



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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO
EMPREGANDO GC-MS (NCI-SIM) PARA DETERMINAÇÃO DE
PESTICIDAS EM GRÃOS DE TRIGO E SEUS PRODUTOS
PROCESSADOS**

TESE DE DOUTORADO

Diana Inês Ströher Kolberg

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO
EMPREGANDO GC-MS (NCI-SIM) PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM
GRÃOS DE TRIGO E SEUS PRODUTOS PROCESSADOS**

por

Diana Inês Ströher Kolberg

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

DOUTOR EM QUÍMICA

Orientador: Renato Zanella

Santa Maria – RS, Brasil

2008

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

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO
EMPREGANDO GC-MS (NCI-SIM) PARA DETERMINAÇÃO DE
PESTICIDAS EM GRÃOS DE TRIGO E SEUS PRODUTOS
PROCESSADOS**

elaborada por

Diana Inês Ströher Kolberg

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

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Renato Zanella

(Orientador – Presidente)

Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime (co-orientadora) (UFSM)

Prof^a. Dr^a. Eliana Badiale Furlong (FURG)

Prof. Dr. Marçal José Rodrigues Pires (PUCRS)

Prof^a. Dr^a. Rosana de Cássia Schneider (UNISC)

Santa Maria, 07 de março de 2008.

*À Deus, pelo amor, misericórdia e
fortaleza. A Ti Senhor, toda Honra e
Glória, agora e para sempre.*

*À minha família, especialmente aos meus pais Ademar e Agnez, que desde sempre foram meus maiores exemplos e melhores mestres, sempre me incentivando e acreditando em mim. Aos meus irmãos, Márcio, Denise e Alessandra pela torcida e apoio, e aos meus sobrinhos, Milena, Daniel e Bruno pelo carinho.
Amo vocês.*

Ao meu esposo Maurocy por todo amor e carinho. Pela compreensão e apoio em todos os momentos, abdicando dos seus projetos em favor dos meus. Esta vitória é dedicada a ti, pela luta e esforços dedicados.

Te amo meu querido.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella agradeço a orientação neste estudo, mas principalmente o apoio e incentivo nos meus projetos. Obrigado pela amizade e pela oportunidade de trabalho no LARP.

À Profa. Dra. Martha Bohrer Adaime pela amizade, atenção, por cada palavra de apoio e incentivo, pela co-orientação e participação como banca de qualificação e examinadora da tese.

Aos membros da banca, professores doutores Rosana, Martha, Renato, Marçal e Eliana, pelas sugestões e discussões, que contribuíram para o aperfeiçoamento deste estudo. Ao Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel pelas sugestões no exame de qualificação.

À Profa. Dra. Rosana Schneider, pela amizade. Agradeço a oportunidade de ter atuado como professora no Departamento de Química e Física da UNISC, ao lado dos meus mestres do curso de graduação.

Ao meu colega e amigo Osmar, pelo apoio e ajuda na realização deste trabalho. Obrigado pelo aprendizado e colaboração que me destes. Conte sempre comigo.

Às minhas amigas Daiane, Carine e Michele que contribuíram para a conclusão deste trabalho e pela amizade de vocês. Dai, obrigada por tudo, pelos finais de semana e cada momento que você dispensou em me ajudar.

À todos os membros do LARP, que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Aos amigos que fiz na Universität Hohenheim (Alemanha), especialmente ao Prof. Dr. Schwack por me receber durante o ano de 2006 no seu grupo de trabalho, as minhas amigas Goranka e Ingrid, que sempre me auxiliaram em tudo, mostrando que a amizade permanece mesmo com a distância.

Aos alunos de alemão, que apostaram em aprender uma nova língua, dando-me a oportunidade de divulgar e trocar experiências que tive. Desejo sucesso a vocês.

Aos queridos amigos Edson e Cristine, vocês fizeram algo de muito especial por mim, e por isso jamais esquecerei. Desejo que recebam tudo em dobro e que Deus ilumine sempre o caminho de vocês.

Aos amigos e professores da Unisc, agradeço a todos pelo carinho e profissionalismo durante o período que estive com vocês. Com carinho agradeço a Lourdes, Mari e Ênio, pelos almoços sempre muito agradáveis e divertidos.

À Ellen e Michelangelo, do CVUA Stuttgart, pela oportunidade de realizar o Pós-Doutorado num dos laboratórios considerados referência na Europa. Agradeço a atenção e carinho.

Aos meus pais que me propiciaram a oportunidade de estudar, agradeço pelo incentivo e compreensão, aos meus irmãos que sempre torceram por mim.

Ao meu esposo Maurocy que desde o início sempre me incentivou, me deu forças para vencer cada etapa e fez com que eu confiasse mais em mim. Por todos finais de semana de trabalho e não de descanso, agradeço toda sua compreensão e amor.

RESUMO

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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO EMPREGANDO GC-MS (NCI-SIM) PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM GRÃOS DE TRIGO E SEUS PRODUTOS PROCESSADOS

AUTORA: DIANA INÊS STRÖHER KOLBERG

ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 07 de Março de 2008

Um método multirresíduo para a determinação de 24 pesticidas em trigo, farinha, farelo e pão empregando GC-MS (NCI-SIM) foi desenvolvido e validado neste estudo. O objetivo deste trabalho foi também avaliar o destino de pesticidas durante o processamento do trigo, ou seja, durante o processo de moagem para obtenção da farinha branca e do farelo. Avaliou-se a degradação destes compostos durante o cozimento para obtenção do pão a partir da farinha branca, que foi preparado em panificadora doméstica, com tempo total de preparo de 1 h. O método QuEChERS modificado, desenvolvido originalmente para amostras de frutas e vegetais, foi otimizado para a extração de pesticidas de diferentes classes.

Para a etapa de extração, utilizou-se acetonitrila contendo 1% de ácido acético, acetato de sódio, citrato de sódio e sulfato de magnésio, a etapa de *clean up* por extração em fase sólida dispersiva foi realizada pelo emprego de C18 e sulfato de magnésio. O método foi validado avaliando-se os seguintes parâmetros: linearidade (sete níveis de concentração), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), efeito matriz, bem como precisão e exatidão, avaliando-se o percentual de recuperação empregando-se para isto quatro níveis de fortificação. A faixa linear das curvas analíticas situou-se entre 1,0 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para trigo e pão, 2,0 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para farinha e farelo, ambas apresentando valores de $r^2 > 0,99$. As recuperações foram consideradas satisfatórias, ou seja, entre 70 e 120% com valores de RSD% < 20% para a grande maioria dos compostos. Observou-se que os pesticidas se concentraram mais na parte externa do grão de trigo, apresentando maiores concentrações nas amostras de farelo do que nas amostras de farinha. Durante o cozimento, observou-se a degradação dos compostos na faixa de 50 a 70%. O método mostrou-se adequado para a análise multirresíduo de pesticidas nas matrizes estudadas, e a técnica de GC-MS (NCI-SIM) altamente sensível e seletiva.

Palavras-chave: GC-MS; pesticidas; trigo; farinha; farelo; pão; degradação

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A MULTIRESIDUE METHOD USING GC-MS (NCI-SIM) FOR PESTICIDE DETERMINATION IN GRAINS OF WHEAT AND ITS PROCESSED PRODUCTS

AUTHOR: DIANA INÊS STRÖHER KOLBERG

ADVISOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA

Date and Place: March 07, 2007, Santa Maria

In this study a multiresidue method for the determination of 24 pesticides in wheat, flour, bran and bread using GC-MS (NCI-SIM) mode was developed and validated. The objective of this study was to evaluate the pesticides destination during the processing of wheat as well as during the process of milling for attainment of white flour and the bran. The degradation of these pesticides was evaluated during the bread baking process. QuEChERS method, developed originally for samples of fruits and vegetables, was modified and optimized for the extraction of different pesticides.

For the extraction procedure acetonitrile containing 1% acetic acid, sodium acetate, sodium citrate and magnesium sulphate was used. The clean up using dispersive solid phase extraction was carried out with C18 and magnesium sulphate. The method was validated evaluating the following parameters: linearity (seven different levels of concentration), limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), matrix effect as well as precision and accuracy, evaluating the percentage of recovery using four different spike levels. The linear range used in the analytical curves was from 1.0 to 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ for wheat and bread and 2.0 to 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ for flour and bran both with values of $r^2 > 0.99$. Recoveries presenting values between 70 and 120% with RSD <20% were considered satisfactory for most compounds. It was observed that there was a greater concentration of pesticides in the external part of the wheat grain, and that the sample of bran presented higher concentrations than those of flour. During the baking, degradation of compounds was observed in the range of 50 to 70%. The method proved to be adequate for the multiresidue analysis of pesticides in the matrices studied and the GC-MS (NCI-SIM) technique proved to be sensitive and highly selective.

Keywords: GC-MS; pesticides; wheat; flour; bran; bread; degradation

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Grão de trigo.....	4
FIGURA 2 – Distribuição da produção brasileira de trigo.....	12
FIGURA 3 – Área e produção de trigo no Brasil entre 1961 e 2006.....	15
FIGURA 4 – Cromatograma total obtido por GC-MS no modo de ionização química negativa (A) e positiva (B).....	72
FIGURA 5 – Efeito das diferentes voltagens da eletromultiplicadora de elétrons, A: aplicação de 1000 V; B: 1200 V e C: 1400 V no cromatograma total de uma solução de concentração 5 µg L ⁻¹ em acetonitrila.....	73
FIGURA 6 – Cromatograma obtido por GC-MS (NCI) modo <i>full scan</i> , A: modo <i>full scan</i> ; B: seleção do íon 237 para aldrin; C: seleção do íon 154 para parationa-etílica em extrato da matriz trigo.....	76
FIGURA 7 – Cromatograma total obtido por GC-MS (NCI) modo SIM, para uma solução no extrato da matriz trigo na concentração de 200 µg L ⁻¹	77
FIGURA 8 – Representação esquemática do método de extração e <i>clean up</i>	84
FIGURA 9 – Cromatograma total obtido por GC-MS modo CI negativo para análise dos solventes e reagentes.....	85
FIGURA 10 – Cromatograma total obtido por GC-MS (NCI) modo SIM, para os extratos “branco” do trigo (A); farinha (B); farelo (C) e pão (D).....	87
FIGURA 11 – Percentual de efeito matriz para o extrato do trigo.....	89
FIGURA 12 – Percentual de efeito matriz para o extrato da farinha.....	89

FIGURA 13 – Percentual de efeito matriz para o extrato do farelo.....	90
FIGURA 14 – Percentual de efeito matriz para o extrato do pão.....	90
FIGURA 15 – Cromatograma total obtido por GC-MS (NCI) modo SIM, para o padrão preparado na matriz trigo de concentração $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (A) e o nível de fortificação $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (B).....	109

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Composição química do trigo.....	6
TABELA 2 – Valor nutritivo do trigo em alguns derivados, por 100 gramas do produto.....	7
TABELA 3 – Produção (em mil ton) de trigo no mundo, nos principais países, e no Brasil entre 2004 a 2006.....	10
TABELA 4 – Área e Produção de trigo nos países do Mercosul entre 2004 a 2006.....	11
TABELA 5 – Área e Produção de trigo no Brasil, Região Sul e no Estado do Rio Grande do Sul.....	11
TABELA 6 – Pesticidas selecionados e Limites Máximos de Resíduos, em mg kg ⁻¹ em trigo, farinha e farelo.....	26
TABELA 7 – Pesticidas selecionados e analisados por GC-MS no modo SIM..	57
TABELA 8 – Ensaio realizados para a otimização da etapa de extração.....	64
TABELA 9 – Amostras de trigo, farinha, farelo e pão.....	68
TABELA 10 – Pesticidas analisados por GC-MS, com seus respectivos t _R , íons monitorados, segmento e <i>time window</i> (min).....	75
TABELA 11 – Recuperações médias (%) obtidas para os seis ensaios de extração.....	79
TABELA 12 – Recuperações médias (%) obtidas para o nível de concentração 10 e 20 µg kg ⁻¹ no trigo, empregando ensaio 2 e 6.....	81

TABELA 13 – Recuperações médias (%) obtidas com diferentes quantidades de C18 na etapa de <i>clean up</i>	82
TABELA 14 – Parâmetros relativos às curvas analíticas, obtidos para os pesticidas no extrato do trigo e analisados por GC-MS.....	92
TABELA 15 – Parâmetros relativos às curvas analíticas, obtidos para os pesticidas no extrato da farinha e analisados por GC-MS.....	93
TABELA 16 – Parâmetros relativos às curvas analíticas, obtidos para os pesticidas no extrato do farelo e analisados por GC-MS.....	94
TABELA 17 – Parâmetros relativos às curvas analíticas, obtidos para os pesticidas no extrato do pão e analisados por GC-MS.....	95
TABELA 18 – Valores calculados para LOD e LOQ, do instrumento e do método, nos extratos do trigo e farinha para os pesticidas analisados por GC-MS.....	97
TABELA 19 – Valores calculados para LOD e LOQ, do instrumento e do método, nos extratos do farelo e do pão para os pesticidas analisados por GC-MS.....	98
TABELA 20 – Médias dos percentuais de recuperação e RSD% para a repetitividade, obtidas para a extração do trigo.....	100
TABELA 21 – Médias dos percentuais de recuperação e RSD% para a precisão intermediária, obtidas para a extração do trigo.....	101
TABELA 22 – Médias dos percentuais de recuperação e RSD% para a repetitividade, obtidas para a extração da farinha.....	102
TABELA 23 – Médias dos percentuais de recuperação e RSD% para a precisão intermediária, obtidas para a extração da farinha.....	103
TABELA 24 – Médias dos percentuais de recuperação e RSD% para a repetitividade, obtidas para a extração do farelo.....	104
TABELA 25 – Médias dos percentuais de recuperação e RSD% para a precisão intermediária, obtidas para a extração do farelo.....	105

