaxi, algodão, arroz, aspargo, banana, batata, beterraba, cacau, café, cana-de açúcar, chá, citros, coco, couve, feijão, maçã, milho, pastagens, pêra, pêssego, seringueira, soja, sorgo, trigo e uva.</p> <p>Aplicação como dessecante da cultura de algodão, arroz, batata, cana-de-açúcar, milho, soja e sorgo.</p>

### 2.4.2 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação do diquate e do paraquate se dá por inibição do fotossistema I (conjunto de pigmentos da planta onde há absorção de luz para produção de pigmentos fotossintéticos, clorofila a, clorofila b e carotenóides). As moléculas dos bupiridílo desviam elétrons dos centros de ferro-enxofre do fotossistema I do cloroplasto e são reduzidas. O bupiridílo reduzido reage com o oxigênio, formando superóxido ( $O_2^-$ ), que, por sua vez, gera peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e este ataca as membranas celulares da planta, levando à sua desidratação completa, causando degradação das membranas, ocasionando vazamento do suco celular e morte do tecido (Figura 4) (CENTRO DE INFORMAÇÃO DO PARAQUATE, 2012).

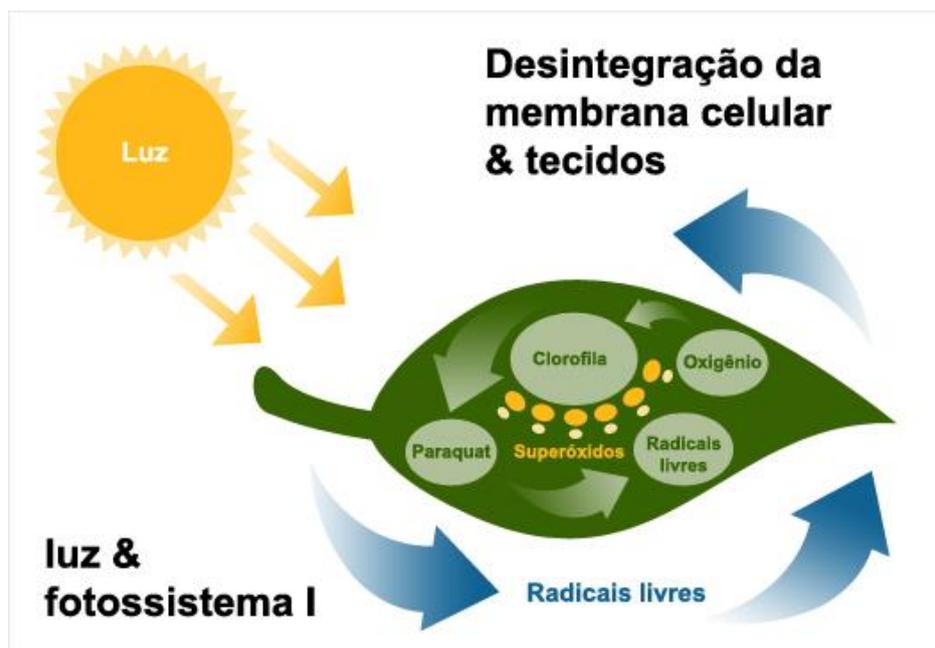


Figura 4 - Mecanismo de ação do diquate e paraquate (Centro de Informações sobre paraquate)

### 2.4.3 Características toxicológicas

A toxicidade em mamíferos, do diquate e paraquate decorre do seu mecanismo bioquímico o qual ainda não é totalmente esclarecido. Supõe-se que os danos nos tecidos devem-se ao aumento de formação de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como: radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ). Esses radicais e as EROs são instáveis, causam danos às membranas, às proteínas e ao DNA, levando à falência dos sistemas antioxidantes, como superoxidismutase, catalase e vitaminas C e E3 (MENK, 2007; CENTRO DE INFORMAÇÃO DO PARAQUAT, 2012).

Independente da via de exposição, os pulmões são os órgãos que apresentam as mais sérias alterações patológicas causadas pelos efeitos tóxicos do paraquate.

O diquate produz efeitos tóxicos similares aos observados para o paraquate, exceto pelos danos pulmonares e pela fibrose progressiva, presentes somente neste último. Até o presente, o principal antídoto ou tratamento eficiente para amenizar os efeitos tóxicos destes herbicidas é a Terra de Fuller (MELO, 2010; ANVISA, 2011).

A dose letal média ( $DL_{50}$ ) oral, do paraquate em animais varia de 22 a 262 mg  $kg^{-1}$ , de acordo com a espécie. Em humanos, não existe consenso, mas sabe-se que a ingestão de 10 a 15 mL de uma solução a 20%, concentração na qual o produto normalmente é comercializado, seria suficiente para provocar intoxicações fatais, embora existam relatos de fatalidades provocadas pela ingestão de apenas 1 mL dessa solução (MENK, 2007).

Nas últimas décadas, o paraquate foi um agente bastante popular para o suicídio, mas, atualmente há declínio do envenenamento intencional. Paraquate e diquate são herbicidas altamente tóxicos e o tratamento dos pacientes intoxicados requer muita habilidade e conhecimento dos procedimentos apropriados de tratamento (CENTRO DE INFORMAÇÃO DO PARAQUATE, 2012; ANVISA, 2011).

#### 2.4.4 Regulamentação

O paraquate foi proibido, tem seu uso restrito, ou utilização não autorizada, em 32 países (incluindo os países da União Europeia), principalmente por seu potencial significativo para intoxicações acidental e intencional.

Mas há uma forte resistência da indústria de incluir paraquate na Convenção de Roterdã sobre Consentimento Prévio Informado (PIC) e permanece fora da lista PIC. Muitas organizações internacionais, como a *Rainforest Alliance*, *Fairtrade*, *Forest Stewardship Council*, e os gigantes alimentares como Dole voluntariamente proibiram paraquate em seus sistemas de produção (CDC, 2013).

Diquate e paraquate podem ser aplicados em culturas como pós-emergentes, com o limite máximo de resíduo (LMR) segundo a EU, para diquate variando de 0,2 a 0,5 mg kg<sup>-1</sup>, dependendo do cultivo e, para o paraquate, 0,02 mg kg<sup>-1</sup>, com intervalos de segurança que variam de 1 a 16 dias para o diquate e de 1 a 7 dias para o paraquate. A ingestão diária aceitável (IDA) é de 0,002 mg kg<sup>-1</sup> para diquate e 0,004 mg kg<sup>-1</sup> para paraquate (KOLBERG, 2012). O nível máximo que o *Environmental Protection Agency* (EPA) estabelece para o paraquate em alimentos é 0,2 mg kg<sup>-1</sup>.

Para proteger a saúde da população dos riscos associados ao uso destes produtos nas culturas agrícolas nacionais, a ANVISA, trabalha na reavaliação de substâncias ativas utilizadas em agrotóxicos no Brasil. Até hoje, a Agência já proibiu o uso de quatro ingredientes ativos e restringiu severamente o uso de outros 19, utilizados na fabricação de mais de 300 agrotóxicos no país incluindo o paraquate. Os valores de LMR permitidos pela ANVISA para diquate é de 0,5 mg kg<sup>-1</sup> e para o paraquate 0,05 mg kg<sup>-1</sup> (ANVISA, 2003).

O diquate, atualmente é o único herbicida registrado no Brasil para a dessecação da cultura do feijão comum, devendo ser observado o intervalo de segurança para a posterior colheita e comercialização do produto (PORTARIA Nº 01768502, MAPA, 2011).

## 2.5 Determinação de resíduos de agrotóxicos nos alimentos

A determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos compreendem, basicamente, quatro etapas: a primeira etapa consiste na amostragem, que deve ser representativa de um todo. A segunda é o preparo da amostra, isto é, a extração do analito da matriz, remoção de interferentes (*clean-up*) e concentração, evitando, principalmente, a contaminação da coluna cromatográfica. A terceira etapa trata da separação e detecção dos analitos mediante técnicas cromatográficas tradicionais para a sua determinação, como a líquida, a gasosa e por eletroforese capilar, e as espectroscópicas como de massa, infravermelho e ultravioleta). A quarta e última etapa é realizada o processamento dos dados (WILLOWSKA,A; BIZIUK,M; 2011).

As concentrações de resíduos são expressas em miligramas da substância química por quilograma de cultura/alimentos/mercadoria ( $\text{mg kg}^{-1}$ ). As concentrações são pequenas, sendo que  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  é o mesmo que 1 parte por milhão (ppm).

### 2.5.1 Método Individual para determinação de agrotóxicos em alimentos

O método individual mais utilizado para analitos como diquate e paraquate é o método QuPPE. Este método permite a análise simultânea de um número de agrotóxicos altamente polares não passíveis de análises por métodos comuns (por exemplo, multiresíduos, tais como QuEChERS). O método envolve a extração com metanol acidificado, medição usando UPLC-MS/MS, e utilização de padrões internos marcados isotopicamente para a quantificação exata. Vários métodos UPLC-MS/MS (cada uma cobrindo um grupo diferente de agrotóxicos) são fornecidos pelos Laboratórios de Referência da União Européia, com a possibilidade de selecionar o método preferido de acordo com o escopo de agrotóxicos que gostaria de cobrir.

O QuPPE, é um método dinâmico e é atualizado periodicamente à medida que mais agrotóxicos ou formas de separação vão sendo introduzidas. Existe uma versão para os alimentos de origem vegetal e um para alimentos de origem animal (atualmente com foco em leite e ovos).

O método QuPPE consiste na extração dos agrotóxicos da porção (matriz) de ensaio seguido de ajuste com água e da adição de metanol acidificado. A mistura é centrifugada, filtrada e diretamente analisada por UPLC-MS/MS. Várias opções para a análise UPLC-MS/MS simultânea de diferentes agrotóxicos são fornecidas. A quantificação é, na maior parte dos casos, realizada com a ajuda de um composto químico, análogo marcado isotopicamente (deuterados) que são usados como padrões internos. Estes padrões internos deuterados são adicionados às amostras da curva analítica, amostras de controle de qualidade e amostras em estudo em concentração conhecida e constante e são utilizados para corrigir variações experimentais durante o preparo e análise das amostras, e seu uso é fortemente recomendado (EURL-SRM, 2013).

Neste trabalho se avaliou modificações para o método QuPPE versão 7, atualmente (publicada em Novembro 2013) já existe a versão 7.1 como sendo a última versão. Nesta última versão não foi feita nenhuma modificação com respeito ao método para diquate e paraquate.

## **2.6 Validação de métodos analíticos**

### **2.6.1 Conceito de validação**

É a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido foram atendidos (INMETRO, 2011).

Para assegurar que um novo método analítico seja capaz de gerar informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma série de estudos experimentais denominados validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência (RIBANI *et al.*, 2004).

A validação é o processo realizado para demonstrar que o método é aceitável para o propósito pretendido. Devem ser consideradas as incertezas envolvidas no processo analítico, incluindo aquelas relacionadas aos equipamentos, padrões, calibrações, analistas e ambiente. O processo de validação exige do analista

planejamento e conhecimento para obter resultados confiáveis e verificar sua validade perante as exigências das análises. Assim, a validação deve ser bem definida e fundamentada para atender às exigências das agências regulamentadoras. Nacionalmente, destacam-se o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e ANVISA, como agências regulamentadoras (NATSUE, 2004).

Internacionalmente, existem órgãos como a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), Organização Internacional para Padronização (ISO), EPA, Comitê Europeu para Análise Química (EURACHEM) e *International Conference on Harmonisation* (ICH).