TABELA 26 – Médias dos percentuais de recuperação e RSD% para a repetitividade, obtidas para a extração do pão.....	106
TABELA 27 – Médias dos percentuais de recuperação e RSD% para a precisão intermediária, obtidas para a extração do pão.....	107
TABELA 28 – Concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de resíduos de pesticidas encontrados na amostra 1.....	110
TABELA 29 – Concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de resíduos de pesticidas encontrados na amostra 2.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AOAC – do inglês, *Association of Official Analytical Chemists*
- ASE – Extração por Solvente Acelerado, do inglês *Accelerated Solvent Extraction*
- C₁₈ – Octadecilsilano
- CCPR – Comitê do Codex Alimentarius sobre resíduos de pesticidas, do inglês
Codex Alimentarius Committee on Pesticide Residues
- CI – Ionização Química, do inglês *Chemical Ionization*
- DDT – dicloro-difenil-triclorometano
- DMI – Introdução de amostras complexas, do inglês *Difficult Matrix Injection*
- DSI – Introdução direta da amostra, do inglês *Direct Sample Injection*
- D-SPE – Extração em fase sólida dispersiva do inglês, *Dispersive Solid Phase Extraction*
- ECD – Detector por Captura de Elétrons, do inglês *Electron Capture Detector*
- EI – Ionização por Impacto de Elétrons, do inglês *Electron Impact Ionization*
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EPA – Agência de Proteção Ambiental, do inglês *Environmental Protection Agency*
- FAO – Organização para Agricultura e Alimentação, do inglês *Food and Agriculture Organization*
- FDA – do inglês, *Food and Drug Administration*
- FPD – Detector fotométrico de chama, do inglês *Flame Photometric Detector*
- GAP – Boas práticas na agricultura, do inglês *Good Agricultural Practice*
- GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*
- GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, do inglês
Gas Chromatography Mass Spectrometry

- GPC – Cromatografia por Permeação em Gel, do inglês *Gel Permeation Chromatography*
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia
- ITD – Detector por Aprisionamento de Íons , do inglês *Ion Trap Detector*
- LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*
- LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*)
- LMR – Limite Máximo de Resíduo
- LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*
- LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*
- LVI – Injeção de grandes volumes, do inglês *Large Volume Injection*
- MAE – Extração Assistida por Microondas, do inglês *Microwave-Assisted Extraction*
- MRM – Monitoramento de reações múltiplas, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*
- MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*
- MSPD – Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*
- m/z – razão massa/carga
- NCI – Ionização Química Negativa, do inglês *Negative Chemical Ionization*
- NPD – Detector de Nitrogênio e Fósforo , do inglês *Nitrogen and Phosphorus Detector*
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
- PCI - Ionização Química Positiva, do inglês *Positive Chemical Ionization*
- PIB – Produto Interno Bruto
- PROAGRO – Programa de Garantia da Atividade Agropecuária
- PSA – Amina primária secundária, do inglês *Primary Secondary Amine*
- PTV – Vaporização com temperatura programada, do inglês *Programmed Temperature Vaporisation*
- QuEChERS – Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*
- RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*
- SAX – Resina de troca aniônica forte, do inglês *Strong Anionic Exchange*
- SBSE – Extração Sortiva por Barra Magnética, do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*

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

SIM – Monitoramento de Íon Seleccionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*

SINDAG – Sindicato Nacional da Indústria para Defesa Agrícola

SINTOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

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

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

TOF – Detector por tempo de vôo, do inglês *Time of Flight*

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Fórmula estrutural dos compostos em estudo

ANEXO B – Cálculos do fator de diluição

ANEXO C – Fluxograma da otimização do método de extração

ANEXO D – Constantes Kow e pressão de vapor para os pesticidas encontrados no
pão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Origem e Importância do Trigo.....	3
2.2 Processamento do trigo.....	4
2.3 Valor nutritivo do trigo.....	6
2.4 O trigo na alimentação de animais.....	8
2.5 Produção de trigo.....	9
2.5.1 O trigo no Brasil.....	12
2.6 Armazenamento do trigo.....	16
2.7 O uso de pesticidas.....	17
2.7.1 Contaminação de alimentos por pesticidas.....	20
2.7.2 Degradação de pesticidas em alimentos processados.....	22
2.7.3 Limites Máximos de Resíduos.....	23
2.8 Análise de Resíduos de Pesticidas em Alimentos.....	28
2.8.1 Preparo da amostra para análise multirresíduo.....	29
2.8.2 Determinação Cromatográfica na Análise Multirresíduo.....	40
2.9 Efeito Matriz.....	46
2.10 Validação de Métodos Analíticos.....	49
2.10.1 Curva analítica.....	50
2.10.2 Exatidão.....	51
2.10.3 Precisão.....	52
2.10.4 Limite de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ).....	54
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
3.1 Instrumentação.....	55

3.2 Gases	56
3.3 Materiais	56
3.4 Solventes e Reagentes	56
3.5 Pesticidas Seleccionados	57
3.6 Seleção do Padrão Interno e de Substituição	58
3.7 Preparo das Soluções Analíticas	58
3.8 Parâmetros de otimização do sistema GC-MS	59
3.8.1 Condições Cromatográficas.....	59
3.8.2 Avaliação do modo de ionização química negativa e positiva.....	59
3.8.3 Avaliação da eletromultiplicadora de elétrons.....	60
3.8.4 Seleção dos íons.....	60
3.9 Amostras para a etapa de validação	60
3.10 Otimização do método QuEChERS modificado para análise multirresíduo em grãos de trigo	61
3.10.1 Adição de água.....	61
3.10.2 Otimização do método de extração.....	61
3.10.2.1 Ensaio 1.....	61
3.10.2.2 Ensaio 2.....	62
3.10.2.3 Ensaio 3.....	63
3.10.2.4 Ensaio 4.....	63
3.10.2.5 Ensaio 5.....	63
3.10.2.6 Ensaio 6.....	63
3.10.3 Otimização da etapa de <i>clean up</i>	64
3.11 Análise dos solventes e reagentes pelo método de extração QuEChERS modificado	64
3.12 Avaliação do efeito matriz para os extratos de trigo, farinha, farelo e pão nas análises por GC-MS	65
3.13 Validação do método QuEChERS modificado para análise multirresíduo em trigo, farinha, farelo e pão	65
3.13.1 Determinação da linearidade.....	66
3.13.2 Determinação da estimativa do LOD e LOQ, do instrumento e do método.....	66

3.13.3 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária).....	67
3.14 Aplicação do procedimento em amostras reais.....	68
3.14.1 Preparo das amostras de pão.....	68
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4.1 Condições do sistema GC-MS.....	70
4.1.1 Avaliação do modo de ionização química.....	71
4.1.2 Avaliação da voltagem da eletromultiplicadora de elétrons.....	71
4.1.3 Seleção dos íons.....	74
4.2 Seleção do padrão interno e de substituição.....	78
4.3 Otimização do método de extração QuEChERS modificado.....	78
4.3.1 Adição de água.....	78
4.3.2 Avaliação dos procedimentos de extração.....	78
4.3.3 Avaliação da etapa de <i>clean up</i>	82
4.3.4 Análise dos solventes e reagentes pelo método de extração QuEChERS modificado.....	85
4.3.5 Avaliação das amostras para a etapa de validação.....	86
4.4 Avaliação do efeito matriz para os extratos de trigo, farinha farelo e pão nas análises por GC-MS.....	88
4.5 Validação do método QuEChERS modificado para análise multirresíduo em trigo, farinha, farelo e pão.....	91
4.5.1 Determinação da linearidade.....	91
4.5.2 Determinação da estimativa do LOD e LOQ.....	96
4.5.3 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária).....	99
4.5.4 Aplicação do procedimento em amostras reais.....	110
5 CONCLUSÕES.....	113
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	115
7 REFERÊNCIAS.....	116
ANEXOS.....	125

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, com uma extensão territorial de 8,5 milhões de km² tem um grande potencial para a agricultura. Atualmente, o Brasil produz 500 kg de grãos por habitante, devido à evolução extraordinária na agricultura e principalmente na produção de grãos dos últimos anos. No entanto, o importante não é apenas produzir, mas também é necessário garantir a qualidade dos alimentos produzidos, com custos reduzidos e com perdas e impacto ambiental minimizados. O controle químico de doenças é, em muitos casos, a única medida eficiente e economicamente viável para garantir a alta produtividade e qualidade de produção (EMBRAPA, 2005).

O termo pesticida é utilizado para uma grande variedade de produtos químicos, sintéticos ou naturais, que servem para controlar insetos, fungos, bactérias, ervas daninhas, roedores e outras pestes. Os pesticidas têm fornecido muitos benefícios à agricultura, pois as pestes e doenças danificam até um terço das colheitas no mundo todo o que resultou na consolidação do uso de pesticidas nas diversas culturas agrícolas nos últimos anos, gerando muitos problemas ambientais. Em consequência o risco de exposição indireta da população à ação dos pesticidas que podem estar presentes nos alimentos vem sendo demonstrado com frequência (CHU *et al.*, 2005).

Estima-se que 20% da produção nacional de grãos é perdida anualmente por causa de insetos, pragas, doenças e ervas daninhas, que comprometem a colheita e o armazenamento (CARVALHO, 2000). Os pesticidas utilizados em plantações de grãos, quando aplicados indiscriminadamente e sem controle, podem causar problemas de ordem ecológica e de saúde pública, e por este motivo, são considerados contaminantes dos alimentos e degradadores do meio ambiente (HERMES, 1997). Os alimentos produzidos sem a observância das Boas Práticas Agrícolas (GAP, do inglês *Good Agricultural Practice*), apresentam resíduos dos pesticidas utilizados, seja pela quantidade incorreta aplicada, pela inobservância do produtor ou pelo desrespeito aos prazos de carência entre a aplicação e a colheita (SOUZA & ALCANTARA, 2007).

O trigo é o cereal mais cultivado no mundo, e o cultivo no Brasil iniciou em 1534, sendo a região sul responsável por 90% da produção nacional, devido as

melhores condições de clima para o desenvolvimento deste cereal (CARVALHO, 2000). A investigação de resíduos de pesticidas na cultura do trigo é de extrema importância, uma vez que grandes quantidades de pesticidas são empregadas nesta cultura, durante o cultivo e no armazenamento (SILVA *et al.*, 1996).

O emprego de uma grande variedade de pesticidas, em áreas bastante extensas, torna fundamental a determinação destes resíduos, através de técnicas e métodos altamente sensíveis, capazes de identificar e quantificar a concentração destes constituintes nas amostras de trigo, especialmente considerando que para evitar perda da matéria prima no campo tem sido descumpridas as normas, com aplicação de quantidades superiores às recomendadas e, aplicação de produtos não permitidos para a referida cultura.

Atualmente, têm aumentado o interesse em obter-se dados sobre o destino dos pesticidas durante o processamento, visando, uma estimativa real dos níveis de concentração de pesticidas que entram na dieta da população. Aspectos de segurança e qualidade alimentar são assuntos de debate e causam o interesse de vários segmentos da sociedade. Para subsidiar a tomada de medidas efetivas, investigações científicas devem ser exigidas para um melhor controle dos resíduos em alimentos comercialmente disponíveis para o consumo (SHARMA *et al.*, 2005).

A dificuldade de se identificar diferentes classes de pesticidas, e quantificá-los em baixas concentrações (em nível de partes por milhão e até por bilhão), torna-se necessário a utilização de técnicas altamente sofisticadas, como a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*), devido as suas excelentes características de eficiência de separação cromatográfica, sensibilidade, bem como poder de confirmação.

A problemática, que envolve o intenso emprego de pesticidas na agricultura norteou o objetivo deste estudo que foi otimizar e validar um método multirresíduo, utilizando o método QuEChERS modificado e GC-MS para determinação de pesticidas em grãos de trigo e investigar o destino dos pesticidas durante o processamento do trigo para a produção de farinha branca e farelo de trigo, e avaliar a diminuição da concentração durante o preparo do pão a partir da farinha branca.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Origem e Importância do Trigo

O trigo é um dos mais nobres alimentos e responde atualmente por cerca de 30% da produção mundial de grãos. Por ser um cereal básico para a civilização, seu cultivo segue paralelo à história da antiguidade e da modernidade, e é utilizado principalmente como base de farinhas para fabricar um alimento essencial, o pão (EMBRAPA, 2007).

Foram encontrados grãos de trigo nos jazigos de múmias do Egito, nas ruínas das habitações lacustres da Suíça e nos tijolos da pirâmide de Dashur, cuja construção data mais de três mil anos antes de Cristo (BRUM & MÜLLER, 2006). Foi sem dúvida, uma das primeiras espécies a ser cultivada. Sua importância está associada ao desenvolvimento da civilização e da agricultura moderna, sendo considerado um alimento sagrado por muitos povos. Os egípcios atribuíram o seu aparecimento à deusa Isis, os fenícios à Dagon, os hindus à Brama, os árabes à São Miguel e os cristãos à Deus (SILVA *et al.*, 1996).

À medida que o trigo se modificava geneticamente, tornando-se mais produtivo e adaptado às novas condições ecológicas, seu cultivo permitiu que a espécie humana finalmente abandonasse milhares de anos de caça e coleta, fixando-se em povoados e construindo cidades. A espécie mais cultivada em quase todo o planeta é o do gênero, *Triticum aestivum* L., trigo comum utilizado na panificação, produção de bolos, biscoitos, massas e produtos de confeitaria. O gênero *Triticum durum* é especialmente destinado ao preparo de massas alimentícias, macarrão, lasanhas, rondeles, etc. Atualmente são conhecidas mais de 20 mil variedades diferentes de trigo (BRUM & MÜLLER, 2006). Por isso, possui entre todas as culturas alimentícias, a maior área plantada, representando em torno de 20% de toda área cultivada no mundo. A comercialização internacional do trigo é maior que a soma de todos os outros grãos alimentícios, o que aumenta mais ainda a sua importância econômica (SILVA *et al.*, 1996).

O trigo fornece cerca de 20% das calorias provenientes dos alimentos consumidos pelo homem. Sua grande vantagem é possuir um tipo de proteína

com certa elasticidade, chamada de glúten, não encontrada em outros grãos. O glúten representa um conjunto de proteínas insolúveis, responsável pelo crescimento da massa, quando a farinha de trigo é misturada à água. Ele retém o gás carbônico produzido durante o processo de fermentação, fazendo com que o pão cresça, originando um produto leve, de fácil elaboração, nutritivo e saboroso. Em forma de pão e de outros derivados, o trigo constitui um dos alimentos mais importantes da cesta básica brasileira e um componente essencial da alimentação humana (SILVA *et al.*, 1996).

2.2 Processamento do trigo

O grão de trigo, como mostrado na Figura 1 possui três partes importantes: o endosperma, a casca e o germe, que são objeto de separação durante o processo de moagem.

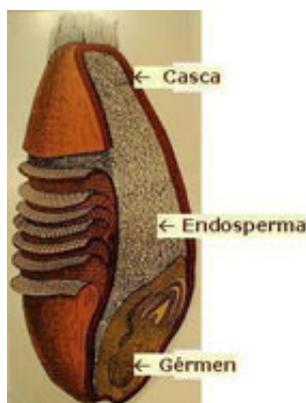


Figura 1. Grão de trigo

Fonte: www.viaintegral.com

Endosperma: a parte maior, constitui aproximadamente 83% do peso do grão, e é a mais importante, por ser a fonte de farinha branca. É rico em amido e possui, aproximadamente, três quartos de proteína do grão, carboidratos e ferro, como também algumas vitaminas do complexo “B”, tais como riboflavina, niacina e a tiamina (SILVA *et al.*, 1996).

Germe: parte que germina quando plantado, é o embrião da semente, e corresponde por 2,5% do peso do grão. O germe é usualmente separado, devido à quantidade de gordura natural que interfere na qualidade de conservação da farinha de trigo refinada especial. Dos nutrientes no grão de trigo inteiro, o germe contém mínimas quantidades de proteínas, mas grande parte das vitaminas e minerais. O germe de trigo pode ser obtido separadamente ou estar presente na farinha de trigo integral. A qualidade da proteína do germe de trigo é comparada à do leite. É rico em vitamina "E" e tem alto poder energético (SILVA *et al.*, 1996).

Casca: cuja função é proteger o endosperma e o germe, corresponde aproximadamente a 14,5% do peso do grão. Contém uma pequena quantidade de proteínas, grande quantidade de vitaminas do complexo B, traços de minerais, e material celulósico, também chamado de fibra alimentar. É encontrada separadamente, como farelo de trigo (SILVA *et al.*, 1996).

O processo de moagem se divide em três etapas principais:

Recepção e armazenamento do grão: o trigo tem que ser armazenado em perfeitas condições de higiene, temperatura e umidade para poder garantir um melhor produto final (ABITRIGO, 2005).

Limpeza e Acondicionamento do Trigo: nesta etapa é necessário eliminar todas as impurezas como sementes estranhas, terra, areia, pedras e outros. A presença de impurezas causa danos aos equipamentos e também desqualifica o produto final. Após a etapa de limpeza, o trigo é acondicionado no mínimo por 18 horas, esse tempo varia de acordo com a dureza e umidade do grão. Esta etapa de acondicionamento tem como objetivo facilitar a separação do farelo com o endosperma durante a moagem (ABITRIGO, 2005).

Moagem do Trigo e Produção de seus derivados: o objetivo do processo de moagem é separar, na forma mais pura, o endosperma para que este possa ser moído e convertido em farinhas sem a presença do germe ou do farelo, os quais são comercializados separadamente. Para isto, o grão primeiramente passa por um processo de trituração onde serão extraídas as semolinas (endosperma). Em seguida, estas são classificadas no plansifter em partículas grossas e finas. Estas partículas passarão por cilindros redutores, novamente pelo plansifter, sassores e outros equipamentos que definirão os produtos derivados do trigo (ABITRIGO, 2005).

O principal produto derivado de trigo é a farinha, cerca de 75 %, seguida do farelo, cerca de 25% e uma pequena parte é transformada em germe. Existem vários tipos de farinha de trigo, estas são especificadas de acordo com o produto que se deseja produzir (ABITRIGO, 2005).

A produção industrial de farinha de trigo é utilizada da seguinte forma:

- ✓ 15% para produção de massas alimentícias;
- ✓ 20% para produção de farinha de utilização doméstica com ou sem fermento e misturas para bolo;
- ✓ 5% para pré-misturas especiais para panificação;
- ✓ 47% como farinhas para mistura e pré-misturas para panificação;
- ✓ 11% para produção de biscoitos;
- ✓ 2% para outras utilizações (rações animais, fármacos, cola e outros) (ROSSI *et al.*, 2004).

2.3 Valor nutritivo do trigo

Como se pode observar na Tabela 1, o grão de trigo é uma excelente fonte de energia (carboidratos), proteínas e fibras.

Tabela 1. Composição química do trigo

Componente	Grão (%)	Germe (%)	Farinha (%)
Proteína	13,3	26,6	11,8
Gordura	2,0	10,9	1,2
Minerais	1,7	4,3	0,46
Fibra	2,3	2,3	0,40
Carboidratos	68,7	44,2	74,1
Água	12,0	11,5	12,0

Fonte: Silva *et al.*, 1996

O trigo é também, uma importante fonte de ferro e vitaminas B1 e B2. Na Tabela 2, são mostrados os valores alimentícios de alguns produtos derivados do trigo, onde se observa que o pão integral é três vezes mais rico em ferro e duas vezes mais rico em outros minerais e vitaminas, que o pão francês, feito com farinha branca. Na farinha integral, há o aproveitamento de todas as partes do grão (endosperma, casca e germe), enquanto na farinha branca, só o endosperma é aproveitado (SILVA *et al.*, 1996).

Tabela 2. Valor nutritivo do trigo em alguns derivados por 100 gramas do produto

Alimento	Calorias (kcal kg ⁻¹)	Proteína (g)	Cálcio (mg)	Fósforo (mg)	Ferro (mg)	Vitaminas (mg)	
						B1	B2
Grão	332	12,7	60	312	7,6	0,35	0,12
Pão integral	286	9,4	49	209	3,6	0,19	0,13
Pão francês	268	9,3	22	107	1,2	0,08	0,06
Macarrão	111	3,4	8	50	0,4	0,01	0,01

Fonte: Franco, 1992

Devido às qualidades nutritivas do trigo e sua versatilidade, alguns panificadores chegam a oferecer mais de 200 produtos diferentes, elaborados à base de trigo. Os alimentos à base de trigo (pães, bolos, massas, biscoitos e outros) são recomendados pelos profissionais das áreas de saúde e nutrição humana, estando presentes em quase todas as refeições diárias (SILVA *et al.*, 1996).

O trigo é uma das fontes mais abundantes em nutrientes para a saúde e a sobrevivência do homem. Os produtos à base de trigo são de fácil elaboração, possuem alto valor alimentício e baixo custo. Por isso, estão presentes em todas as refeições diárias e podem contribuir para a boa nutrição e saúde do homem (SILVA *et al.*, 1996).

A industrialização exagerada dos alimentos tem reduzido o teor de fibras da dieta humana, favorecendo o surgimento de algumas doenças como prisão de ventre, câncer de cólon e do reto. As chances de desenvolver essas doenças

podem ser diminuídas com o uso de uma alimentação integral e rica em fibras. O farelo de trigo, subproduto da farinha branca, rico em fibras e usado na fabricação de rações animais, pode ser um remédio barato e eficiente contra essas doenças. A ingestão de uma ou até cinco colheres de sopa de farelo de trigo, misturado ao cardápio diário, em mingaus, sucos e outros tipos de alimentos, é suficiente para o bom funcionamento do aparelho digestivo, protegendo de enfermidades. Na impossibilidade de aquisição do farelo de trigo, o uso de produtos feitos à base de trigo integral apresenta efeitos semelhantes ao farelo (SILVA *et al.*, 1996).

Os alimentos derivados do trigo são boas fontes de carboidratos, proteínas, vitamina do complexo B, ferro, zinco, selênio, magnésio e traços de outros elementos, além de fibra alimentar (ABITRIGO, 2005).

O germe de trigo é um alimento ideal para ser usado nos casos de desnutrição e na recuperação do desgaste físico dos atletas, podendo ser usado diariamente na alimentação. É muito utilizado na indústria farmacêutica, para a extração de óleos, e de vitaminas. O farelo de trigo pode ser usado também como um complemento mineral e vitamínico (SILVA *et al.*, 1996).

2.4 O trigo na alimentação de animais

O trigo moído pode substituir o milho em até 100% na alimentação das aves, suínos e bovinos. Além de ser uma excelente fonte de energia, é considerado uma razoável fonte de proteína (SILVA *et al.*, 1996). O trigo não tem sido usado sistematicamente na alimentação de animais, por ser considerado um cereal "nobre" na alimentação humana. No entanto, o trigo participa do mercado de alimentação animal com dois produtos: o farelo de trigo e o triguilho (ROSSI *et al.*, 2004).

O farelo de trigo é um subproduto da moagem do trigo que os moinhos vendem principalmente através de intermediários. A utilização do farelo de trigo na ração animal depende dos preços da matéria-prima a ser substituída. (ROSSI *et al.*, 2004).

O triguilho é o grão de trigo malformado, fruto de intempérie climática ou da baixa qualidade da semente plantada. A utilização do triguilho ocorre diretamente

na propriedade rural, via de regra, é utilizada pela pecuária, principalmente pelo gado leiteiro e pode ser utilizado em níveis de até 30% nas rações de suínos e aves (ROSSI *et al.*, 2004).

2.5 Produção de trigo

O agronegócio brasileiro obteve renda de aproximadamente R\$ 100 bilhões em 2003, provenientes de uma safra de mais de 120 milhões de toneladas de grãos. Sabe-se que o Brasil detém quase 20% da área agricultável do mundo, e utiliza apenas 10 a 20% de seu potencial. O agronegócio responde por 30% do PIB e 35% do emprego, as estatísticas mostram que para cada emprego gerado no campo, há a criação de mais quatro postos de trabalhos na área urbana. No Brasil, a exploração da cultura do trigo ocorre predominantemente em pequenas e médias propriedades rurais, cerca de 80% da produção brasileira é proveniente de propriedades com área inferior a 500 hectares (ROSSI *et al.*, 2004; ALMEIDA, 2003).

Torna-se fundamental diminuir as perdas de alimentos na colheita, armazenamento, estocagem, transporte e comercialização. A perda de grãos por deficiência de estocagem e transportes no Brasil ultrapassa 10 milhões de toneladas, isso em termos financeiros significa aproximadamente 1 bilhão de dólares perdidos por ano. No Brasil, apenas 5% das propriedades rurais possuem silos para armazenar suas produções, na Argentina o índice é de 25% e nos Estados Unidos chega a 65%. As propriedades que investem em armazenamento, evitam maiores custos de produção para seu produto, e também podem escolher o melhor momento para a venda, além de diminuir as perdas (ALMEIDA, 2003).