É importante ressaltar que os guias fazem recomendações vagas, tornando flexível, em alguns casos, a forma como será realizado o procedimento de validação. Nessas situações, o analista procede de acordo com suas possibilidades experimentais e interesse, logicamente, sem deixar de se pautar pelos princípios gerais contidos nas recomendações existentes. Ocorre também que para certas aplicações não há legislação, norma ou recomendação vigente, indicando o protocolo de validação a ser seguido para aquele método, e para determinada matriz ou analitos (EPA, 2007; ANVISA, 2003; CASSIANO *et al.*, 2009).

### **2.6.2 Parâmetros de validação**

Diferentes trabalhos na literatura e agências regulamentadoras descrevem os parâmetros que devem ser avaliados na validação de um método analítico, havendo uma concordância quanto à avaliação destes.

Os parâmetros de validação devem estar claramente declarados no procedimento documentado e incluir, quando aplicável (INMETRO, 2011; SANCO, 2013):

- Seletividade
- Linearidade
- Faixa de trabalho e Faixa linear
- Limite de detecção

- Limite de quantificação
- Tendência/recuperação
- Precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade)
- Robustez

As similaridades e diferenças quanto aos parâmetros de validação da ANVISA, INMETRO e ICH podem ser visualizadas na Tabela 3

Tabela 3 - Parâmetros de validação das diferentes agências regulamentadoras.

ICH*	INMETRO**	ANVISA***
Especificidade	Especificidade e seletividade	Especificidade e seletividade
Escala linear	Faixa de trabalho e Faixa linear de trabalho	Intervalo da curva de calibração
Linearidade	Linearidade	Linearidade
Limite de detecção	Limite de detecção	Limite de detecção
Limite de quantificação	Limite de quantificação	Limite de quantificação
	Sensibilidade	
Exatidão	Exatidão e tendência	Exatidão
Precisão - repetibilidade - reprodutibilidade - precisão intermediária	Precisão - repetitividade - reprodutibilidade - precisão intermediária	Precisão - repetibilidade - reprodutibilidade - precisão intermediária
Robustez	Robustez	Robustez
Incerteza de medição	Incerteza de medição	Incerteza de medição

\* *International Conference on Harmonization (ICH)*

\*\* Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)

\*\*\* Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

### 2.6.2.1 Linearidade e curva analítica

A linearidade é a capacidade de um método analítico em demonstrar que o sinal obtido é diretamente proporcional à massa de analito adicionado. Recomenda-

se que a linearidade deva ser avaliada usando no mínimo 5 a 6 concentrações diferentes. Esse parâmetro é avaliado pela construção de um gráfico de resposta (y) versus concentração do analito (x), usando o método dos mínimos quadrados para obter uma função  $y = ax + b$ . Onde **a** é o coeficiente angular ou inclinação da reta e **b** é o coeficiente linear ou intercepto.

A faixa linear deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado. A concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se encontrar no centro da faixa linear. A maior parte dos guias de regulamentação recomenda que os pontos das curvas sejam preparados em matriz, com o objetivo de contabilizar os erros de preparo das amostras, dos padrões e de injeção das soluções padrão e das amostras (INMETRO, 2011).

#### **2.6.2.1.1 Padrão Interno (PI)**

Padrão interno é definido como um composto químico, análogo estrutural ou marcado isotopicamente (deuterados), adicionado às soluções da curva analítica, amostras de controle de qualidade e amostras em estudo, em concentração conhecida e constante. Utilizado para corrigir variações experimentais durante o preparo e análise das amostras, o seu uso é fortemente recomendado (MAGABI, 2013).

Para análises com UPLC-MS/MS os padrões internos tipo análogo estrutural são de menor custo de aquisição, tem maior facilidade de obtenção, mas tem a probabilidade de apresentarem efeito matriz diferente do analito em estudo, e não há como garantir que tenha o mesmo comportamento do analito.

Por outro lado, os padrões internos marcado isotopicamente (deuterados) outorgam maior segurança na análise e apresentam o mesmo efeito matriz do analito. Este tipo de padrão interno é o mais recomendado apesar de ter dificuldades de importação e custo mais elevado (MAGABI, 2013).

Os padrões escolhidos para este estudo foram Dibrometo de diquate D4 (98,5%) e Diodeto de paraquate D6 (97,5%).

### **2.6.2.2 Seletividade**

A seletividade de um método está relacionada à sua capacidade de diferenciar a presença de outras espécies interferentes na amostra, como substâncias endógenas, produtos de degradação e impurezas, bem como outras substâncias de propriedades similares que podem estar presentes no meio. Um método analítico é considerado seletivo quando este é capaz de produzir respostas para vários analitos, distinguindo-as perfeitamente entre si (INMETRO, 2011).

Na cromatografia líquida a seletividade pode ser alcançada através da otimização das etapas de extração, separação e detecção dos analitos. A seletividade na etapa da análise cromatográfica pode variar de acordo com o tipo de fase estacionária, composição da fase móvel e sistema de detecção utilizado. Em relação à etapa de extração, a seletividade do método é regida pelo tipo de técnica de extração selecionada e por variáveis envolvidas como tipo de solventes, fase extratora e tempo de extração (PIZZUTTI, 2006).

### **2.6.2.3 Limite de Detecção e de Quantificação**

Quando são realizadas medidas em amostras com baixas concentrações do analito, como por exemplo, nas análises de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado e quantificado pelo método.

O Limite de Detecção (LOD) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada como um valor exato. O Limite de Quantificação (LOQ) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma finalidade determinada. Ambos são geralmente expressos em unidades de concentração (RIBANI et al., 2004; SANCO, 2013).

### 2.6.2.4 Exatidão

A exatidão define a proximidade entre o valor medido e o valor real aceito para uma determinada amostra, sendo determinado pela medida em replicata de uma amostra com concentração conhecida de um analito. Os valores de recuperação considerados adequados (exatidão) são estabelecidos em função da concentração dos agrotóxicos analisados e de acordo com a área de pesquisa. Para análise multiresíduos de agrotóxicos em diferentes matrizes, diversas fontes estabelecem intervalos de recuperação variáveis, dependendo da concentração ensaiada conforme Tabela 4 (SANCO, 2013)

Tabela 4 - Valores de recuperação (%) em função da concentração

Concentração do analito (%)	Valores de recuperação (%)
≥ 10	98 - 102
≥ 1	97 - 103
≥ 0,1	95 - 105
≥ 0,01	90 - 107
≥ 0,0010 - ≥ 0,00001	80 - 110
≥ 0,000001	60 - 115
≥ 0,0000001	40 - 120

Na indisponibilidade de material de referência certificado, a exatidão pode ser avaliada através dos ensaios de fortificação e recuperação geralmente expressa em percentual, podendo esta ser calculada através da Equação 1.

$$R\% = \frac{C1 - C2}{C3} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

R% = Percentual de recuperação;

C1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C3 = Concentração usada para fortificação.

São aceitos intervalos de recuperação entre 70 e 120%, com precisão de até 20% para a maioria dos métodos analíticos (SANCO, 2013).

Outras fontes internacionais que realizam estudos com resíduos de agrotóxicos em alimentos como o *United States Department of Agriculture* (USDA) e *European Union* (EU) sugerem aceitabilidade da performance analítica entre 50% e 150% entre 40% e 160%, respectivamente, quando os níveis de concentração analisados estão em torno do limite de quantificação do método (LQ) e na mais baixa concentração de calibração da curva analítica (LCL) (IMOTO, 2004).

### 2.6.2.5 Precisão

A precisão é a avaliação da dispersão de resultados obtidos em ensaios independentes, repetidos para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. A precisão deve ser avaliada de três maneiras: através da repetibilidade (precisão intra-dia); precisão intermediária (precisão inter-dias) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial), sendo usualmente expressa como desvio padrão. A precisão pode ser numericamente expressa em termos do desvio padrão relativo (RSD). (Equação 2).

$$\text{RSD\%} = \frac{s \times 100}{x_m} \quad (2)$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

$x_m$  = valor médio determinado.

Em determinação de resíduos de agrotóxicos, para verificação da precisão do método, isto é, o quanto uma medida está dispersa em relação à média, os coeficientes de variação (CV%) obtidos a partir dos valores referentes aos ensaios de recuperação são considerados adequados quando iguais ou inferiores a 20% (ROQUETE, 2013).

### 2.6.3 Efeito matriz

Efeito matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental (MAPA, 2011).

O efeito matriz em LC-MS/MS é normalmente causado pela interferência dos componentes da matriz que eluem no mesmo tempo de retenção que o analito e por isso, competem com o analito durante o processo de ionização. O número de íons do analito pode ser diminuído pela interação com os íons da matriz, o que é chamado de *ion suppression*, ou aumentar (pela presença dos íons da matriz), resultando num efeito matriz negativo ou positivo, respectivamente (PIZZUTTI, 2006).

O mecanismo exato da supressão iônica é desconhecido, porém é causado pela presença de substâncias não-voláteis ou pela competição entre um analito e a coeluição de um componente da matriz não monitorado. O efeito matriz também é dependente da natureza química do analito, pois a eficiência de ionização dos analitos polares é mais influenciada pela presença de coeluentes provenientes da matriz quando comparada com analitos apolares (PRESTES et al., 2009).

O efeito matriz pode afetar fortemente a reprodutibilidade, linearidade e precisão do método analítico e promover uma quantificação errônea das substâncias em questão. Este efeito é bastante variável e depende da natureza da amostra e devido à sua imprevisibilidade poder haver uma variação na resposta.

Apesar do mecanismo exato que rege o efeito matriz ser ainda desconhecido, é de comum consenso que os componentes coeluídos da matriz podem influenciar na intensidade do sinal em uma possível competição por cargas disponíveis ou pela ocupação da superfície da gota formada na interface. (TRUFELLI et al., 2011)

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido como parte de um projeto de cooperação entre o Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes (CEPARC), laboratório do Departamento de Química da UFSM e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), que forneceu as amostras para este estudo.

Para o desenvolvimento experimental deste trabalho foram avaliadas as modificações do método QuPPE versão 7, método do laboratório de Referência da União Européia para desenvolvimento de métodos individuais para determinação de resíduos de agrotóxicos (EURL-SRM).

Após a validação do método realizou-se o monitoramento de amostras de feijão-caupi provenientes de três áreas experimentais, instaladas em diferentes estados brasileiros.

Tanto o desenvolvimento do método quanto sua aplicação para análise de diquate e paraquate em feijão-caupi, foram realizadas empregando UPLC-MS/MS, com ionização por ESI no modo positivo.

#### 3.1 Instrumentação

- Cromatógrafo a líquido, sistema UPLC-MS/MS (Waters, EUA) composto por:
  - Amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de degaseificação;
  - Coluna cromatográfica Obelisc™ R, 150 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e 5 mm de tamanho de partícula (Sielc, EUA). Esta coluna tem grupos catiônicos perto da superfície da sílica a partir de grupos aniônicos separados por uma cadeia hidrofóbica. Tem caráter de fase reversa e, portanto não pode ser utilizada no modo de HILIC (OLSEN, 2013).

- Detector MS Triplo Quadrupolo, Xevo TQ-S (Waters Micromass, Inglaterra) com fonte API, utilizando o modo de ionização por electronebulização com interface (Z-spray), operando no modo positivo;
- Sistema de aquisição de dados através do *software* MassLynx e Targetlynx 4.1 (Waters Micromass, Inglaterra);
- Sistema de purificação de água Milli-Q® - resistividade 18,2 MWcm (MilliPore, EUA);
- Balança analítica de precisão, com 4 casas decimais (Sartorius, Alemanha);
- Balança analítica de precisão, com 2 casas decimais (Sartorius, Alemanha);
- Pipetador Handy Step (Brand, Alemanha);
- Homogeneizador Polytron PT 3100 (Polytron, Suíça);
- Centrífuga Thermo Scientific Modelo Heraeus Megafuge 16 R
- Moinho IKA-Universalmühle M20

### 3.2 Gases

- Argônio 99,999% de pureza (Air Products, Brasil) (gás de colisão do UPLC-MS/MS);
- Nitrogênio 99,999% de pureza (Air Products, Brasil) (gás de desolvatação do UPLC-MS/MS)

### 3.3 Materiais

Todos os materiais empregados para preparo e armazenamento das soluções analíticas e análises do diquate e paraquate foram de polipropileno (PP) devido à forte interação destes agrotóxicos com o vidro.