A área plantada com trigo no mundo, nos últimos 40 anos, evoluiu relativamente pouco. Em 1961 a mesma correspondia a 204,2 milhões de hectares. Desse total, a China ocupava a maior superfície semeada, seguida dos Estados Unidos e da União Européia. Na América do Sul, a Argentina liderava a produção, enquanto que o Brasil plantava apenas 0,5% da área mundial (BRUM & MÜLLER, 2006). A seguir, serão apresentadas considerações que envolvem o

trigo nos âmbitos mundial, no Brasil e no RS. A Tabela 3 mostra os principais produtores mundiais de trigo.

Tabela 3. Produção (em mil ton) de trigo no mundo, nos 10 principais países, e no Brasil entre 2004 a 2006

Países	2004	2005	2006
<i>Mundo</i>	632.430	630.556	473.008
China	91.952	97.445	102.970
Índia	72.060	72.000	69.480
Estados Unidos	58.737	57.280	49.316
França	39.692	36.840	35.523
Canadá	25.860	26.775	26.289
Austrália	21.905	25.090	10.500
Alemanha	25.427	23.692	23.000
Paquistão	19.499	21.612	21.700
Turquia	21.000	21.000	20.500
Ucrânia	17.520	18.699	13.827
Brasil (21 ^o)	5.726	5.200	2.234

Fonte: FAO – www.fao.org

Verifica-se que a China é o maior produtor individual de trigo, sendo responsável por 21,8% da produção mundial em 2006, seguida pela Índia (14,7%) e Estados Unidos (10,4%). A União Européia, como bloco, também tem a maior participação na produção (17,2%).

Em nível mundial, os países do Mercosul são responsáveis por apenas 3,7% da produção de trigo. As informações contidas na Tabela 4, posicionam a Argentina como o país de maior desempenho tritícola no Mercosul em termos de área plantada e produção. Esse desempenho confere também a Argentina a condição de um dos maiores exportadores dessa *commoditie* agrícola (XXXVII Reunião da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo, 2005).

Tabela 4. Área e Produção de trigo nos países do Mercosul entre 2004 a 2006

País	Área (mil ha)			Produção (mil ton)		
	2004	2005	2006	2004	2005	2006
Argentina	6.069	6.069	5.200	15.960	12.579	13.700
Brasil	2.807	2.374	1.752	5.726	5.201	2.234
Paraguai	325	300	394	715	630	634
Uruguai	179	155	153	533	388	454
Venezuela	0,45	0,45	ND	0,15	0,15	ND
Mercosul	9.381	9.303	7.499	21.659	23.009	17.022

Fonte: FAO – www.fao.org;

ND: Não determinado

Embora novas regiões tenham despontado como alternativas para o cultivo do trigo, a tradicional região Sul continua sendo responsável pela grande maioria da produção brasileira, contribuindo com cerca de 90% da produção de trigo. No ano de 2006 ocorreu uma grande redução na produção, sendo considerada a menor desde o ano 2000. Fatores como geadas e estiagem, redução da área plantada em todos os estados e a baixa cotação do produto no mercado interno levaram a essa baixa na produção, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5. Área e Produção de trigo no Brasil, Região Sul e no estado do Rio Grande do Sul

	Produção (mil ton)			Área (mil ha)		
	2004	2005	2006	2004	2005	2006
Brasil	5.719	5.200	2.234	2.811	2.363	1.752
Sul	5.302	4.264	1.982	2.569	2.180	1.634
RS	2.061	1.390	728	1125	844	693

Fonte: www.conab.gov.br

O Paraná continua sendo o maior produtor nacional, com 50% da produção, seguido pelo RS com 40% da produção brasileira de trigo. Embora a

produção em outros estados ainda seja discreta quando comparada com os dois maiores produtores, observa-se grande crescimento na produção de trigo no cerrado, como por exemplo: Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Minas Gerais. A Figura 2 mostra a distribuição da produção nacional de trigo para a safra 06/07 (ROSSI *et al.*, 2004).

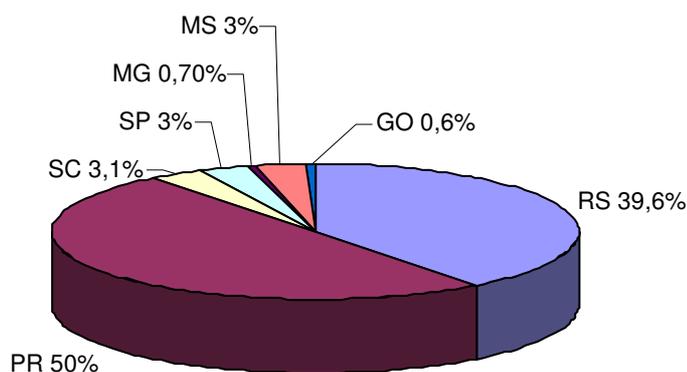


Figura 2. Distribuição da produção brasileira de trigo (ROSSI *et al.*, 2004)

A inserção de novas áreas produtivas no mercado brasileiro de trigo possui um significado muito maior do que o simples acirramento da competição interna. Há pouco tempo, a safra brasileira de trigo limitava-se à produção gerada na região Sul, cujo período de colheita se estende de agosto a dezembro. A safra de trigo é colhida no Cerrado entre maio e setembro, uma época diferente das áreas tradicionais. O fortalecimento da produção no Cerrado reduz o período de entressafra e incertezas climáticas. A existência de diferentes safras ao longo do ano permite maior estabilidade da oferta, que pode refletir em preços mais estáveis (ROSSI *et al.*, 2004).

2.5.1 O trigo no Brasil

O trigo deve ter sido uma das primeiras culturas utilizadas pelos portugueses no Brasil. A história do trigo no Brasil teve início em 1534, quando as naus de

Martim Afonso de Souza trouxeram as primeiras sementes de trigo para serem lançadas às terras da Capitania de São Vicente, de onde foi difundida por todas as capitanias, invadindo até a Ilha de Marajó, cujas plantações se tornaram, mais tarde, famosas (COODETEC, 2004).

Os trigais brasileiros se antecipam aos norte-americanos, argentinos e uruguaios, pois o Brasil foi o primeiro país americano a exportar trigo, graças às lavouras que teve em São Paulo, Rio Grande do Sul e outras regiões, antes do aparecimento da ferrugem (COODETEC, 2004).

A triticultura foi iniciada no Sul do País, no século XVII, e por muito tempo, teve grande expansão, mas esta foi condicionada pela ocorrência de anos bons e ruins que determinavam oscilações na área de cultivo. No início do século XIX a produção foi reduzida drasticamente devido ao aparecimento da ferrugem, mas voltou a expandir-se com a chegada dos imigrantes alemães e italianos, que provinham de regiões temperadas e conheciam a cultura (MUNDSTOCK, 1999).

O trigo voltou a ser cultivado no começo deste século quando o governo tomou medidas para incentivar a lavoura e a pesquisa, selecionando sementes mais apropriadas às condições de solo e clima. No início do século XIX, o Brasil exportava 13,5 mil toneladas de trigo. Após a incidência da ferrugem a produção caiu para 2,7 mil toneladas. Em 1912, o Ministério da Agricultura criou o primeiro campo experimental de trigo no RS. Porém, foi apenas em 1927, quando a produção atingiu 120 mil toneladas, que o Ministério da Agricultura criou mais três estações experimentais para a pesquisa da cultura. Em 1947, a produção de trigo no Brasil atingiu 340 mil toneladas de grãos (COSTA, 1990).

Com os trabalhos de pesquisa nas décadas de 1930 e 1940, foram obtidas melhores variedades e técnicas de cultivo, e em decorrência disto, houve um grande aumento de área, na década de 1950. Na ocasião, o RS respondia por mais de 90% da produção e área do Brasil. A expansão desordenada, sem preparo e planejamento adequados, aliada à incidência de moléstias, levou a um declínio na produtividade e área de cultivo no final da década de 1960 (MUNDSTOCK, 1999).

A Figura 3 apresenta os dados consolidados de área e produção desde 1961 até o ano de 2006. A triticultura brasileira teve um marco importante, em 1962, com a criação do CITRIN que, conjugado ao esforço da pesquisa, fez surgir

variedades resistentes à ferrugem, resultando no crescimento da produção nacional de 255 mil toneladas para 1.146 mil toneladas em 1969 (COODETEC, 2004).

Uma análise das safras mostra em 1971, uma produção de cerca de 2 milhões de toneladas. Já no ano seguinte, uma série de fatores naturais interferiu na lavoura, frustrando a produção que caiu verticalmente, não chegando a atingir 900 mil toneladas. Em 1973 e 1974, novos bons resultados foram obtidos, diante da conjugação de diversos fatores, destacando-se o aumento de área plantada e o incentivo oficial, expresso pelos preços remunerados concedidos pelo Governo. Porém, o resultado mais expressivo viria a ocorrer em 1976, com 3.215 milhões de toneladas (COODETEC, 2004).

A criação da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em 1973, fez com que a pesquisa pasasse a ser conduzida por equipes capazes de examinar conjuntamente todos os aspectos da cultura. Em 1975, uma geada catastrófica dizimou as lavouras de trigo, pondo a perder, inclusive muitas gerações de cruzamento em campos experimentais e o próprio trigo semente (COODETEC, 2004).

Um grande salto ocorreu em 1985 a 1989, onde a produção chegou a alcançar 6.099 mil toneladas em 1987, graças a um aumento na área plantada que alcançou média de 3.500 mil hectares, uma das maiores áreas plantadas até hoje (ROSSI *et al.*, 2004).

Na safra de 2003, cerca de 2,5 milhões de hectares estavam ocupados com o cultivo do trigo, apresentando o maior acréscimo de área plantada em relação aos últimos dez anos. Neste mesmo período, observou-se oscilação na produção, e em 2003 houve um acréscimo de 50% na produção em relação ao ano anterior. Este desempenho no campo foi possível graças à utilização de insumos, basicamente sementes, adubos e também a utilização de maiores quantidades de pesticidas, posicionando o Brasil como o oitavo consumidor mundial no ano de 2003. Este aumento foi devido também, às produtividades médias nas diferentes regiões do país e devido às diferentes práticas culturais realizadas nessas regiões, pois no Sul, o trigo é cultivado no sistema sequeiro e sofre o risco das geadas e em Minas Gerais, o trigo é irrigado, e com poucos riscos climáticos (ROSSI *et al.*, 2004).

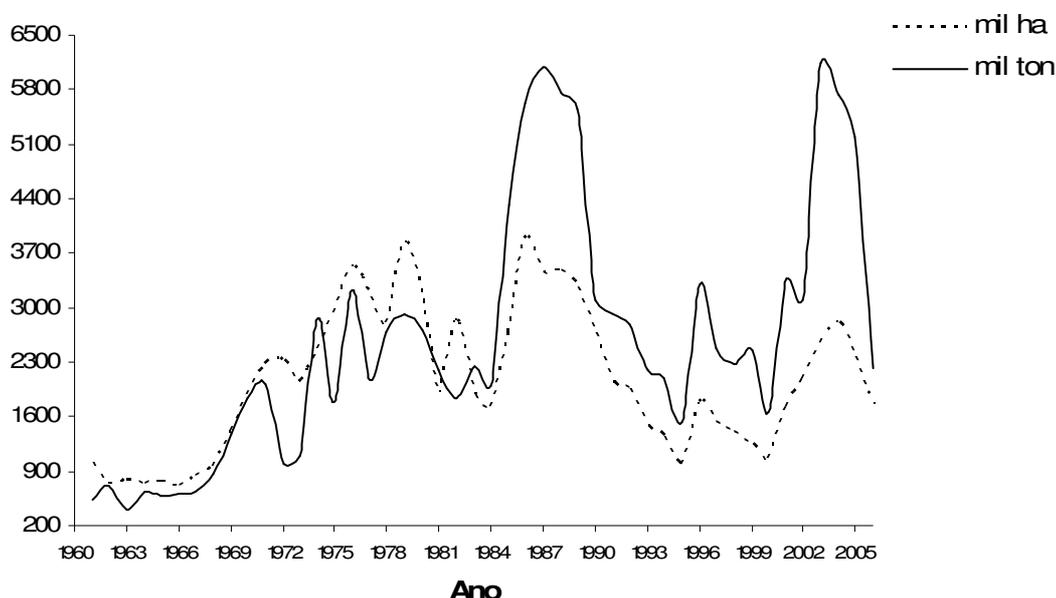


Figura 3. Área e produção de trigo no Brasil entre 1961 e 2006

Fonte: adaptado de www.fao.org

A evolução do cultivo de trigo no Brasil, no período de 1962 a 1986, propiciou a passagem de 258 mil ha para 3.854,7 mil ha plantados. O Programa de Garantia da Atividade Agropecuária (PROAGRO), instituído em 1974 contribuiu para ampliar a área cultivada com trigo, pois no ano anterior, ocorreram geadas que causaram danos significativos à cultura. Em termos gerais, é possível afirmar que, na década de sessenta, o trigo era cultivado apenas no Extremo Sul do país, abaixo do paralelo 24, que abrange o sul do Paraná, Santa Catarina e o RS. Na década de setenta, essa situação começou a se inverter, mostrando uma tendência para o norte do Paraná, acompanhando o crescimento da cultura da soja (COSTA, 1990).

Na década de 1960, o RS era responsável por cerca de 90% da produção nacional. A partir da década de 1970, com a mecanização do meio-oeste do Paraná, cresceu a participação deste estado que produziu 39% em 1978 e 70% em 1995. Na década de 1980, o governo reduziu a oferta de recursos para custeio das safras agrícolas e, em 1987, extinguiu o subsídio ao consumo de trigo, que durou 15 anos (COSTA, 1990).

Apesar das condições econômicas adversas que enfrentava o país, esta nunca esteve tão próximo da auto-suficiência. Entre os fatores que propiciaram tais condições, é importante destacar o avanço tecnológico conseguido pela pesquisa através da criação de variedades mais produtivas e adaptadas às condições climáticas brasileiras. Além disso, a produção de trigo, a partir de 1985, foi caracterizada pela melhoria do grão. Em contrapartida, a partir de 1990 com a retirada do apoio governamental à cultura, desestimulou-se a produção, reduzindo-a para menos de 3 milhões de toneladas. Contribuiu para isso também, a maior liberdade de importação, sem as devidas precauções para guardar a produção interna, das práticas desleais de mercado (COSTA, 1990).

2.6 Armazenamento do trigo

Os principais aspectos que devem ser observados no armazenamento do trigo, uma vez limpo e seco, são as pragas que atacam os grãos, danificando-os e muitas vezes dificultando a comercialização. Os fungos podem produzir micotoxinas nocivas ao homem e animais e são fatores que influenciam a qualidade tecnológica.

Indica-se o uso do manejo integrado de pragas no armazenamento, que compreende etapas como:

- ✓ armazenagem de trigo com teor de umidade máximo de 13%;
- ✓ higienização e limpeza de silos, depósitos e equipamentos;
- ✓ eliminação de focos de infestação mediante a retirada e a queima de resíduos do armazenamento anterior;
- ✓ pulverização das instalações que receberão os grãos, utilizando produtos como deltametrina, fenitrotiona e pirimifós-metílico, na dose registrada e indicada;

O tratamento com inseticidas protetores de grãos deve ser realizado no momento de abastecer o armazém e pode ser feito na forma de pulverização na correia transportadora ou em outros pontos de movimentação de grãos. É importante que haja uma perfeita mistura do inseticida com a massa de grãos.

Uma vez armazenado, o trigo deve ser monitorado durante todo o período em que permanecer estocado. O acompanhamento de pragas que ocorrem na

massa de grãos armazenados é de fundamental importância, pois permite detectar o início da manifestação que poderá alterar a qualidade final do grão (XXXVII Reunião da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo, 2005).

2.7 O uso de pesticidas

Com o advento da agricultura, o homem começou a estocar grãos, vegetais e carnes, esses estoques passaram a constituir uma excelente fonte de alimentos. Os campos cultivados também se tornaram excelentes fontes de alimento para as mais variadas espécies de insetos, roedores e também alvo do ataque de fungos e bactérias (BARBOSA, 2004).

Essas espécies, devido à grande disponibilidade de alimentos, multiplicaram-se em grande escala, passando então, a interferir no bem estar dos humanos e, em razão disso, a serem consideradas como pragas. Estas se tornaram assim, um grande problema para a raça humana, passando a ocupar boa parte da atenção da sociedade (BARBOSA, 2004).

O *Codex Alimentarius* define pesticida como sendo toda e qualquer substância utilizada com o propósito de prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar qualquer peste, incluindo espécies indesejáveis de plantas, insetos ou animais, durante as etapas de produção, armazenamento, transporte, distribuição e processamento do alimento ou ração animal (ou que seja fornecido aos animais para controle de ectoparasitas). O termo inclui substâncias utilizadas como reguladoras do crescimento das plantas, desfolhantes, dessecantes, ou inibidores de brotos, e substâncias aplicadas tanto antes como após a colheita, para proteger a mesma da deterioração durante o armazenamento e transporte (FAO, 2005a). Este termo normalmente exclui, fertilizantes, nutrientes de origem animal ou vegetal, aditivos para alimentos e medicamentos para animais.

O resíduo de pesticida é definido como sendo qualquer substância específica presente no alimento “in natura” ou não, ou ainda em ração animal, proveniente do uso de pesticidas, como os produtos de conversão, metabólitos, produtos de reações e impurezas consideradas com alguma significância toxicológica. Este termo inclui resíduos de substâncias desconhecidas ou de

fontes inevitáveis (como o meio ambiente), bem como o uso de produtos químicos conhecidos (FAO, 2005a).

O uso de pesticidas é ainda, a principal estratégia no campo para o combate e a prevenção de pragas agrícolas, garantindo alimento suficiente e de qualidade para a população. Sabendo-se que a população cresce em um ritmo maior que a produção de alimentos, uma das soluções para a agricultura é o aumento da produtividade por ha, uma vez que o aumento da área cultivada, poderia causar enorme impacto ambiental com graves conseqüências, uma vez que mais florestas deveriam ser derrubadas para dar espaço a campos cultivados. Portanto, esse aumento na produtividade pode ser conseguido de várias outras maneiras, como o desenvolvimento de novas tecnologias de cultivo, o uso de fertilizantes químicos e de pesticidas (BARBOSA, 2004).

Esses compostos, porém, são potencialmente tóxicos ao homem, podendo causar efeitos adversos ao sistema nervoso central e periférico, ter ação imunodepressora ou ser cancerígeno, entre outros (CALDAS & SOUZA, 2000).

Embora o Brasil ainda não disponha de dados suficientes que reflitam a situação de contaminação dos alimentos, é possível supor que o problema seja significativo, considerando-se a colocação do país no mercado mundial consumidor de pesticidas (OLIVA *et al.*, 2002).

Até dezembro de 1999, 322 ingredientes ativos tiveram seu uso agrícola aprovado no País, com quase 2000 produtos registrados, os quais incluem inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, reguladores de crescimento, feromônios, molusquicidas e protetores de sementes. Cerca de 2300 limites máximos de resíduos foram estabelecidos em 265 culturas (CALDAS & SOUZA, 2000).

Nos últimos anos ocorreu um aumento do uso de pesticidas na produção de alimentos. Em termos estatísticos, o Brasil, em 2003, foi classificado como oitavo país entre os maiores consumidores de pesticidas e o quarto maior mercado de pesticidas no mundo. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 2006, o Brasil está colocado como o segundo maior consumidor de pesticidas do mundo (ANVISA, 2006). Segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria para Defesa Agrícola (SINDAG), em 2006, as vendas totais de pesticidas no Brasil foram superiores a US\$ 3,91 bilhões (SINDAG, 2008).

O faturamento obtido pela indústria de pesticidas com as vendas para a cadeia do trigo é dividida da seguinte maneira entre as diferentes classes de produtos: fungicidas (65,8%), herbicidas (19,4%), inseticidas (14,5%), outros (0,3%). Acredita-se que o aumento da utilização do sistema de plantio direto deve resultar em acréscimo da participação percentual dos herbicidas nas vendas de pesticidas para esta cultura, pois 13% do faturamento da indústria de pesticidas com a cultura do trigo é proveniente de produtos destinados ao tratamento de sementes para o plantio (ROSSI *et al.*, 2004).

Estima-se que 20% da produção nacional de grãos é perdida anualmente. Grande parte destas perdas deve-se a problemas fitossanitários, sendo somente as pragas de armazém responsáveis por cerca de 10% delas ou aproximadamente 7 milhões de toneladas de grãos. Em razão dos problemas causados pelos insetos nos armazéns, tem-se utilizado principalmente substâncias químicas para controlar estas pragas e para a preservação das colheitas; por outro lado, pode ocorrer a persistência destes inseticidas na forma de resíduos tóxicos nos grãos tratados, cujo consumo por parte do homem e dos animais, mesmo em quantidades sub-letais, representa risco potencial à saúde dos consumidores (TREVIZAN & BAPTISTA, 2000).

Cada vez mais o destino dos pesticidas no meio ambiente tem sido motivo de preocupação, pois mesmo quando aplicados nas partes aéreas das plantas, poderão ser carregados para o solo. Parte dessas substâncias pode ir para a atmosfera durante a aplicação, retornando posteriormente para o solo por meio da precipitação com as águas da chuva. Mesmo quando aplicados no solo, uma parte pode ir para a atmosfera, nos casos em que os compostos são muito voláteis (BARBOSA, 2004).

A contaminação por pesticidas, dos mananciais de água que abastecem as cidades é uma das grandes preocupações atualmente, uma vez que os métodos usuais de tratamento de água normalmente não são capazes de remover os resíduos desses compostos (BARBOSA, 2004).

Os níveis de resíduos de pesticidas no meio ambiente ou nos alimentos, dependem de diversos fatores, como:

- ✓ técnica e quantidade aplicada do pesticida;

- ✓ fatores ambientais (luz, temperatura, umidade e algumas propriedades físicas e químicas do solo);
- ✓ cumprimento do período de carência ou intervalo de segurança;
- ✓ características físico-químicas do pesticida, principalmente aquelas relacionadas a sua persistência no ambiente, que é função da solubilidade em água e a tendência de partição entre os vários compartimentos do ambiente, medida através do coeficiente de partição (octanol-água), e dos vários processos responsáveis pelo desaparecimento dos pesticidas no meio ambiente, ou seja, através de volatilização, fotólise, oxidação, hidrólise, biotransformação e biodegradação (MIDIO & MARTINS, 1997).

2.7.1 Contaminação de alimentos por pesticidas

Estatísticas indicam que, as perdas na agricultura chegam a 1 bilhão de ton, devido a ação de pragas que são responsáveis por uma redução de até 30% na produção. Os pesticidas têm desempenhado um importante papel na agricultura desde a sua invenção, e que são de certo modo, insubstituíveis nos tempos atuais. Embora tenham encontrado ampla aplicação e impulsionado a produção na agricultura, os perigos que trouxeram em relação a segurança alimentar e a saúde humana, transformaram-se no foco da atenção do mundo (PANG *et al.*, 2006a).

A ampla utilização de pesticidas na agricultura e em outras atividades humanas traz, como consequência, a contaminação dos vários compartimentos do ambiente, levando o homem a se expor a seus resíduos através dos alimentos (MIDIO & MARTINS, 1997). Essa contaminação normalmente ocorre quando o produtor, por falta de informação correta ou por não acreditar que a dose prescrita do produto seja eficaz, aplica quantidades muitas vezes superiores às recomendadas e às vezes, de produtos não recomendados para determinada cultura (BARBOSA, 2004).

Em muitos casos, os produtores não obedecem ao intervalo de segurança ou período de carência estabelecido por lei. Esse intervalo é o período que deve

ocorrer entre a última aplicação e a colheita, o que depende da toxicidade e do tempo de degradação do produto (BARBOSA, 2004).

Estima-se que, a cada ano, morrem no Brasil mais de 300 pessoas devido a intoxicações por pesticidas. De acordo com o relatório do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINTOX) da Fundação Oswaldo Cruz, foram notificados 14064 casos e 238 óbitos no ano de 2003. Cabe ressaltar que o percentual de casos não notificados é extremamente elevado (FIOCRUZ, 2008).

Resíduos de pesticidas podem ser encontrados não apenas nos produtos agrícolas em estado natural, mas também em alimentos processados. Dessa forma, as mudanças nos níveis de resíduos que ocorrem nos alimentos após a colheita, particularmente durante o preparo e processamento dos alimentos, devem ser consideradas na estimativa dos níveis de resíduos no produto que está sendo consumido. Dependendo do tipo de processamento a que os alimentos são submetidos, pode ocorrer concentração ou diminuição dos níveis de resíduos (BARBOSA, 2004).

No Brasil, poucas informações são disponíveis sobre a contaminação dos alimentos por pesticidas. De acordo com as boas práticas agrícolas, se respeitado o período de carência ou intervalo de segurança, estes níveis residuais estarão de acordo com os limites de resíduos estabelecidos (ANVISA, 2006).

Atualmente, pode-se dizer que no Brasil não há um sistema de monitoramento e controle do uso de pesticidas nos alimentos, sejam eles importados, ou aqui cultivados e consumidos, ou ainda destinados para exportação. Somente em 2001, a ANVISA iniciou o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Trata-se de um trabalho complexo em que os laboratórios participantes analisam 92 tipos diferentes de princípios ativos em cada amostra, incluindo aqueles proibidos no país (ANVISA, 2008).

Entre 2001 e 2004, o PARA analisou 4 mil amostras de alimentos. Os dados são extremamente preocupantes, pois revelaram que mais de 50% das amostras continham resíduos tóxicos. Entre as amostras irregulares 83% foram referentes ao uso de produtos não autorizados para determinada cultura, e em, 17%, os problemas estavam na quantidade de resíduos de pesticidas acima dos níveis permitidos pela legislação (ANVISA, 2008).