- Tubos de polipropileno para centrifuga, com tampas rosqueadas, capacidade de 50 mL (Nalgene, EUA);
- Tubos de teflon, capacidade de 250 mL;
- Frascos de polipropileno, capacidade de 20, 50 e 100 mL, com tampa rosqueada e batoque de teflon (Vitlab, Alemanha);

- *Vials* de polipropileno para amostrador automático, com tampa em PTFE/Silicone (Waters, EUA).
- Filtros para seringa de Polietersulfano (PES) 0,45 µm (Titan, EUA)

### 3.4 Solventes e reagentes

- Metanol, grau resíduo (Mallinckrodt, EUA);
- Acetonitrila, grau resíduo (J.T. Baker, EUA);
- Ácido fórmico p.a. 88%, (J.T. Baker, EUA);
- Formiato de amônio p.a. > 97.0% (Fluka Analytical, Alemanha)
- Ácido clorídrico p.a. 36,5-40,0% (Casa da Química, Brasil)
- Padrões de agrotóxicos: Dibrometo de Diquate ( $C_{12}H_{12}Br_2N_2$ ) e Dicloreto de Paraquate ( $C_{12}H_{14}Cl_2N_2$ ) com pureza de 98% e 97,5% (Dr. Ehrenstorfer, Augsburg-Alemanha).

### 3.5 Preparo das soluções analíticas

As soluções analíticas estoques, dos analitos diquate e paraquate, assim como dos padrões deuterados (1000 mg L<sup>-1</sup> como cátion) foram preparadas a partir do cálculo para determinar a quantidade de cada padrão a ser pesado, levando-se em conta a pureza e a fórmula molecular do agrotóxico na forma de sal.

De maneira individual cada substância foi pesada diretamente dentro dos frascos de polipropileno, com capacidade de 20 mL, e dissolvidos imediatamente com metanol acidificado com 1% ácido fórmico. Finalmente, foram homogeneizados por 5 minutos em banho de ultrassom. No caso da dissolução do paraquate D6 utilizou-se água devido sua insolubilidade em solventes orgânicos.

Após realizado o preparo das soluções estoques individuais, prepararam-se 5 mL de uma mistura dos analitos diquate e paraquate a uma concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>. A partir desta solução mistura diluiu-se novamente a concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>.

Para a confecção das curvas analíticas e para os estudos de linearidade e de efeito matriz, a solução  $10 \text{ mg L}^{-1}$  foi diluída às concentrações de 0,1; 1 e  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , as quais foram utilizadas para preparo das soluções de trabalho em solvente orgânico e em extrato da matriz. Para isso, volumes conhecidos dessas soluções foram utilizados para a confecção das curvas analíticas, como descrito nas Tabelas 5 e 6.

Os padrões deuterados, diquate D4 e paraquate D6, foram diluídos a partir de suas soluções estoque individuais para o preparo de uma solução mistura de concentração de  $40 \text{ mg L}^{-1}$  (P.I.1) a qual foi utilizada para a fortificação das amostras nos estudos de recuperação. Visando utilizar os padrões deuterados nas curvas analíticas em concentração fixa, foi preparada uma solução de concentração  $2 \text{ mg L}^{-1}$  a partir da solução mistura de  $40 \text{ mg L}^{-1}$ , a qual foi denominado de P.I.2 neste estudo.

Todas as soluções analíticas foram armazenadas em congelador a  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e, antes do uso, retiradas com antecedência do congelador e deixadas em repouso até atingirem temperatura ambiente. Posteriormente, foram colocadas em banho de ultrassom por 5 minutos para completa homogeneização.

Tabela 5 – Preparo da curva analítica a partir de soluções analíticas preparadas em solvente orgânico.

Concentrações das soluções ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		0,001	0,002	0,0025	0,005	0,01	0,05	0,1
Extrato “branco” da matriz ( $\mu\text{L}$ )		-	-	-	-	-	-	-
Água e Metanol acidificado 1:1 (v/v) ( $\mu\text{L}$ )		4700	4650	4625	4500	4250	4500	4250
Soluções analíticas de trabalho ( $\mu\text{L}$ )	$0,1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	50	100	125	250	500	-	-
	$1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	-	-	-	-	-	250	500
	$5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	-	-	-	-	-	-	-
P.I. 2 ( $2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ )		250	250	250	250	250	250	250
Volume total (mL)		5	5	5	5	5	5	5

Tabela 6 – Preparo da curva analítica a partir de soluções analíticas preparadas em extrato de matriz.

Concentrações das soluções ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		0,001	0,002	0,0025	0,005	0,01	0,05	0,1
Extrato “branco” da matriz ( $\mu\text{L}$ )		4450	4400	4375	4250	3500	4250	3500
Água e Metanol acidificado 1:1 (v/v) ( $\mu\text{L}$ )		250	250	250	250	250	250	250
Soluções analíticas de trabalho ( $\mu\text{L}$ )	0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	50	100	125	250	500	-	-
	1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	-	-	-	-	-	250	500
	5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	-	-	-	-	-	-	-
P.I.2 (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		250	250	250	250	250	250	250
Volume (mL)		5	5	5	5	5	5	5

### 3.6 Otimização do preparo da amostra

As amostras do feijão-caupi foram moídas até sua completa trituração (para a obtenção de pó, textura fina).

Em seguida, para a obtenção de uma amostra completamente homogênea, preparou-se um *slurry* de feijão-caupi e água. Para isso o feijão-caupi moído foi homogeneizado com água em *Ultra-Turrax* por aproximadamente 5 minutos.

Na otimização para preparo do *slurry*, prepararam-se amostras nas proporções 1:1; 1:1,5; 1:3; e 1:4 (feijão-caupi/água) para obter-se a proporção mais adequada. Para a obtenção das proporções de *slurry* pesou-se, com o auxílio de uma balança analítica, em 4 diferentes frascos de teflon, 5; 4; 2,5 e 2 g de feijão moído. A cada um dos frascos foi adicionado, em separado, respectivamente, 5; 6; 7,5 e 8 g de água ultra pura, e os mesmos foram levados para homogeneização em *Ultra-Turrax*, por

aproximadamente 5 minutos. Fez-se a verificação visual da homogeneização de *slurry* e determinou-se a proporção mais adequada de feijão-caupi/água, tendo em vista o fato de que amostras muito compactas oferecem dificuldade de manipulação, como por exemplo, na pesagem.

Neste estudo, foram usadas amostras “branco” de feijão fornecidas pela Embrapa, que não continham agrotóxicos.

### **3.7 Otimização do preparo do solvente extrator**

Foram testadas diferentes proporções do solvente extrator MeOH/ HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup>, sendo estas: 1:1; 6:4; 7:3; 8:2; 9:1

Para o preparo do solvente metanol contendo ácido clorídrico 0,5 mol L<sup>-1</sup>, nas diferentes proporções, inicialmente preparou-se a solução de HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Para isto transferiu-se com o auxílio de um pipetador automático, um determinado volume de ácido clorídrico concentrado para um balão volumétrico com capacidade para 250 mL, já contendo água, e completou-se o volume com água. Foi tampado e homogeneizado por inversão. Para o preparo da mistura entre metanol e solução de HCl, determinados volumes de solução de HCl foram adicionados num frasco com capacidade de 500 mL que já continha metanol. Essa solução de metanol contendo ácido clorídrico 0,5 mol L<sup>-1</sup>, nas proporções testadas, foi utilizada para o procedimento de extração do método QuPPE da EU versão 7 modificado.

### **3.8 Otimização dos parâmetros de extração**

**3.8.1 Temperatura:** Testou-se a influência da temperatura de 2 maneiras:

- 1) Após a adição do solvente extrator, levando-se diretamente o frasco contendo amostra e solvente extrator para banho de água a 80° C por 15 min.
- 2) Sem o banho de água.

Também testou-se, a influência da temperatura na centrifugação, levando-se a amostra diretamente do banho de água a 80° C para centrifugação, bem como deixando-se esfriar completamente antes da centrifugação.

**3.8.2 Filtração:** Testou-se a influência da utilização de uma etapa de filtração do extrato final antes de injeção no UPLC-MS/MS. Para isso o extrato obtido após centrifugação foi filtrado e injetado no sistema cromatográfico e o resultado foi comparado com o mesmo extrato injetado sem a passagem por filtro.

### 3.9 Análise dos solventes e reagentes

A análise dos solventes e reagentes tem por objetivo avaliar se os mesmos estão livre da contaminação por substâncias que possam interferir na análise estudada, como por exemplo, os próprios agrotóxicos em estudo.

Para análise dos solventes e reagentes misturaram-se 5 mL de água ultra pura e 7,5 mL do solvente extrator. Esta mistura foi submetida ao procedimento de extração e ao final foi levado para análise por UPLC-MS/MS.

### 3.10 Otimização das condições cromatográficas

As condições instrumentais empregadas para UPLC-MS/MS foram:

➤ Para o UPLC:

- Volume de injeção de 10 µL, no modo *full loop*, realizado pelo amostrador automático;
- Temperatura do forno da coluna constante: 40 °C;
- Eluente A: Formiato de amônio 20 mM em água, ajustado a pH 3 com ácido fórmico;
- Eluente B: Acetonitrila;

- O programa foi iniciado em 20% eluente A e incrementando linearmente a 80% em 5,2 min, mantendo-se constante durante 2,6 min e diminuindo linearmente para 25% do eluente A. Esta condição foi mantida constante por 1,5 min. A coluna foi reequilibrada durante os 2,6 min da proporção 80% eluente A.
- Vazão da fase móvel constante em 0,45 mL min<sup>-1</sup>;
- Tempo total de corrida de 9,3 minutos
- Para o MS:
  - Ionização por API com ESI no modo positivo;
  - Parâmetros da fonte de ionização: voltagem do capilar de 3,0 kV, temperatura 120 °C;
  - Temperatura do gás de desolvatação: 400 °C;
  - Vazões de nitrogênio para desolvatação da amostra e para o cone da amostra, respectivamente 500 e 150 L h<sup>-1</sup>;
  - Vazão do gás de nebulização 7,0 L h<sup>-1</sup>;
  - Vazão do gás de colisão (Ar), 0,15 mL min<sup>-1</sup>;
  - A energia de colisão e a voltagem no cone de amostragem foram otimizadas através da infusão das soluções analíticas diretamente no espectrômetro de massas com solução analítica na concentração de 0,2 mg L<sup>-1</sup> de cada agrotóxico estudado . Duas transições MRM foram monitoradas para cada um dos analitos, de acordo com os parâmetros presentes na Tabela 7, sendo uma delas empregada para a quantificação do analito e a outra para a confirmação do mesmo. Para cada agrotóxico definiu-se uma razão (*ion ratio*) entre as áreas destas transições.

Tabela 7 – Agrotóxicos analisados por UPLC ESI MS/MS modo positivo, tempo de retenção e parâmetros MRM.