No que concerne à contaminação dos alimentos, é preocupante reconhecer que produtos como cereais, frutas, carnes, leite e hortaliças não são monitorados sistematicamente para detecção de resíduos tóxicos. Existem alguns estudos isolados, como o realizado pelo Instituto Biológico de São Paulo, que apontam 27% das frutas comercializadas contaminadas por pesticidas e dessas, 20% com resíduos proibidos (ANVISA, 2008).

2.7.2 Degradação de pesticidas em alimentos processados

Os fatores que podem levar à redução da concentração de um pesticida num alimento são: lavagem, retirada da casca, enlatamento e o cozimento. Estes processos podem freqüentemente reduzir os níveis do resíduo no alimento que foi tratado com pesticidas. No entanto, pesticidas de caráter lipofílico, tendem a se concentrar nos tecidos ricos em lipídios, e assim, os níveis de resíduo podem aumentar em alimentos com alto teor de gordura. Os processos que envolvem calor, podem aumentar a volatilização, hidrólise ou degradação, e assim, reduzir os níveis de resíduos. Entretanto, processos de secagem, como nas frutas secas, podem resultar num aumento das concentrações dos resíduos devido a perda de umidade (HOLLAND *et al.*, 1994).

Mecanismos de alteração dos resíduos podem ocorrer mesmo depois que uma colheita é realizada. Mecanismos como: volatilização, hidrólise, fotodegradação, oxidação e penetração, podem reduzir a quantidade de resíduos, mesmo depois que a colheita é removida do campo (HOLLAND *et al.*, 1994).

As condições durante o cozimento podem variar grandemente. Condições como: tempo, temperatura, se o sistema é aberto ou fechado, são considerações importantes para uma análise quantitativa. As taxas de degradação e volatilização dos resíduos são aumentadas pelo calor durante o cozimento (MESTRES & MESTRES, 1992).

Estudos realizados com clorotalonil, mostram que perdas na faixa de 85 a 98% ocorreram quando o cozimento foi realizado em sistema aberto. Já em sistema fechado, as perdas resultaram em 50%. Para compostos que são de baixa volatilidade e relativamente estáveis, como o dicloro-difenil-triclorometano

(DDT) e os piretróides sintéticos, as perdas dos resíduos no cozimento podem ser baixas, ou ocorrer a concentração destes, devido à perda de umidade (MESTRES & MESTRES, 1992).

Durante o processo de preparo do pão, a farinha é sujeita à uma transformação biológica (fermentação) e física (temperatura). O pão pode ser considerado, deste modo, um alimento processado de acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization*) (SHARMA *et al.*, 2005).

Em geral, durante o processamento de um alimento, ocorre, com algumas exceções, uma diminuição do nível de resíduos. A hidrólise é a reação mais provável durante o processamento. As etapas de fermentação e as altas temperaturas contribuem significativamente para a degradação residual dos pesticidas (SHARMA *et al.*, 2005).

O papel dos microorganismos na degradação de pesticidas já é conhecida. Deste modo, os microorganismos presentes no fermento, podem ser responsáveis pela degradação de diferentes grupos de pesticidas (SHARMA *et al.*, 2005).

2.7.3 Limites Máximos de Resíduos

A ANVISA, do Ministério da Saúde, é o órgão que regulamenta o sistema de registro de pesticidas, seus componentes e afins no país, realizando avaliação toxicológica e de risco para cada produto liberado para uso, sendo responsável pelos riscos a que a população possa estar exposta aos pesticidas, o que pode ser decorrente pelo contato direto, como o caso dos trabalhadores rurais e manipuladores, dentre outros, ou indiretamente através da ingestão de alimentos oriundos de culturas agrícolas tratadas com pesticidas (IMOTO, 2004).

A partir da análise desses dados, a ANVISA estabelece os limites máximos de resíduos de pesticidas que podem estar presentes nos alimentos consumidos pela população. Entende-se por limite máximo de resíduo, a quantidade máxima de resíduo de pesticida presente nos alimentos e que pode ser consumida sem prejuízo à saúde, ao longo de sua vida (OLIVA *et al.*, 2002).

O controle oficial de resíduos de pesticidas em alimentos é geralmente baseado nos limites máximos de resíduos (LMRs) e períodos de carência (intervalo de segurança), estabelecidos caso a caso. Alguns estudos sobre a ocorrência de resíduos em grãos, frutas e vegetais já são conhecidos. Entretanto, quase nada se sabe sobre a ocorrência destes nos produtos processados, e em consequência, os riscos à saúde (TREVISAN & BAPTISTA, 2000).

O *Codex Alimentarius*, a FAO e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceram LMRs em vários alimentos. Mais recentemente tem aumentado o interesse destas agências, em obter dados sobre o destino dos pesticidas durante o processamento. Com estes estudos pode-se avaliar ou projetar mudanças nos LMRs dos alimentos “in natura” antes do processamento (SHARMA *et al.*, 2005).

Embora os LMRs sejam o meio confiável de estabelecer o uso aceitável de pesticidas, estes podem, ao mesmo tempo, serem inadequados como guia dos riscos dos resíduos à saúde humana. Estudos sobre a dieta total mostram que utilizando apenas os LMRs como base para o consumo dietético humano, pode acontecer uma super-estimativa das concentrações destes compostos (WINTER, 1992).

O LMR é definido, pelo *Codex Alimentarius*, como sendo a concentração máxima do resíduo de um pesticida (expresso em mg kg^{-1}), recomendado pelo Comitê do *Codex Alimentarius* sobre resíduos de pesticidas (CCPR, do inglês *Codex Alimentarius Committee on Pesticide Residues*) como sendo legalmente permitido dentro do alimento ou na ração animal (FAO, 2005a).

Os LMRs estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* baseiam-se em práticas agrícolas internacionais e visam proteger e preservar a saúde humana, garantindo o comércio internacional de alimentos livres de barreiras, com respeito aos resíduos. Entretanto, o nível de resíduos de pesticidas em alimentos depende de fatores agrônômicos e climáticos, e muitos países estabelecem seus próprios limites baseados nas boas práticas agrícolas praticadas localmente (IMOTO, 2004).

Com o passar do tempo, em razão do aumento no uso de pesticidas e do maior entendimento nas áreas de biologia e toxicologia, várias leis foram sendo aprovadas em diversos países, inclusive no Brasil, visando estabelecer os limites

máximos de resíduos de pesticidas em alimentos e água, assim como minimizar o impacto desses compostos sobre o meio ambiente (BARBOSA, 2004).

Para o estabelecimento dos limites máximos de resíduos em alimentos, deve-se levar em conta os riscos de intoxicação aguda e crônica. Na avaliação do risco de intoxicação aguda é necessário fazer uma estimativa do mais alto nível de resíduo em um alimento, consumido em uma única porção. Na avaliação do risco de intoxicação crônica deve-se levar em consideração a exposição total média de resíduo em uma dieta consumida por um período prolongado. Para fazer essas avaliações, é necessário considerar os alimentos prontos para consumo, comuns na dieta da população em estudo (BARBOSA, 2004).

Para assegurar as boas práticas agrícolas, práticas que descrevem as maneiras corretas de se utilizar os pesticidas e regular o comércio internacional, muitos países e organizações internacionais têm estabelecido limites máximos de resíduos de pesticidas em alimentos. Programas de monitoramento detalhados são conduzidos na maioria dos países europeus. Na Holanda, resíduos de pesticidas são monitorados por programas nacionais em gêneros alimentícios por mais de 30 anos (HIEMSTRA & de KOK, 2007; SHULING *et al.*, 2007).

A Comunidade Européia, que harmoniza o registro e as tolerâncias dos pesticidas, estabelece legislações cada vez mais restritivas em relação aos limites máximos de resíduo, permitidos nas frutas e nos vegetais. Atualmente, LMR entre 0,01 e 0,05 mg kg⁻¹, já representam uma diminuição apreciável em relação aos limites precedentes. Estas leis e regulamentos afetaram os limites de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) dos métodos analíticos. Os métodos multirresíduo devem ser capazes de detectar os compostos em concentrações de 5 a 10 vezes abaixo do LMR, para garantir a identificação e a quantificação exata destes níveis de resíduos (HERNANDO *et al.*, 2001).

A legislação brasileira concernente aos resíduos de pesticidas tem sido aperfeiçoada nos últimos anos com base em informações fornecidas pela FAO/OMS e pelo *Codex Alimentarius*. Em muitos casos, a nossa legislação chega a ser mais rigorosa que a de outros países, estabelecendo um menor valor de LMR para muitos pesticidas (BARBOSA, 2004), isto pode ser observado na Tabela 6, onde estão apresentados os LMRs estabelecidos pela ANVISA, *Codex Alimentarius* e pela União Européia para os compostos no trigo.

No Brasil não existem valores de LMRs estabelecidos para alimentos processados, como a farinha, farelo e o pão. Apenas o *Codex Alimentarius* possui limites já estabelecidos, como também se observa na Tabela 6. Para o pão, o único LMR estabelecido é de 0,5 mg kg⁻¹ para o composto clorpirifós-metílico.

Tabela 6. Pesticidas selecionados e Limites Máximos de Resíduos, em mg kg⁻¹ em trigo, farinha e farelo

Pesticidas	Trigo			Farinha	Farelo
	ANVISA	Codex	U.E.	Codex	Codex
Azoxistrobina	0,05		0,3		
Bifentrina	0,6	0,5	0,5	0,2	2
Cialotrina-lambda	0,05		0,02		
Cipermetrina		0,2	0,05		
Clorotalonil	0,5	0,1	0,1		
Clorpirifós-etílico	0,2	0,5	0,05	0,1	
Clorpirifós-metílico		10	3,0	2	20
Deltametrina	1,0		1,0	0,3	5
Dicofol			0,02		
Dieldrin			0,01		
Dimetoato	0,05	0,05	0,3		
Endrin			0,01		
Endosulfan α , β , sulfato		0,2	0,05		
Fenitrotiona	1,0				20
Lindano		0,01	0,01		
Malationa	8,0	0,5	8,0	0,2	
Parationa-etílica	0,1		0,05		
Permetrina cis-trans	0,02		0,05	0,5	5
Pirimifós-metílico	10,0		5,0		15

Fonte: www.anvisa.gov.br; www.codexalimentarius.net; [//ec.europa.eu](http://ec.europa.eu)

Alimentos com resíduos químicos acima dos limites estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* podem causar enormes prejuízos aos produtores, visto a proibição imposta por mercados externos. Além disto, não oferecem segurança alimentar e ambiental para os consumidores internos, que estão exigindo uma produção mais limpa. Assim, níveis de resíduos de pesticidas devem ser monitorados para evitar barreiras econômicas (CHAO *et al.*, 2005).

A conquista de novos mercados de exportação para produtos agrícolas brasileiros tem sido extremamente prejudicada, uma vez que as legislações internacionais, geralmente, são incompatíveis. Sabe-se que os países desenvolvidos exercem rígidas normas sanitárias, ou seja, de controle de qualidade dos produtos que ingressam em seus mercados. Sabe-se que a garantia da segurança sanitária dos alimentos somente é alcançada através do controle rígido e constante da qualidade dos mesmos, o que inclui a problemática dos resíduos de pesticidas, e que atualmente, constitui-se uma das principais barreiras alfandegárias impostas ao comércio exterior (SOUZA & ALCANTARA, 2007).

O problema do Brasil e de outros países em desenvolvimento é a escassez de laboratórios especializados na análise de resíduos de pesticidas, pois a construção e a manutenção desses laboratórios, bem como a necessidade de analistas altamente capacitados, demandam investimentos financeiros extremamente elevados.

Provavelmente não há outra classe de compostos químicos tão regulamentada como a dos pesticidas. LMRs estão estabelecidos, na maioria dos países, a fim de impedir impactos adversos na saúde pública e de promover Boas Práticas na Agricultura. Devido a estas razões um grande número de laboratórios está envolvido na vigilância destes limites ou na identificação e quantificação de pesticidas nos mais diversos tipos de matrizes (ALDER *et al.*, 2006).

2.8 Análise de Resíduos de Pesticidas em Alimentos

O controle de níveis residuais de pesticidas em amostras de alimentos, com o objetivo de evitar a produção de efeitos tóxicos na população exposta, pode ser realizada através da execução de análises por diversos métodos analíticos. Um grande avanço nas metodologias com esta finalidade vem sendo observado nos últimos anos em resposta às necessidades de sensibilidade, especificidade, rapidez e eficiência exigidas pelos órgãos regulamentadores legais e de pesquisa que determinam os limites de tolerância para tais resíduos (MIDIO & MARTINS, 1997). Como se trata de quantidades muito pequenas dos contaminantes, são necessárias técnicas muito sensíveis para detectar e quantificar tais compostos (BARBOSA, 2004).

O desenvolvimento de um método para a análise de resíduos de pesticidas em alimentos é dificultado por diversos fatores, tais como tempo, grande volume de solventes, várias etapas de extração, tornando a análise extremamente laboriosa. Um procedimento inclui normalmente 3 etapas: a extração, *clean up* e determinação cromatográfica (MIDIO & MARTINS, 1997).

A extração dos pesticidas é uma etapa crítica, pois depende da polaridade do pesticida, bem como do tipo de matriz, além da escolha do solvente para isolar o pesticida da matriz. A análise de alimentos com teores variáveis de lipídios, carboidratos, proteínas, pigmentos, exige muitas vezes, múltiplas fases de purificação durante a análise onde diferentes métodos podem ser utilizados (FRENICH *et al.*, 2007; HIEMSTRA & de KOK, 2007; MIDIO & MARTINS, 1997).

As técnicas cromatográficas têm sido as mais utilizadas para a análise de resíduos de pesticidas em alimentos. A escolha da técnica de detecção mais adequada depende de vários fatores, principalmente aqueles relacionados com a estrutura química do pesticida a ser analisado. Além disso, a finalidade da análise exige técnicas com suficiente sensibilidade e especificidade (MIDIO & MARTINS, 1997).

A determinação de pesticidas têm sido tradicionalmente realizada por Cromatografia Gasosa. Aplicações utilizando GC-MS têm sido amplamente descritas na literatura, devido a exigência de alta sensibilidade e a seu alto poder

de confirmação da identidade e da concentração dos analitos (HERNANDEZ *et al.*, 2006; HIEMSTRA & de KOK, 2007; MIDIO & MARINS, 1997).

Recentemente, a análise de resíduos de pesticidas têm incorporado novas tecnologias, procurando minimizar impacto ambiental, tempo e a exposição dos analistas à solventes tóxicos (FRENICH *et al.*, 2007; ADOU *et al.*, 2001).

2.8.1 Preparo da amostra para análise multirresíduo

Uma das tendências em Química Analítica, é o desenvolvimento de métodos multirresíduos, que determinam uma ampla variedade de substâncias em uma única extração, sendo preferido em muitos laboratórios (FRENICH *et al.*, 2007; HERNANDEZ *et al.*, 2006).

Neste contexto, uma das tarefas do químico analítico é o desenvolvimento de novas metodologias, que sejam rápidas, baratas, mas que ao mesmo tempo possam identificar e quantificar os analitos em amostras complexas em níveis de traços, com certo grau de confiança (FRENICH *et al.*, 2005).

A análise de resíduos de pesticidas, além de ser um instrumento de proteção a saúde humana está também relacionada a fatores econômicos (AGÜERA *et al.*, 2002). Atualmente, estima-se que no mundo, cerca de 20.000 análises de resíduos de pesticidas em alimentos sejam realizadas todos os dias (PICÓ *et al.*, 2004).

O monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos é atualmente prioridade na pesquisa, para realizar uma avaliação extensiva da qualidade dos alimentos e evitar possíveis riscos à saúde humana. Os métodos multirresíduos são uma resposta à demanda elevada de análises de resíduos de pesticidas, e fornece um aumento na produtividade dos laboratórios, bem como diminui o custo da análise (AGÜERA *et al.*, 2002; DÍEZ *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de um método multirresíduo não é simples, devido às diferentes propriedades químicas como, solubilidade, volatilidade, polaridades dos pesticidas, e a ampla variedade de matrizes; os analistas empenham grande esforço para descobrir como transferir simultaneamente todo resíduo dos pesticidas da matriz para a fase orgânica e como projetar procedimentos de *clean*

up para a remoção completa dos interferentes, e qual tipo de instrumento deve ser utilizado para a análise qualitativa e quantitativa dos pesticidas (PANG *et al.*, 2006b).

Estratégias para a extração em métodos multirresíduos são variadas, mas o uso de extrações com solventes orgânicos são preferidas nas análises de rotina devido a simplicidade, rapidez e altas recuperações para uma ampla faixa de polaridades. Este método consiste em homogeneizar a amostra com o solvente orgânico, utilizando agitação manual ou mecânica, sonicação ou disruptor celular. A adição de água antes da etapa de extração, pode melhorar em alguns casos, a dessorção dos pesticidas da matriz. Os solventes mais amplamente utilizados são: acetonitrila, acetona, acetato de etila, diclorometano, metanol, ou misturas como diclorometano com hexano, também são muito populares (TADEO *et al.*, 2000).

Os principais aspectos a serem considerados na escolha do solvente em uma extração são:

- compatibilidade com os analitos (eficiência do solvente para a escala desejada de polaridade do analito, estabilidade dos analitos durante a extração e o armazenamento dos extratos);
- seletividade (facilidade em evitar a extração de interferências da matriz no extrato final);
- compatibilidade com as técnicas utilizadas no *clean up* e na etapa de quantificação;
- volatilidade, quando a evaporação do extrato for desejada;
- segurança para o pessoal do laboratório e custo.

Acetonitrila, acetona e acetato de etila são os três solventes de extração mais utilizados em métodos multirresíduos, promovendo altas recuperações para uma ampla faixa de pesticidas. Além disso, servem freqüentemente como solventes de eluição na etapa de *clean up*, ou se nenhum *clean up* for necessário, constituem também o meio em que o extrato final pode ser redissolvido (MASTOVSKA & LEHOTAY, 2004).

Cada um destes solventes possui vantagens e desvantagens em termos de seletividade. A miscibilidade da acetonitrila e acetona em água, levam sempre à formação de uma única fase na presença da matriz. A acetona necessita de

solventes não polares, como hexano para promover a separação das fases. Um vantagem da acetonitrila em relação a acetona é que a remoção de água residual é facilmente obtida pela adição de sulfato de magnésio. A acetonitrila isola compostos menos lipofílicos das amostras em comparação com a acetona e acetato de etila. Acetato de etila é mais eficiente em evitar co-extratos como os açúcares, comparado principalmente à acetona (ANASTASSIADES *et al.*, 2003a).

Como desvantagens da acetonitrila em relação a acetona e acetato de etila, pode-se citar: o grande volume de expansão durante a vaporização no GC; baixa volatilidade; sua toxicidade, no entanto seu impacto negativo à saúde humana e meio ambiente é muito menor em relação aos solventes clorados, como o diclorometano, que ainda é muito utilizado. De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*), a acetonitrila não é classificada como um agente carcinogênico e não é persistente no meio ambiente, além disso, a baixa volatilidade da acetonitrila reduz a exposição do analista, e pode ser minimizada com procedimentos apropriados de manipulação (ANASTASSIADES *et al.*, 2003a).

No que diz respeito à etapa de *clean up*, acetato de etila é mais compatível com a técnica de GPC (do inglês, *Gel Permeation Chromatography*) para a remoção de algumas moléculas maiores e de pigmentos. A acetona e principalmente a acetonitrila são apropriadas para várias aplicações de *clean up* em SPE. A etapa de *clean up* por extração em fase sólida dispersiva (D-SPE, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*), utilizado no método de QuEChERS (do inglês, *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) para remoção dos interferentes nos extratos de acetonitrila, torna a etapa de *clean up* relativamente rápida, barata, e conveniente (MASTOVSKA & LEHOTAY, 2004).

As técnicas tradicionais de preparo de amostras possuem etapas tediosas, que consomem tempo e um grande volume de solventes. Extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) e dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês, *Matrix Solid Phase Dispersion*) foram técnicas recentemente introduzidas como métodos alternativos para o preparo de amostras destinadas a análise de resíduos de pesticidas (HERNANDEZ *et al.*, 2006).

Outra técnica bastante difundida é a microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*), esta técnica consome um pequeno

volume de solventes, porém, a extração e concentração dos analitos é realizada em uma única etapa. Em 1999, foi desenvolvida a extração sortiva por barra de agitação (SBSE, do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*), o mecanismo desta extração é similar ao da SPME, porém o fator de pré-concentração é em torno de 100 vezes maior, dependendo a quantidade de adsorvente utilizado. Outros diferentes métodos também são utilizados, entre eles destacam-se: extração por fluído supercrítico (SFE, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*), extração por solvente acelerado (ASE, do inglês *Accelerated Solvent Extraction*) e extração assistida por microondas (MAE, do inglês *Microwave-assisted Extraction*) (HERNANDEZ *et al.*, 2006).

Um grande número de métodos multirresíduos foram desenvolvidos nos últimos anos, sendo que os métodos mais freqüentemente empregados, utilizam extração com solvente seguido pela determinação por GC. A diminuição considerável dos limites máximos de resíduo para muitos pesticidas, impostas pela União Européia nos últimos anos, tornou necessária a melhoria nos limites de detecção tanto do método como do instrumento (AGÜERA *et al.*, 2002).

O primeiro método multirresíduo desenvolvido foi denominado método de Mills. O método foi desenvolvido em 1960 pelo químico Mills no FDA (*Food and Drug Administration*), Estados Unidos. Neste período o principal foco, eram as análises de pesticidas organoclorados, que eram extraídos de alimentos não gordurosos com acetonitrila. Água e sais eram adicionados ao extrato de acetonitrila e os pesticidas eram subseqüentemente particionados em solventes apolares, como hexano e éter de petróleo. Deste modo, a água e os componentes polares da matriz, como açúcares e sais, eram separados do extrato (MILLS *et al.*, 1963).

Durante os anos de 1970, com a introdução de pesticidas mais polares como os organofosforados, houve a necessidade de se desenvolver um método alternativo para determinar compostos que não eram extraídos pelo método de Mills, este foi então substituído pelo método denominado método de Luke, que utiliza acetona como solvente de extração e diclorometano e éter de petróleo para remover a água na etapa de partição líquido-líquido (LUKE *et al.*, 1975). O método de Luke é ainda hoje amplamente empregado, e é utilizado como base para métodos multirresíduos usados freqüentemente em estudos da avaliação de risco

e monitoramentos de alimentos, principalmente em frutas e vegetais. O método de Luke consiste em uma extração líquido-líquido com um solvente apolar e a adição de sulfato de sódio para recuperar os pesticidas polares perdidos na fase aquosa (SHERMA, 2001; SCHENCK *et al.*, 2002).

Em 1981, houveram as primeiras modificações do método descrito em 1975, onde efetuou-se a substituição da acetona por éter de petróleo. Atualmente, a versão mais utilizada, consiste na análise de 15 g de frutas ou vegetais processados, adicionando-se 30 mL de acetona e agitação em homogeneizador do tipo ultra-turrax por cerca de 30 s, posteriormente, adiciona-se 15 g de sulfato de sódio anidro, 30 mL de éter de petróleo e 30 mL de diclorometano (GENERAL INSPECTORATE FOR HEALTH PROTECTION, 1996).

BECKER (1971), desenvolveu os primeiros métodos multirresíduo com a adição de sais, inicialmente foi empregada uma solução de cloreto de sódio que foi adicionada ao extrato inicial, no entanto a saturação foi apenas parcial, não permitindo a separação das fases. LUKE *et al.* (1975) e SPECHT & TILKES (1985) adicionaram cloreto de sódio sólido para saturar a fase aquosa, fornecendo assim maior quantidade de acetona na fase orgânica, promovendo um aumento na polaridade, resultando em melhores recuperações para os analitos polares.

O método de Becker tornou-se oficial na Alemanha, denominado método DFG-S8, e o método de Specht & Tilkes tornou-se mais tarde, o método oficial DFG-S19. O método de Luke tornou-se o método oficial da AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*). Estes métodos multirresíduos e suas variações são ainda hoje universalmente utilizados para monitorar resíduos de pesticidas (ANASTASSIADES *et al.*, 2003a).

O método de extração utilizando acetato de etila foi introduzido como uma alternativa ao procedimento de Luke para a extração de amostras não gordurosas, apresentando vantagens como: rapidez, simplicidade e boas recuperações. Todas estas vantagens, fizeram deste método, o método oficial de extração utilizado por algumas agências regulamentadoras européias. O procedimento envolve uma extração com acetato de etila, uma adição subsequente de sulfato de sódio e um *clean up* final por GPC ou florisil. Este procedimento aumenta não somente a extração de compostos polares em

comparação ao método de Luke, mas, extrai também os interferentes mais polares da matriz (KRIJGSMAN & van de KAMP, 1976). O método acetato de etila foi testado em 1988 pelos laboratórios do *Swedish National Food Administration*, e em 1989 passaram a utilizar o método de Luke. ANDERSSON & PALSHEDEN (1991), reportaram a comparação da eficiência dos dois métodos, concluindo que ambos fornecem recuperações equivalentes para os pesticidas testados.

de KOK (1998), reportou a implementação de um método multirresíduo para determinação de 365 pesticidas em frutas e vegetais. O procedimento final de análise evoluiu nos últimos 15 anos e é baseado na extração miniaturizada do método de Luke, aplicando acetona na extração, seguida de diclorometano e éter de petróleo num procedimento sem necessidade de *clean up*. A determinação cromatográfica foi realizada com 4 sistemas de GC com detecção por ECD, NPD e ITD.

ANASTASSIADES *et al.* (2003a) publicaram um método que fornece resultados de qualidade elevada com um número mínimo de etapas e um baixo consumo de solventes e material. Este método utiliza acetonitrila para extração dos pesticidas, adição de sulfato de magnésio e cloreto de sódio que promovem uma partição líquido-líquido facilitando a remoção de componentes polares da matriz. Após a centrifugação, que fornece uma separação física perfeita das fases, o *clean up* e a remoção de água residual são executados simultaneamente utilizando a extração em fase sólida dispersiva, onde um adsorvente de amina primária secundária (PSA) e $MgSO_4$ são misturados com o extrato da amostra, que depois de agitado e centrifugado, está em condições de ser analisado por GC ou LC.