Agrotóxicos	$t_R$ (min)	Íon Precursor ( $m/z$ )	Voltagem do Cone (V)	Transições			
				Quantificação		Confirmação	
				Íon Produto	Energia de Colisão (eV)	Íon produto	Energia de Colisão (eV)
Diquate	5,08	183,1	10	157	20	168 130	25 30
Paraquate	4,81	186,1	10	171,1	20	77,0	35
Diquate D4 (P.I.)	5,12	186,1	10	158	20	186,1	30
Paraquate D6 (P.I.)	4,67	190,1 192,1	10	174	18	192,1	35

### 3.11 Validação do Método QuPPE versão 7 modificado

Primeiramente, injetou-se o branco dos reagentes (procedimento de extração realizado sem a matriz e sem os analitos) e o branco da matriz (extração da matriz sem conter os analitos).

#### 3.11.1 Curva analítica e linearidade

A linearidade das curvas analíticas foi avaliada através da injeção das soluções preparadas nas tabelas 5 e 6, tanto em solvente orgânico quanto em extrato branco da matriz de feijão nas concentrações de 1; 2; 2,5; 5; 10; 50 e 100 ng mL<sup>-1</sup>.

As soluções foram injetadas em ordem crescente de concentração do 1º ao 7º ponto, onde as soluções em solvente orgânico e em extrato da matriz, de mesma

concentração, foram injetadas sucessivamente a fim de evitar *carryover* na coluna cromatográfica. Este procedimento foi repetido 7 vezes.

A quantificação foi realizada por padronização interna onde cada curva analítica foi construída através da relação entre área da substância / área do padrão interno e a razão de massa da substância/massa do padrão interno. Os valores de razão de área e razão de massa foram usados para obter a equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

### 3.11.2 Avaliação do efeito matriz do feijão-caupi

O efeito matriz é resultante da influência de componentes coextraídos da matriz, que podem aumentar (efeito matriz positivo) ou diminuir (efeito matriz negativo) o sinal dos analitos, quando comparada a resposta dos analitos em solvente orgânico (FRENICH *et al.*, 2009).

Para a avaliação da existência do efeito matriz dos extratos de feijão, nas análises por LC, realizou-se a comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas em solvente orgânico e daquelas obtidas com soluções analíticas preparadas em extrato da matriz. O cálculo foi efetuado aplicando-se a equação 3.

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \frac{A1 - A2}{A2} \times 100 \quad (3)$$

onde:

A1 = Média das áreas de cada agrotóxico da solução analítica, preparada em matriz, numa dada concentração;

A2 = Média das áreas de cada agrotóxico da solução analítica, preparada em solvente orgânico, numa dada concentração.

Assim, verifica-se se a matriz exerce efeito positivo ou negativo sobre o resultado da análise (PIZZUTTI, 2009). Em análises quantitativas a presença de efeito matriz pode levar a quantificações errôneas do analito, se as soluções analíticas forem preparadas somente em solvente orgânico. Há diversas maneiras de se eliminar/compensar o efeito matriz, sendo que uma delas é pela utilização das soluções analíticas preparadas no extrato da matriz (*matrix-matched standards*), com a mesma composição das amostras analisadas (REICHERT, 2012).

Segundo recomendação de SANCO, resultados com efeito matriz entre +20% e -20% são considerados aceitáveis para análises de contaminantes em alimentos a nível de traços (SANCO, 2013).

### 3.11.3 Determinação da estimativa do LOD e LOQ, do instrumento e do método

A partir dos dados de linearidade da curva analítica de diquate e paraquate, se procedeu a determinar a estimativa do limite de detecção do instrumento (LODi) e do método (LODm), e também do limite de quantificação do instrumento (LOQi) e do método (LOQm).

A partir das áreas e do RSD (%), (n=7), de cada composto, presente nas sete soluções analíticas estudadas, aplicando-se a equação 4, obteve-se a estimativa do LODi ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

$$\text{LODi } (\mu\text{g L}^{-1}) = 3 \times \text{RSD} \times C \quad (4)$$

onde:

RSD: Desvio padrão relativo das áreas obtidas;

C: Concentração da solução analítica.

Multiplicando-se o valor estimado do LODi pelo fator obtido para o método de extração (o qual é obtido pela razão entre a concentração da fortificação e a

concentração dos agrotóxicos antes da injeção, neste estudo o fator foi 3), obteve-se a estimativa do LODm ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). A partir do LODi, aplicando-se a equação 5, obteve-se o LOQi.

$$\text{LOQi } (\mu\text{g L}^{-1}) = 10 \times \text{RSD} \times C \quad (5)$$

O valor do LOQi ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) também pode ser obtido multiplicando o valor do LODi por 3,33.

O LOQm estimado foi obtido multiplicando-se o LOQi pelo fator do método de extração (fator 3). Porém, considera-se o valor verdadeiro do LOQm (em  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), como sendo a menor concentração que, ao ser fortificada na matriz, apresentar recuperações entre 70 e 120%, com RSD menor ou igual a 20% (PIZZUTTI, 2006).

#### **3.11.4 Ensaio de fortificação e recuperação para a avaliação da exatidão e precisão**

Os ensaios de fortificação e recuperação tem por objetivo a avaliação da exatidão e da precisão do método. A avaliação da exatidão consiste no cálculo da concentração real medida, no final do procedimento, em comparação com a concentração conhecida inicialmente, adicionada à matriz. Com o cálculo dos valores de RSD (%) pode-se obter informações acerca da repetitividade (precisão) dos dados obtidos.

O procedimento foi realizado 7 vezes ( $n=7$ ), para cada concentração de fortificação 10, 20 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e também para a amostra “branco” do feijão (sem conter os agrotóxicos em estudo), para a verificação da ausência desses agrotóxicos na matriz. O extrato da matriz é chamado de “branco” da matriz e também foi utilizado para o preparo das soluções analíticas.

Em tubos de centrífuga de tampa rosqueável, com capacidade de 50 mL, pesou-se  $12,5 \pm 0,05$  g de *slurry* (1:1,5), correspondendo a 5 g de feijão-caupi. Efetuou-se a fortificação, em 3 concentrações 10, 20 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , com auxílio de um

pipetador automático. Para fortificar na concentração de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ , adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  da solução mistura de concentração  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ . Para os níveis de 20 e  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ , adicionou-se, 100 e 250  $\mu\text{L}$  da solução mistura de concentração  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , respetivamente. Além da mistura dos analitos em diferentes concentrações, adicionou-se também 50  $\mu\text{L}$  de P.I.1.

Após a fortificação das amostras, prosseguiu-se com a extração conforme descrito em 3.14. As análises foram realizadas por UPLC-MS/MS.

### 3.12 Extração pelo método QuPPE versão 7 modificado

Neste estudo, objetivou-se a modificação do método original QuPPE versão 7, tomando em consideração todos os testes realizados, para que este pudesse ser utilizado na matriz em estudo, pois as matrizes estudadas no método original não incluíam o feijão-caupi.

O objetivo foi desenvolver e otimizar um processo de extração que pudesse ser realizado com simplicidade e que além disso, proporcione rendimentos de extração ótimos para a matriz em estudo, que fossem comparáveis aos obtidos pelo método original para analisar diquate e paraquate, mas também para produzir um extrato que pudesse ser introduzido de forma direta no UPLC-MS/MS, tal como descreve o Método QuPPE versão 7 original.

No procedimento utilizado neste trabalho modificou-se o método original QuPPE versão 7, como se relata no item 2.5.1.

Também se utilizou como solvente extrator metanol acidificado (ácido clorídrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) na proporção 6:4 e não realizou-se filtração da alíquota obtida que foi diretamente para vial de polipropileno. Os seguintes passos da extração foram como segue:

Em tubos de polipropileno de 50 mL pesou-se  $12,5 \pm 0,05 \text{ g}$  de *slurry* (1:1,5), correspondendo a 5 g de feijão. Às amostras, foram adicionados 10 mL de solvente extrator (metanol/HCl  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , 6:4) e 50  $\mu\text{L}$  P.I.1 ( $40 \text{ mg L}^{-1}$ ). Agitou-se manualmente de forma vigorosa durante 2 min. Em seguida, levou-se os tubos a

banho de água por 15 min a 80 °C, sendo agitados novamente por 2 min e depois deixados resfriar à temperatura ambiente. Após resfriamento, os tubos foram levados à centrífuga por 5 minutos a 4000 rpm. Finalmente, foram pipetados 700 µL do sobrenadante para *vials* com capacidade para 750 µL. Os *vials* foram tampados e levados ao UPLC-MS/MS para análise (Figura 5).

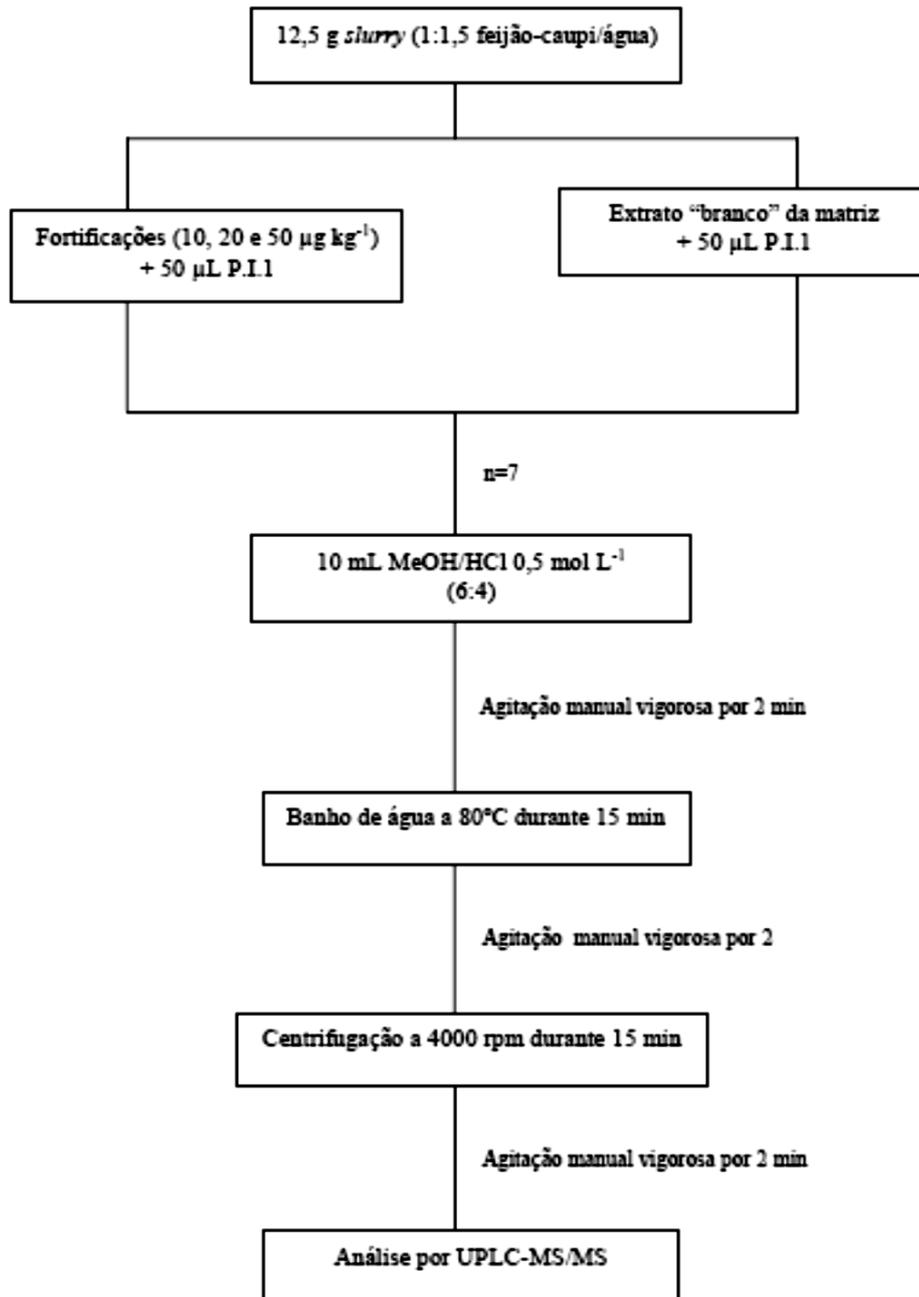


Figura 5 - Esquema do procedimento de extração, método QuPPE versão 7 modificado.

### 3.13 Análise de amostras de feijão-caupi por meio do método otimizado e validado

O método otimizado e validado foi empregado na avaliação residual de diquate e paraquate em amostras de grãos de feijão-caupi, em cujo cultivo, as plantas foram pulverizadas de acordo com a prática usual de herbicidas dessecantes pré-colheita. O Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes (CEPARC) participou no projeto em conjunto com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

As amostras foram estudadas conforme tratamentos com agrotóxicos (paraquate e diquate) aplicados em duas épocas de pulverização, conforme demonstrado na Tabela 08, em três municípios representativos do cultivo no país:

Tabela 8 – Agrotóxicos dessecantes aplicados em pré-colheita para teste no cultivo do feijão-caupi.

Tratamento	Dose (g i.a/há)	Dose Produto Comercial (L ou kg/há)	Época de aplicação
Dicloreto de paraquate	300	1,5	Maturação plena (50 % vagens secas) Maturação plena (75 % vagens secas)
Dibrometo de diquate	300	1,5	Maturação plena (50 % vagens secas) Maturação plena (75 % vagens secas)

As amostras coletadas em campo foram divididas em 3 grupos de 5 amostras cada, de acordo o local experimental, sendo a divisão como segue:

#### Grupo 1

1 A 5 – Amostras experimentais coletadas no município de Teresina-PI

1 – Amostra “branco”

2 - Paraquate aplicado com 50 % das vagens secas

3 - Paraquate aplicado com 75% das vagens secas

4 - Diquate aplicado com 50 % das vagens secas

5 - Diquate aplicado com 75 % das vagens secas

#### Grupo 2

6 A 10 – Amostras experimentais coletadas no município de Dourados-MS

6 – Amostra “branco”

7 -Paraquate aplicado com 50 % das vagens secas

8 - Paraquate aplicado com 75% das vagens secas

9 - Diquate aplicado com 50 % das vagens secas

10 - Diquate aplicado com 75 % das vagens secas

#### Grupo 3

11 A 15 – Amostras experimentais coletadas no município de Sinop-MT

11 – Amostra “branco”

12 -Paraquate aplicado com 50 % das vagens secas

13 - Paraquate aplicado com 75% das vagens secas

14 - Diquate aplicado com 50 % das vagens secas

15 - Diquate aplicado com 75 % das vagens secas

A coleta dos grãos ocorreu de acordo com a recomendação de bula dos herbicidas (07 dias após a pulverização – período mínimo exigido), retirando-se os grãos na área útil de cada parcela, incluindo a parcela testemunha sem a aplicação dos herbicidas. Foram separados 200 g de feijão-caupi de cada parcela para compor uma amostra composta por tratamento. Considerando as quatro repetições, ao total foram fracionados 800 g de grãos de feijão-caupi de cada tratamento, os quais foram armazenados em sacos de papel Kraft e, logo após, enviados para o CEPARC, sendo mantidos em local seco e em temperatura ambiente até seu destino final.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Otimização do preparo das amostras

Optou-se por não usar diretamente o pó de feijão como indica o Método QuPPE da EU versão 7, e sim pela utilização de *slurry* da amostra, porque o *slurry* facilita a obtenção de amostras mais homogêneas e a água empregada tem a função de aumentar a disponibilidade dos agrotóxicos da matriz no momento da extração (REICHERT, 2012).

Baseado nessa escolha, o *slurry* considerado mais adequado foi o de proporção 1:1,5 (feijão-caupi/água). Na análise visual o *slurry* de proporção 1:1 se mostrou muito denso e os *slurries* de proporção 1:3 e 1:4 mostraram-se muito diluídos oferecendo dificuldades de manipulação.

### 4.2 Otimização do preparo de solvente extrator

Num primeiro teste, utilizando o solvente extrator do método original (MeOH/HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> (1:1), para os ensaios de recuperação, nos três níveis de fortificação (10, 20 e 50 µg kg<sup>-1</sup>) para as amostras de feijão-caupi, obtiveram-se valores de recuperação menor que 10% para paraquate e para diquate entre 86-91% (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores de recuperação obtidos para diquate e paraquate nos três níveis de fortificação em estudo, segundo o solvente extrator do QuPPE v7 original.

Método	Recuperação %					
	Diquate			Paraquate		
	10 (µg kg <sup>-1</sup> )	20 (µg kg <sup>-1</sup> )	50 (µg kg <sup>-1</sup> )	10 (µg kg <sup>-1</sup> )	20 (µg kg <sup>-1</sup> )	50 (µg kg <sup>-1</sup> )
QuPPE V7 original	90	86	91	0	4	7

A partir destes primeiros resultados, testaram-se 5 diferentes proporções entre o metanol e a solução de HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> (item 3.7). Os resultados estão presentes na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores de recuperação obtidos para diquate e paraquate nos três níveis de fortificação em estudo, segundo à proporção entre metanol e solução de HCl do solvente extrator modificado.

MeOH/HCl 0,5 mol L <sup>-1</sup>	Recuperações (%)					
	Diquate			Paraquate		
	10 (µg kg <sup>-1</sup> )	20 (µg kg <sup>-1</sup> )	50 (µg kg <sup>-1</sup> )	10 (µg kg <sup>-1</sup> )	20 (µg kg <sup>-1</sup> )	50 (µg kg <sup>-1</sup> )
1:1	104,0	99,4	93,3	268,2	99,5	182,1
6:4	94,5	94,1	90,0	133,8	103,3	134,7
7:3	79,0	84,2	89,1	11,3	49,7	35,8
8:2	83,2	94,2	82,9	23,4	23,5	96,0
9:1	84,0	90,0	91,7	0	0	17,1

Estes resultados mostram que, a melhor proporção entre metanol e a solução de ácido clorídrico 0,5 mol L<sup>-1</sup> do solvente de extração modificado, tanto para diquate como paraquate, é a proporção 6:4, pois pode-se observar que as recuperações estão na faixa de 90-94,5% para diquate e para paraquate de 103,3-134,7%, para a matriz em estudo (feijão-caupi).

### 4.3 Otimização dos parâmetros de extração

#### 4.3.1 Temperatura

No primeiro experimento o parâmetro temperatura foi avaliado levando em consideração a influência do banho de água à 80 °C por 15 min, nos valores de recuperação das amostras em estudo, no maior nível de fortificação (50 µg mg

kg<sup>-1</sup>). Os resultados obtidos neste teste, mostraram que os percentuais de recuperação são maiores aplicando-se calor através do banho de água do que os obtidos sem tratamento de banho de água à 80 °C por 15 min, tanto para diquate como para paraquate (Tabela 11).

Tabela 11 - Valores de recuperação (%) obtidos para diquate e paraquate no nível 50 µg kg<sup>-1</sup> de fortificação, empregando ou não banho de água à 80 °C por 15 min.

Parâmetro em estudo	Recuperação (%)	
	Fortificação: 50 µg kg <sup>-1</sup>	
	Diquate	Paraquate
Sem banho de água à 80 °C por 15 min	64,1	38,7
Com banho de água à 80 °C por 15 min	65,8	43,0

No segundo experimento á temperatura foi avaliada através dos resultados obtidos nas recuperações de diquate e paraquate no nível de fortificação de 50 µg kg<sup>-1</sup> com e sem resfriamento do extrato a temperatura ambiente antes da centrifugação (Tabela 12).

Tabela 12 - Valores de recuperação (%) obtidos para diquate e paraquate no nível 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de fortificação, com e sem resfriamento do extrato à temperatura ambiente antes da centrifugação.

Parâmetro em estudo	Recuperação (%)	
	Fortificação: 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
	Diquate	Paraquate
Sem resfriamento a temperatura ambiente	60,3	41,2
Com resfriamento a temperatura ambiente	72,9	42,2

Estes resultados demonstraram, ainda que o resfriamento à temperatura ambiente não mostrou uma grande influência nos valores de recuperação de diquate e paraquate em comparação com o tratamento sem resfriamento à temperatura ambiente. Porém, o valor de recuperação 72,9% para diquate encontra-se dentro da faixa aceitável de 70 a 120% estabelecida pelo SANCO 2013.

Assim, é importante que as amostras sejam resfriadas antes da centrifugação para que a extração seja a mais eficiente possível.

#### 4.3.2 Filtração

Neste estudo testou-se a influência da filtração nos valores obtidos nas recuperações de diquate e paraquate, nos três níveis de fortificação.

Os resultados da Tabela 13, mostram que sem filtração os percentuais de recuperação, nos três níveis de fortificação, para paraquate estão acima de 100% e para diquate mantiveram-se na faixa de 90%. Aplicando-se o procedimento de filtração, os valores de recuperação de paraquate quando fortificado nos níveis de 20 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , foram menores do que 55%

Tabela 13 - Valores de recuperação (%) obtidos para diquate e paraquate nos três níveis de fortificação em estudo, empregando ou não filtração.

Parâmetro em estudo	Recuperações (%)					
	Diquate			Paraquate		
	10 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	20 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	50 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	10 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	20 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	50 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Sem filtração	94,5	94,1	90,2	133,8	103,3	134,7
Com filtração	96,9	90,8	94,2	76,4	51,9	52,5

Há redução na recuperação de paraquate quando utilizado o procedimento de filtração. Para diquate, os valores médios de recuperação para cada nível de fortificação foi mantido.

Pode-se inferir que, também exista perda dos analitos quando utilizado o procedimento de filtração.

#### 4.4 Análise dos solventes e reagentes

Segundo a análise dos solventes e reagentes (item 3.9), não foi observado nenhum indicio de contaminantes ou interferentes nos mesmos. Esta análise confirma que os solventes e reagentes empregados neste estudo podem ser utilizados sem comprometer a qualidade do método analítico otimizado.

#### 4.5 Validação do Método QuPPE versão 7 modificado

O método modificado foi validado utilizando amostras “branco” de feijão-caupi, em que o diquate e o paraquate foram aplicados para avaliar a exatidão e a precisão

do método otimizado. O método modificado está representado na figura 5. Todas as análises foram realizadas em replicatas igual a 7.

#### 4.5.1 Curva analítica e linearidade

O valor do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) expressa numericamente o percentual da variação total do sinal analítico (y) explicado pela variação da concentração do analito (x). Esse percentual, como qualquer outro, varia de 0 a 100% e o valor de  $r^2$ , sendo a expressão numérica do mesmo, varia de 0 a 1. Idealmente, quanto mais próximo de 100% for o percentual da variação observada para o sinal analítico modificado pela variação da concentração, mais próximo de 1 será o valor de  $r^2$ . Logo, melhor será a qualidade da curva analítica, pois a variação da resposta analítica em função do teor do analito será mais precisa e melhor representada pela equação da reta obtida (WEBER, 2013).

A linearidade do método modificado foi avaliada através das curvas analíticas construídas a partir de soluções analíticas preparadas em extrato de feijão-caupi e em solvente orgânico. A faixa linear (de quantificação analítica), o coeficiente de determinação e a equação das curvas analíticas para diquate e paraquate estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Parâmetros relativos às curvas analíticas, obtidos para diquate e paraquate, a partir de soluções preparadas no solvente orgânico e no extrato da matriz e analisadas por UPLC-MS/MS.

Analitos	Soluções em extrato de feijão-caupi			Soluções em solvente orgânico		
	Faixa Linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$r^2$	Equação da curva	Faixa Linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$r^2$	Equação da curva
Diquate	1,0-100,0	0,9675	$y=20646x+21929$	1,0-100,0	0,9995	$y=32568x+50443$
Paraquate	1,0-100,0	0,9753	$y=88026x+23549$	1,0-100,0	0,9620	$y=58474x+77721$

Como se observa na Tabela 14, quando o diquate e paraquate encontravam-se no extrato da matriz, apresentaram coeficientes de determinação inferior a 0,99.

Apenas o diquate mostrou  $r^2$  de 0,999 quando encontrava-se em solvente orgânico, o que não foi observado para o paraquate, o qual mostrou coeficiente de determinação numericamente menor. Ambos, diquate e paraquate, mostraram o mesmo intervalo linear de concentração para as soluções em extrato de matriz e em solvente orgânico.

#### 4.5.2 Avaliação do efeito matriz do feijão-caupi

A maioria dos métodos de UPLC-MS/MS publicados na literatura apresentam problemas de efeito matriz, embora a minimização deste efeito é importante no estabelecimento de métodos confiáveis. Ignorar este efeito pode afetar a confiabilidade da determinação das concentrações dos analitos e a integridade dos dados gerados (MATUSZEWSKI, 2003; KITTLAUS, 2012).

Na Figura 6, pode-se observar as curvas analíticas obtidas a partir de soluções analíticas preparadas em extrato da matriz e em solvente orgânico, tanto para diquate como para paraquate.

Os resultados obtidos através dos cálculos do efeito matriz nas 7 concentrações em estudo, podem ser observados na Tabela 15.

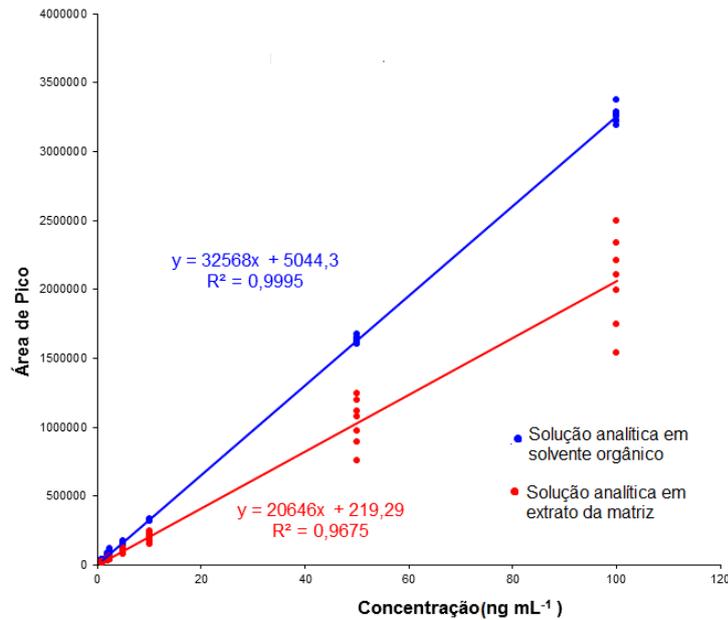
A segunda maneira de avaliação do efeito matriz que foi através da comparação das inclinações das curvas analíticas (*slope*) ( $n=7$ ) obtidas a partir das soluções preparadas em solvente orgânico e daquelas em extrato da matriz, o qual foi de -37 e -85% para diquate e paraquate respectivamente.

Como se observa nos resultados obtidos, o efeito matriz para diquate e paraquate foi negativo, isto é devido ao fato da matriz exercer um efeito de supressão da ionização do analito, diminuindo a intensidade do sinal através da interferência dos componentes da matriz.

Nas Figuras 7 e 8 mostram que a intensidade do sinal das transições de quantificação e de confirmação da solução analítica preparada no extrato de feijão é

um pouco inferior daquela preparada em solvente orgânico, demonstrando que há uma leve supressão do sinal pela presença da matriz. Esse comportamento manteve-se reproduzível na faixa de concentração estudada.

a)



b)

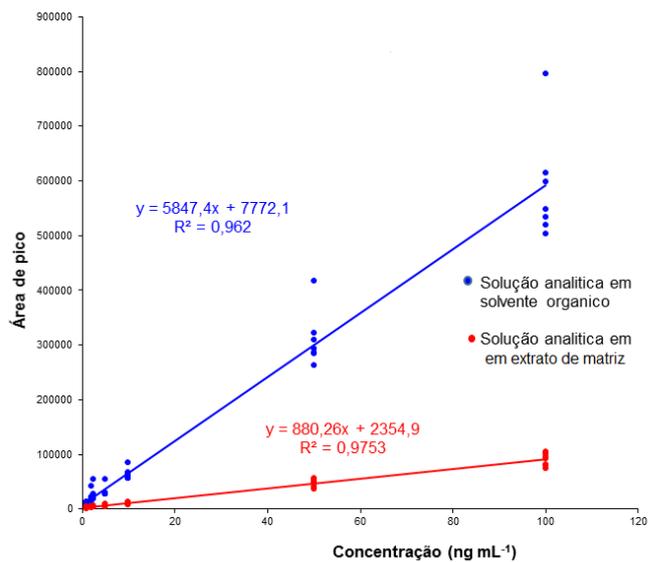
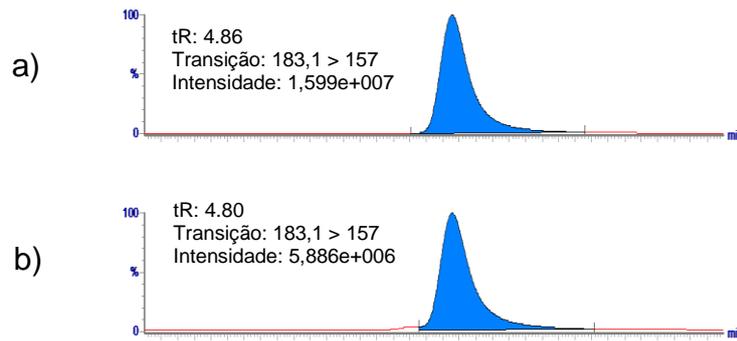


Figura 6 - Curvas analíticas preparadas a partir das soluções analíticas de (a) diquate e (b) paraquate, em solvente orgânico e extrato de matriz. Concentrações de 1 a 100 ng mL<sup>-1</sup>, n=7.

Tabela 15 – Percentual de efeito matriz observado na faixa de concentração estudada nas curvas analíticas, obtidos através de cálculos.

Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	Efeito Matriz (%)	
	Diquate	Paraquate
1	0	0
2	0	0
2,5	-46	-82
5	-33	-78
10	-37	-83
50	-37	-85
100	-37	-85
Media (%)	-27	-59

1



2

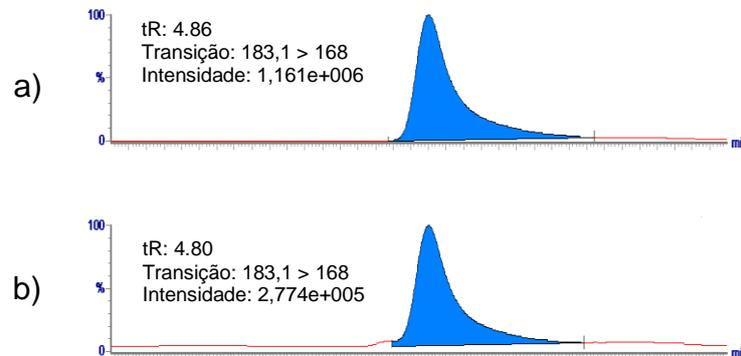


Figura 7 - Cromatogramas obtidos para diquate para (a) transição de quantificação e (b) transição de confirmação, por UPLC-MS/MS, na concentração de 100 ng mL<sup>-1</sup> em (1) solvente orgânico e (2) em extrato de matriz.

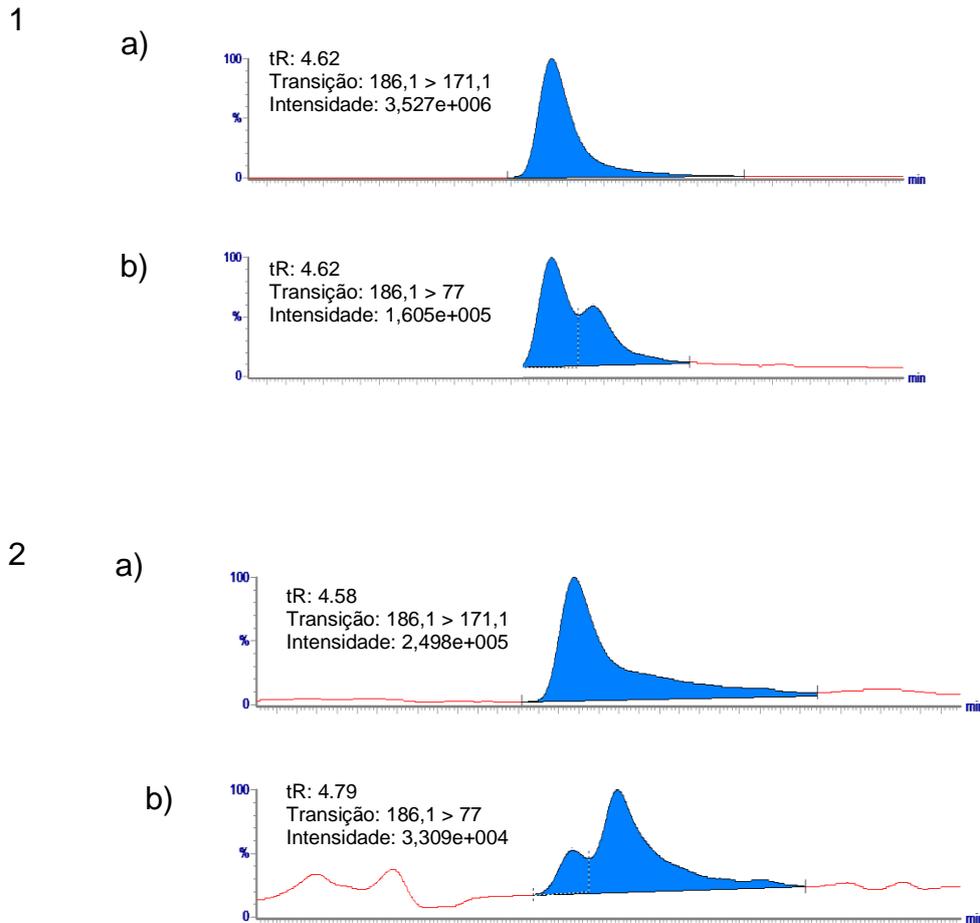


Figura 8 - Cromatogramas obtidos para paraquate para (a) transição de quantificação e (b) transição de confirmação, por UPLC-MS/MS, na concentração de 100 ng mL<sup>-1</sup> em (1) solvente orgânico e (2) em extrato de matriz.

#### 4.5.3 Determinação da estimativa do LOD e LOQ do instrumento e do método

Os valores de LOD e LOQ, do instrumento e do método foram determinados mediante o preparo de soluções analíticas em solvente orgânico e no extrato de feijão-caupi. Dessa maneira avaliou-se a influência do extrato da matriz sobre estes parâmetros, através do cálculo estimado.

Nas tabelas 16 e 17 pode-se observar os resultados de LOD estimado do método (LOD<sub>m</sub>) e instrumento (LOD<sub>i</sub>) e do LOQ estimado do instrumento (LOQ<sub>i</sub>) e método (LOQ<sub>m</sub>) para os composto preparados em solvente orgânico e em matriz, respectivamente.

Tabela 16 – Valor de LOD estimado do método (LODm) e do instrumento (LODi), e LOQ estimado do instrumento (LOQi), e do método (LOQ), para diquate e paraquate, em solvente orgânico.

Analitos	LOD Estimado		LOQ Estimado	
	Instrumento ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Método ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Instrumento ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Método ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Diquate	1,0	3	3,3	10
Paraquate	1,0	3	3,3	10

Tabela 17 – Valor de LOD estimado do método (LODm) e do instrumento (LODi), e LOQ estimado do instrumento (LOQi), e do método (LOQm), para diquate e paraquate, em extrato de matriz.

Analitos	LOD Estimado		LOQ Estimado	
	Instrumento ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Método ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Instrumento ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Método ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Diquate	1,0	3	3,3	10
Paraquate	2,0	6	6,7	20

#### 4.5.4 Ensaio de recuperação

Um dos critérios estabelecidos para validar o método em estudo foi a faixa percentual de recuperação. Neste trabalho, as recuperações devem estar entre 70 e 120%, conforme o SANCO estabelece para os métodos multirresíduos de agrotóxicos em alimentos. Também se estabeleceu, que o valor de RSD não deve superar 20% para o estabelecimento do real LOQm (SANCO, 2013).

Tendo-se em vista os resultados obtidos na tabela 18, o diquate apresentou percentagens de recuperação dentro da faixa aceitável sugerida pelo SANCO, nos três níveis de fortificação, assim como apresentou RSD inferior a 20%. O paraquate

mostrou recuperações aceitáveis nos níveis 10 e 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , mas no nível de 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  uma recuperação de 68% foi obtida. Observou-se que o paraquate mostrou RSD levemente superior a 20% nos níveis 10 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , e no nível 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  apresentou valor de RSD dentro da faixa aceitável.

Tabela 18 – Média dos percentuais de recuperação e RSD (%) obtidos a partir da fortificação do feijão-caupi nos 3 níveis estudados (10, 20 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Analitos	Níveis de fortificação					
	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$		20 $\mu\text{g kg}^{-1}$		50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
Diquate	77	1,9	78	1,1	85	1,4
Paraquate	103	25,4	82	14,4	68	20,2

Considerando-se o fato de que o menor valor de LMR estabelecido pela legislação europeia é de 0,05 e 0,02  $\text{mg kg}^{-1}$  para diquate e paraquate respectivamente, pode-se dizer que o método desenvolvido e validado é adequado para o monitoramento dos dois herbicidas em feijão-caupi, pois para ambos analitos o LOQm obtido foi menor ou igual aos valores estabelecidos pelos órgãos oficiais (Tabela 19) (USDA, 2012; MPI, 2012; ANVISA, 2013).

Tabela 19 – Valores de LMR para diquate e paraquate segundo EU, ANVISA e LOQ do método modificado.

LMR	EU ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	ANVISA ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	LOQ QuPPE V 7 ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	LOQm Método modificado ( $\text{mg kg}^{-1}$ )
Diquate	0,05 ou 10	0,5	0,005	0,01
Paraquate	0,02 ou 0,05	0,05	0,005	0,02

#### 4.6 Método QuPPE versão 7 modificado

Realizou-se uma comparação entre ambos os métodos em termos de recuperação, nos três níveis de fortificação a qual demonstrou que o método modificado é mais eficiente nas recuperações, nos três níveis de fortificação para a matriz em estudo (Tabela 20).

Tabela 20 - Comparação entre os métodos QuPPE original e modificado, com relação ao percentual de recuperação, nos três níveis de fortificação (10, 20 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ )

Método	Recuperação %					
	Diquate			Paraquate		
	10 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	20 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	50 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	10 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	20 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	50 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Método QuPPE versão 7 Original	90	86	91	0	4	7
Método QuPPE versão 7 Modificado	77	78	85	103	82	68

#### 4.7 Aplicação do método otimizado e validado em amostras de feijão

As amostras analisadas são parte de um estudo da EMBRAPA onde buscou-se avaliar a diferença da eficácia de herbicidas desencantes de acordo com seu ingrediente ativo, formulação e período de aplicação no cultivo do feijão-caupi.

Neste estudo, aplicou-se o procedimento otimizado e validado em 15 amostras, as quais foram analisadas em triplicata conforme já citado no item 3.13.

Os resultados encontrados para as análises de feijão-caupi estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 – Concentrações de diquate e paraquate encontrados nas amostras de feijão-caupi que fazem parte do estudo da EMBRAPA.

<b>Amostra</b>	<b>Replicatas</b>	<b>Diquate (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Paraquate (mg kg<sup>-1</sup>)</b>
1	Amostras "branco"	Amostras "branco"	Amostras "branco"
2	1	Nd	0,267
	2	Nd	0,261
	3	Nd	0,240
3	1	Nd	0,020
	2	Nd	0,016
	3	Nd	0,018
4	1	0,313	Nd
	2	0,321	Nd
	3	0,318	Nd
5	1	0,022	Nd
	2	0,021	Nd
	3	0,020	Nd
6	Amostras "branco"	Amostras "branco"	Amostras "branco"
7	1	Nd	<LOQ
	2	Nd	<LOQ
	3	Nd	<LOQ
8	1	Nd	<LOQ
	2	Nd	<LOQ
	3	Nd	<LOQ
9	1	<LOQ	Nd
	2	<LOQ	Nd
	3	<LOQ	Nd
10	1	<LOQ	Nd
	2	<LOQ	Nd
	3	<LOQ	Nd
11	Amostras "branco"	Amostras "branco"	Amostras "branco"
12	1	Nd	0,055
	2	Nd	0,050
	3	Nd	0,049
13	1	Nd	0,023
	2	Nd	0,025
	3	Nd	0,022
14	1	0,017	Nd
	2	0,018	Nd
	3	0,017	Nd

15	1	0,014	Nd
	2	0,014	Nd
	3	0,013	Nd

LOQm Diquate: 0,01 mg kg<sup>-1</sup>

LOQm Paraquate: 0,02 mg kg<sup>-1</sup>

Nas amostras de 2 a 5, observa-se que os agrotóxicos encontrados se concentraram cerca de 15 vezes nas amostras 2 e 4, que representam diquate e paraquate, respectivamente, aplicados com 50% das vagens secas. Estas amostras são provenientes do município de Teresina-PI.

As amostras de Dourados-MS mostraram concentrações abaixo do LOQ do método, tanto para diquate como paraquate.

No último grupo de estudo as amostras de 12 a 15 apresentaram concentrações mais baixas que do primeiro grupo, mas ainda maiores que os LMR. Diquate apresentou concentrações de 0,017 e 0,013 mg kg<sup>-1</sup>, e para o paraquate as concentrações foram maiores 0,051 e 0,024 mg kg<sup>-1</sup>

As diferenças apresentadas entre os níveis residuais de cada local estão relacionadas ao efeito das condições climáticas locais sobre o cultivo. Períodos de estresse hídrico para as plantas ou altas temperaturas podem acelerar o processo de secagem das vagens ou mesmo, reduzir as taxas de absorção dos herbicidas, resultando em acúmulo de resíduos diferenciados.

Em geral, considerando as amostras dos diferentes locais, verifica-se que as aplicações dos herbicidas dessecantes em fase mais avançada de desenvolvimento do feijão-caupi, correspondente às amostras dos tratamentos com 75% das vagens secas (amostras 3, 5, 13 e 15) permitem um menor efeito residual de ambos herbicidas nos grãos coletados, e conseqüentemente, maior segurança para o consumo humano. Isso se justifica pela menor absorção dos herbicidas nas vagens quando secas e menor translocação dos mesmos para os grãos.

Entretanto, o que ocorre costumeiramente no campo são aplicações antecipadas (50% ou menos de vagens secas nas plantas) para acelerar o processo de dessecação da planta e, com isso, antecipar o período de colheita, de forma que os estudos de monitoramento de resíduos, bem como, a otimização e validação de métodos em diferentes matrizes tornam-se fundamentais.

## 5 CONCLUSÕES

A carência de trabalhos publicados a respeito da determinação de agrotóxicos em feijão-caupi, principalmente diquate e paraquate, outorga a este trabalho um mérito importante e evidente, não só porque esta matriz é muito complexa, mas também porque existe a necessidade de desenvolver, otimizar e validar métodos analíticos para matrizes específicas.

A preparação do *slurry* na proporção (1:1,15), facilitou a extração de diquate e paraquate, devido ao fato da amostra apresentar-se numa forma mais homogênea. A otimização do solvente extrator (MeOH/HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup>), mostrou que os valores das recuperações foram melhores nos diferentes níveis de fortificação. Evidenciou-se a importância da temperatura para uma melhor extração dos analitos, assim como evitar-se a filtração para que não haja perdas dos mesmos.

Sem a utilização de uma etapa de filtração do extrato de feijão-caupi, o efeito matriz negativo manteve-se presente, tanto para diquate como paraquate, fazendo-se necessário utilizar o método aplicando-se *matrix-matched calibration* para a quantificação dos agrotóxicos

O método QuPPE versão 7 modificado, mostrou ser eficiente nas análises de diquate e paraquate em feijão-caupi comparado com os resultados obtidos quando estes agrotóxicos foram analisados com o método original.

Os valores de LOD e LOQ foram adequados para a análise de diquate e paraquate em feijão considerando os LMR estabelecidos pela legislação brasileira e européia. Os analitos investigados apresentaram limites de detecção de 3 e 6 µg kg<sup>-1</sup> e de quantificação de 10 e 20 µg kg<sup>-1</sup> para diquate e paraquate, respectivamente.

No método original, não efetuou-se estudos em amostras de algum tipo de feijão, pôr o que, os resultados de LOQ não podem ser comparados.

Na aplicação do método modificado, foi possível determinar as quantidades remanescentes de diquate e paraquate nas amostras de feijão-caupi.

Encontrou-se, a presença do diquate em 4 das 6 amostras analisadas. As amostras 4 (0,318 mg kg<sup>-1</sup>) e 5 (0,021 mg kg<sup>-1</sup>), foram as que apresentaram maior concentração do agrotóxico.

A presença de paraquate foi confirmada em 4 amostras sendo que, a amostra 1, foi a que apresentou o maior valor (0,256 mg kg<sup>-1</sup>) e a amostra 2 a de menor valor (0,018 mg kg<sup>-1</sup>).

As amostras 7, 8, 9 e 10, apresentarão concentrações menores que o LOQ do método, tanto para diquate como para paraquate, sendo constatado que as aplicações mais tardias nas plantas (75% de vagens secas) são mais seguras, em relação à concentração residual dos herbicidas testados nos experimentos de campo.

Conclui-se que as modificações feitas no método em estudo, contribuíram na otimização e validação do método, o qual mostrou-se adequado para sua aplicação na determinação de resíduos de diquate e paraquate, em amostras de feijão-caupi.

## 6 REFERÊNCIAS

AGEITEC. Agencia Embrapa de Informação Tecnológica. **Árvore do Conhecimento-Feijão-Caupi**. 2011. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/fejaoCaupi/arvore/CONTAG01\\_11\\_510200683536.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/fejaoCaupi/arvore/CONTAG01_11_510200683536.html)>. Acesso em: 15 oct. 2012

AGROFIT, **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**, 2003. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>, Acesso em: 03 jan. 2013.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2009. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/pdf/150409\\_para.pdf](http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/pdf/150409_para.pdf) />. Acesso em: 30 nov. 2012.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Lista de Referência de LMRs para as Culturas do PARA 2013**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>>. Acesso em: 21 nov. 2013

ANVISA, Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. 2011**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia>>. Acesso em: 03 jul. 2013.

ANVISA. **Legislação. Visa Legis**. Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE n.475, de 19 de março de 2002. Disponível em: <<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>>. Acesso em: 11 nov. 2012.

ARAÚJO, M. **Safety e Security. Conceitos diferentes. Segurança Alimentar e Qualidade Alimentar**, n.3, p. 62-63, 2007. Disponível em:

<<http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-03/Page%2062-63.pdf>>,

Acesso em: 07 de Novembro 2012

BETSY, A.; RAO, V. S.; POLASA, K. Evolution of approaches in conducting total diet studies. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, n. 10, p. 765-776, 2012.

BOOBIS, A. R. et al. Cumulative risk assessment of pesticide residues in food. **Toxicology Letters, Amsterdam**, v. 180, n. 2, p. 137-150, 2008.

CARVALHO L. B. **HERBICIDAS**. 2013. 1a ed. Santa Catarina. Disponível em: <<http://leonardobcarvalho.files.wordpress.com/2013/02/livroherbicidas.pdf>>. Acesso em: 12 oct. 2013

CASSIANO, N. M.; et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Facts about Paraquat**. 2013. Disponível em: <<http://emergency.cdc.gov/agent/paraquat/basics/facts.asp>>. Acesso em: 20 jul 2013.

CENTRO DE INFORMAÇÕES DO PARAQUAT. **À ciência do paraquat**. Disponível em: <<http://paraquat.com/portugues/banco-de-conhecimentos/qu%C3%ADmica-e-bioqu%C3%ADmica/-a-ci%C3%Aancia-do-paraquat>>. Acesso em: 20 oct. 2012

CENTRO DE INFORMAÇÕES DO PARAQUAT. Disponível em: <<http://paraquat.com/portugues>> Acesso em: 20 oct. 2012

CFIA, Canadian Food Inspection Agency, **Statistics: Consumer Food Safety Complaints**, 2013. Disponível em: <<http://www.inspection.gc.ca/about-the-cfia/newsroom/food-safety-system/consumer-food-safety-complaints/eng/1348767061287/1348767710199>>. Acesso em: 1 nov. 2013

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2012/13, quarto levantamento**. 2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 30 abr. 2013.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. 2012. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>>. Acesso em: 22 jul. 2013.

EMBRAPA. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso**. 2008. Disponível em: <<http://cpac.embrapa.br/download/1264/t>>. Acesso em: 20 set. 2013

EMBRAPA. **Manejo de plantas daninhas**. 2005. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoPrimSegSafraSulMG/manejo\\_pdaninhas.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoPrimSegSafraSulMG/manejo_pdaninhas.htm)>. Acesso em: 23 abr 2013.

EPA, Environmental Protection Agency. **Method 1694: Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/ MS/ MS**. Cincinnati, 2007. 1–77 p.

EPA, U.S. Environmental Protection Agency. **Reregistration Eligibility Decision (RED) Paraquat Dichloride**. 1997. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/0262red.pdf>. Acesso em: 1 dez. 2012.

EURL-SRM, Reference Laboratories for Residues of Pesticides, **Single Residue Methods**. 2013. Disponível em: <[http://www.crl-pesticides.eu/docs/public/tmpl\\_article.asp?CntID=887&LabID=200&Lang=EN](http://www.crl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=887&LabID=200&Lang=EN)>. Acesso em: 27 nov 2013

FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 22 jul. 2013.

FREIRE, F. R. **Feijão-caupi no Brasil: produção melhoramento genético, avanços e desafios**. Embrapa Meio-Norte, 84 p. 2011

FREITAS, F. C. L. et al. Interferência de plantas daninhas na cultura do feijão-caupi. **Planta Daninha**. v. 27, n. 2, p. 241-247, 2009.

FRENICH, A. G. et al. Compensation for matrix effects in gas chromatography–tandem mass spectrometry using a single point standard addition. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4798-4808, 2009.

FROTA, K. M.; SOARES, R. A.; ARÊAS, J. A. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 470-476, 2008

HRAC, Herbicide Resistance Action Committee. **Clasification of Herbicides**. 2013. Disponível em: <<http://www.hracglobal.com/Education/ClassificationofHerbicideSiteofAction.aspx>>. Acesso em: 26 nov. 2013

HSE, U.K. Health and Safety Executive. **Pesticides Residues and Food Safety**, 2012. Disponível em:

<[http://www.pesticides.gov.uk/guidance/industries/pesticides/advisory-groups/PRiF/PRC-Pesticides-Residues-Committee/About%20pesticides%20in%20food/pesticides-residues-and-foodsafety#What\\_are\\_residues\\_and\\_why\\_do\\_they\\_turn\\_up\\_in\\_our\\_food\\_](http://www.pesticides.gov.uk/guidance/industries/pesticides/advisory-groups/PRiF/PRC-Pesticides-Residues-Committee/About%20pesticides%20in%20food/pesticides-residues-and-foodsafety#What_are_residues_and_why_do_they_turn_up_in_our_food_)>. Acesso em: 8 dez. 2012

IBAMA, Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental**. 2010. Disponível em:

<[http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade\\_Ambiental/produtos\\_agrotoxicos\\_comercializados\\_brasil\\_2009.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/produtos_agrotoxicos_comercializados_brasil_2009.pdf)>. Acesso em: 25 nov. 2013

IITA. International Institute of Tropical Agriculture. **Research to nourish Africa**, 2009. Disponível em: <<http://www.iita.org/cowpea>>. Acesso em 23 de março de 2013.

IMOTO, M.N. **Validação de método multiresíduo para pesticidas organohalogenados em maçã por cromatografia gasosa com captura de eletrons (CG/ECD) e cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG/MS)**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) –Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia). **ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS DOQ-CGCRE-008 revisão 04**.

Rio de Jul/2011. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8\\_04.pdf](http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf). Acesso em: 26 dez. 2012.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. D.; DE QUEIROZ, S. C. D. Residues of pesticides in food: a global environmental preoccupation - focussing on apples, **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

KITTLAUS, S. et. al. Assessment of sample cleanup and matrix effects in the pesticide residue analysis of foods using postcolumn infusion in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 8399-8410, 2012.

KOLBERG, D. et al. Development and independent laboratory validation of a simple method for the determination of paraquat and diquat in potato, cereals and pulses. **Anal Bioanal Chem** v. 404, p. 2465–2474, 2012

MAGABI, Pesquisas clínicas e farmacêuticas. **Estudo de caso: como o comportamento do padrão interno pode ajudar no monitoramento da qualidade de uma análise?** Disponível em: <[http://www.acbioanalitica2012.com/work1/SA1\\_IS\\_estudo\\_caso\\_Rafael\\_Barrientos.pdf](http://www.acbioanalitica2012.com/work1/SA1_IS_estudo_caso_Rafael_Barrientos.pdf)>. Acesso em: 12 set. 2013.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2011. **Legislação**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/legislacao>>. Acesso em: 20 maio 2011.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2011. **Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica**. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/RCA/Guia%20de%20valida%C3%A7%C3%A3o%20e%20controle%20de%20qualidade%20analitica.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/RCA/Guia%20de%20valida%C3%A7%C3%A3o%20e%20controle%20de%20qualidade%20analitica.pdf)>. Acesso em: 20 fev 2013

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**. v.75, p. 3019-3030, 2003,

MDIC. Alice Web 2. Disponível em: <<http://aliceweb2.mdic.gov.br/>>. Acesso em: 22 jul. 2013.

MELO, L. C. **Desenvolvimento de Metodologia Eletroanalítica para a Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Amostras de Alimentos e de Águas Naturais**. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Federal do Ceará, 2010

MENK, R. **Desenvolvimento e aplicação das análises toxicológicas no diagnóstico e prognóstico da intoxicação aguda por paraquat e diquat**. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Universidade De São Paulo, 2007

MPI, Ministry for Primary Industry. **Pesticide Maximum Residue Limit (MRL) legislation around the world**. Disponível em:

<<http://www.foodsafety.govt.nz/industry/sectors/plant-products/pesticide-mrnl/worldwide.htm>> Acesso em: 21 nov. 2012.

NATSUE, M. **Validação de método multiresíduo para agrotóxicos organohalogenados em maçã por cromatografia gasosa com captura de elétrons (CG/ECD) e cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG/MS)**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, 2004.

OLSEN, B. A. **Hydrophilic interaction chromatography: a guide for practitioners**. Ed. John Wiley & Sons, Ltd., 2013.

OPAS/OMS, Organização Pan-americana da Saúde, Escritório Regional da Organização Mundial da Saúde. **Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. 1996. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro2.pdf>>. Acesso em: 25 nov 2013

PEENN STATE, Cooperative Extension, College of Agriculture Science. **Introduction to Weeds and Herbicides**. 2013. Disponível em: <<http://pubs.cas.psu.edu/freepubs/pdfs/uc175.pdf>>. Acesso em: 25 nov 2013

PIZZUTTI, I. R. et al. Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4539-4552, 2009.

PIZZUTTI, I. R. **Validação de métodos multiresíduos de extração e desenvolvimento de método de purificação por GPC para análise de resíduos de pesticidas em soja utilizando GC-MS/MS e LC-MS/MS**. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

PRESTES, O. D. *et al.* QuEChERS - Um Método Moderno de Preparo de Amostra para Determinação Multiresíduo de Pesticidas em Alimentos por Métodos Cromatográficos Acoplados à Espectrometria de Massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p.1620-1634, 2009.

REICHERT, B. **Desenvolvimento e validação de método multirresidual para determinação de agrotóxicos em café verde utilizando GC-MS (NCI-SIM)**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

RIBANI, M., et al. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771- 780, 2004.

ROQUETE, M. A. **Desenvolvimento e validação de métodos SPE-LC-MS e MEPS-LC-MS para quantificação de fluoroquinolonas em matrizes aquosas**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2013

SANCO, **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. Document No. SANCO/12571/2013, 2013.

SILVA, A.A; VIVIAN, R.; OLIVEIRA JR., R.S.O. **Herbicidas: comportamento no solo**. In: SILVA, A.A.; SILVA, J.F. Tópicos em manejo de plantas daninhas. Viçosa: Ed. UFV, Cap.5, p. 189- 248. 2007

SILVA, J. F.; ALBERTINO, S. M. F. **Manejo de plantas daninhas**. In: ZILLI, J. E. et al. A cultura do feijão-caupi na Amazônia brasileira. Boa Vista-RR: Embrapa Roraima, p. 223-243, 2009

STOPELLI, I. M. B.; MAGALHAES, C. P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos, **Ciência & Saúde Coletiva**, v.10, 91-100, 2005.

TRUFELLI, H. et al. Na overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30, p. 491-509, 2011.

USDA (FAS). **The USDA (Foreign Agricultural Service) database of US and national MRLs for a wide range of crops, searchable by commodity, pesticide and country**. Disponível em: <<http://www.mrldatabase.com/default.cfm?selectvetdrug=0>>. Acesso em: 21 nov. 2012.

VANNOORT, R. W.; THOMSON, B. M. **New Zealand Total Diet Study. Agricultural compound residues, selected contaminant and nutrient elements.** Wellington: Ministry of Agriculture and Forestry, 2009.

WANDER, A. E. Produção e **Participação Brasileira no Mercado Internacional de Feijão-caupi.** In: III CONAC, Congresso Nacional de Feijão-caupi, 2013. Disponível em: <http://www.conac2012.org/resumos/pdf/206a.pdf>. Acesso em: 6 nov. 2013.

WEBER, R. L. **Método Multiresíduos para determinação de micotoxinas em vinho por UPUPLC-MS/MS.** Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

WIILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, Barking, v. 125, n. 3, p. 803-812, 2011.

WSSA. Weed Science Society of America. **How Herbicides Work.** 2011. Disponível em: <http://www.cottoninc.com/fiber/AgriculturalDisciplines/Weed-Management/training-herbicide-resistant/Lesson-2-How-Herbicides-Work.pdf>. Acesso em: 20 fev 2013.