Porém, a degradação de certos pesticidas, como por exemplo folpete, captana, diclofluanida e clorotalonil, pode ocorrer durante a etapa de extração devido ao meio básico. A fim de minimizar este problema, uma etapa de tamponamento do extrato foi adicionada o que promoveu uma melhora nos resultados obtidos para aqueles pesticidas difíceis de serem analisados. O método QuEChERS com etapa de tamponamento envolve a extração com acetonitrila contendo 1% de ácido acético (v/v) e simultaneamente partição líquido-líquido promovida pela adição de acetato de sódio e $MgSO_4$, tornando-se conhecido como método QuEChERS modificado (LEHOTAY *et al.*, 2005).

A adição de 0,1% de ácido acético (v/v) em soluções de acetonitrila aumenta a estabilidade de pesticidas antes da análise. O pH é importante tanto para compostos sensíveis à degradação em meio alcalino como para aqueles pesticidas sensíveis a pH ácido. Sendo assim, é necessário que se tenha uma faixa de pH entre 4 e 5, uma vez que a mesma proporciona boas recuperações (70 a 120%). O tamponamento dos extratos na faixa de pH 4-5 é realizado pela adição de ácido acético ($pK_a = 4,75$) e acetato de sódio (MASTOVSKA & LEHOTAY, 2004).

Uma vantagem da acetonitrila na etapa de extração em relação a acetona é devido a facilidade de separação das fases com a adição dos sais ($MgSO_4$ e $NaCl$), pois fornece uma separação bem definida das fases sem diluição com solventes orgânicos apolares, bem como bons índices de recuperação. $MgSO_4$ é um agente de secagem muito eficaz, e sua hidratação é altamente exotérmica (cerca de $40\text{ }^\circ\text{C}$), mas não suficiente para volatilizar ou degradar os pesticidas, tornando a extração mais efetiva auxiliando na remoção de água (LEHOTAY, 2000; LEHOTAY *et al.*, 2001).

A etapa de SPE dispersivo utilizado no método de QuEChERS é baseada na metodologia de SPE, mas o adsorvente é adicionado diretamente ao extrato, assim o *clean up* é realizado facilmente pela agitação e pela centrifugação. Um determinado volume de extrato (1 mL) é colocado em contato com uma mistura contendo 25 mg de PSA e $MgSO_4$, ao contrário dos métodos já existentes para *clean up* com SPE que utilizam cartucho, esta mistura sólida permite que o *clean up* e a redução de água residual sejam efetuados simultaneamente. Esta etapa de remoção de água proporciona um extrato final de menor polaridade, facilitando assim a precipitação de co-extratos polares. O adsorvente retém as interferências da matriz, sendo que depois de realizada uma etapa de agitação manual e centrifugação, o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico (MARTINEZ-VIDAL *et al.*, 2006). Outros adsorventes, como, alumina-N, carbono grafitizado, octadecilsilano (C18), amino ($-NH_2$), ciano ($-CN$) e resina de troca aniônica forte (SAX, do inglês *Strong Anionic Exchange*) podem ser utilizados na etapa de *clean up* (ANASTASSIADES *et al.*, 2003a).

DÍEZ *et al.* (2006) realizaram uma comparação entre os métodos de QuEChERS que emprega acetonitrila, o método de Luke que emprega acetona, e

extração com acetato de etila, que envolve *clean up* com GPC e que é o método oficial de extração utilizado por algumas agências regulamentadoras européias; e ainda um método simples de extração com acetona foi testado para checar as diferenças com os outros métodos. Os extratos foram analisados por GC com detector por tempo de voo (TOF, do inglês *Time of Flight*) e LC-MS/MS.

Extratos mais limpos foram obtidos no método de QuEChERS devido aos interferentes menos lipofílicos isolados pela acetonitrila em comparação com a acetona e o acetato de etila, a adição de NaCl na etapa de partição controlou a quantidade de componentes extraídos da matriz, e também, a retenção de ácidos graxos e de outros ácidos orgânicos durante a etapa de *clean up* com PSA. PSA é um adsorvente de troca aniônica fraco, com a habilidade de remover ácidos graxos, açúcares e outros co-extratos da matriz que formam pontes de hidrogênio (MASTOVSKA & LEHOTAY, 2004).

O acetato de etila extraiu interferentes mais polares da matriz, entretanto, a inclusão de uma etapa eficiente de *clean up* por GPC forneceu extratos mais limpos. A extração com acetona, diclorometano e éter de petróleo no método de Luke, foi relatada como a mais seletiva, diminuindo a quantidade de interferentes polares.

O método mini-Luke, mostrou-se mais eficiente para a extração de compostos mais apolares e medianamente polares, enquanto as melhores recuperações para compostos polares foram obtidas pelo método de QuEChERS e pelo método de acetato de etila. QuEChERS foi o único método que apresentou recuperações entre 60 e 70% para todos os compostos, com algumas exceções devido a interferentes da matriz. O *clean up* por SPE dispersivo foi eficiente e não difere muito dos extratos do acetato de etila (DÍEZ *et al.*, 2006).

HIEMSTRA e de KOK (2007), do grupo de análises de pesticidas do *Food and Consumer Product Safety Authority* na Holanda, utilizam desde 1980 o método de extração com acetona, baseado no método de Luke, mas sem a adição de cloreto de sódio na etapa de partição. A acetona e a água presentes na matriz da amostra levam a formação de uma única fase na etapa de extração, os co-solventes apolares como o diclorometano e o éter de petróleo, levam a uma separação bem definida das fases. Este método da extração é considerado o mais rápido atualmente em laboratórios de rotina da análise de pesticidas, pois,

resulta em boas recuperações para uma ampla faixa de pesticidas e matrizes. As principais vantagens deste método de extração, são sua velocidade, os extratos relativamente limpos, mesmo que nenhum *clean up* seja aplicado, e a compatibilidade com a detecção seletiva dos espectrômetros de massas. A única desvantagem do método de extração são as recuperações relativamente baixas para os pesticidas polares, como metamidofós, ometoato, monocrotofós e outros.

Em 1990, o mesmo grupo desenvolveu um método de extração alternativo, também baseado no método de Luke, mas adicionando sulfato de sódio à amostra antes da etapa de extração, com o objetivo de melhorar a extração e obter maiores recuperações para os compostos mais polares (HIEMSTRA & de KOK, 2007).

PENGYAN *et al.* (2006), desenvolveram um método multirresíduo para determinar diferentes classes de pesticidas em arroz. Os solventes testados para a etapa de extração foram, diclorometano, triclorometano, acetonitrila, acetato de etila e hexano-acetona. O solvente que mostrou melhor eficiência na extração foi o diclorometano. Na etapa de *clean up* foi utilizado florisil e uma mistura de hexano-acetona como eluente. A amostra foi analisada por GC-MS no modo íon seletivo (SIM, do inglês *Single Ion Monitoring*).

Um método analítico para determinação de 130 pesticidas em pepino utilizando GC-MS/MS, foi desenvolvido por Vidal e colaboradores. O procedimento envolve duas etapas: extração com acetato de etila e filtração em cartucho contendo sulfato de sódio. Após evaporação, o resíduo foi redissolvido em cicloexano. A confirmação dos pesticidas foi baseado na comparação da razão das intensidades do íon precursor na amostra, com o padrão na matriz. A quantificação dos pesticidas identificados foi realizada pelo método de adição padrão, com o objetivo de eliminar o efeito matriz. A utilização de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo, possui vantagens como, um maior número de analitos por segmento, e com isto um menor tempo de análise, quando comparado com *Ion Trap* (MARTINEZ VIDAL *et al.*, 2006).

A determinação de 102 pesticidas em alho-poró foi descrita por SHULING. O preparo da amostra inclui extração com acetona e diclorometano, necessitando de *clean up* por GPC e SPE. Na etapa de extração foi adicionado cloreto de sódio, para melhorar a extração de compostos hidrofóbicos. GPC foi necessária para

remover pigmentos como a clorofila e alguns interferentes de alto peso molecular. A determinação dos analitos foi realizada por GC-MS, utilizando ionização por impacto de elétrons (EI, do inglês *Electron Impact Ionization*) e analisador quadrupolo no modo SIM (SHULING *et al.*, 2007).

STAJNBAHER & KRALJ (2003) determinaram 90 pesticidas em frutas e vegetais. O método envolve extração com acetona e SPE na etapa de *clean up*. A quantificação foi realizada por GC-MS operado no modo SIM. A acetona foi selecionada para extração devido a sua efetividade na extração dos pesticidas polares e apolares em diversas matrizes, e além disso, apresenta a vantagem de ser barata e de baixa toxicidade. *Clean up* foi realizado com colunas de poliestireno divinilbenzeno seguido por coluna de dietilaminopropil, e mostraram-se eficientes para remover interferentes como ácidos orgânicos e açúcares.

LEANDRO *et al.* (2005) utilizaram GC-MS/MS para determinar 12 pesticidas em alimentos para bebê. A etapa de extração é baseada no método de QuEChERS, que envolve extração com acetonitrila, adição de MgSO₄ e NaCl, seguido de uma etapa de *clean up* com SPE dispersivo utilizando C18 e PSA. Um sistema combinado de injeção de grande volume (LVI, do inglês *Large Volume Injection*) e vaporização com temperatura programada (PTV, do inglês *Programmable Temperature Vaporizing*) foram empregados para melhorar os limites de detecção.

CHU *et al.* (2005), desenvolveram um método macro de dispersão da matriz em fase sólida para a extração de 226 pesticidas em suco de maçã. Para a extração, 10 g de amostra foram misturados a 20 g de terra diatomácea, a eluição dos pesticidas foi realizada com 160 mL de hexano-diclorometano. Os compostos foram divididos em três grupos e analisados por GC-MS com ionização química (CI, do inglês *Chemical Ionization*), operado no modo SIM. Tipicamente, MSPD emprega pequenas quantidades de amostra que variam de 0,5 a 1 g. Mas, com o objetivo de obter baixos limites de detecção em resposta dos baixos LMRs estabelecidos, neste trabalho empregou-se 10 g de amostra, utilizando também maior quantidade de adsorvente, 20 g, onde tradicionalmente se emprega 1 ou 2 g. O volume de solvente para eluir os compostos, também é maior que o usual, mas apesar disso, o método desenvolvido apresenta vantagens como a determinação de 226 pesticidas em no máximo 1 h.

Um método multirresíduo empregando SPE, quantificação por GC-MS e LC-MS/MS foi desenvolvido para a determinação de 450 pesticidas em suco de frutas, vinho e mel. As amostras foram diluídas com porções de água e acetona, e após extraídas com diclorometano. Após etapa de *clean up* utilizando carbono grafitizado e cartuchos de aminopropil, os pesticidas foram eluídos com mistura de acetonitrila e tolueno, sendo que o eluato foi concentrado e reconstituído em hexano para os pesticidas que foram analisados por GC-MS e em metanol quando estes foram analisados por LC-MS/MS (PANG, 2006b).

PANG *et al.* (2006a), desenvolveram um novo método para a análise de 660 pesticidas em carne bovina, suína, de frango e coelho, empregando *clean up* utilizando GPC seguido de análise por GC-MS e LC-MS/MS, empregando monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*). O procedimento de extração deste método estava baseado na homogeneização de 10 g de amostra com 20 g de sulfato de sódio, seguido da adição de 35 mL de uma mistura de ciclohexano e acetato de etila (1:1), homogeneização, centrifugação e filtração. Após etapa de centrifugação, o equivalente a 5 g de amostra foi injetado na coluna de GPC, empregando uma mistura 1:1 de ciclohexano e acetato de etila, na vazão de 5 mL min⁻¹, como fase móvel. Alíquotas foram coletadas entre 22 e 40 min e posteriormente analisadas. Para a determinação de 368 pesticidas empregando GC-MS, estas alíquotas provenientes do sistema de GPC foram concentradas até o volume de 0,5 mL. Por outro lado, para os 66 pesticidas analisados por LC-MS/MS, estas alíquotas foram evaporadas sob fluxo de N₂ e ressuspendidas em uma mistura de acetonitrila e água (60:40).

A presença de interferências da matriz nos extratos pode afetar adversamente a quantificação e a identificação do analito. O *clean up* é uma etapa necessária, a fim de se reduzir os limites de detecção dos métodos e evitar interferências da matriz. Várias etapas de *clean up* sucessivas podem resultar na perda parcial de alguns compostos assim como aumento de trabalho e custo, do mesmo modo, um *clean up* inadequado pode também conduzir à efeitos adversos relacionados à qualidade dos dados gerados, tais como mascarar os picos do pesticida em estudo por componentes que co-eluem da matriz, gerando a

ocorrência de falsos positivos e quantificação incorreta (STAJNBAHER & KRALJ, 2003).

Uma das técnicas de *clean up* mais empregada é a técnica de GPC, utilizada primeiramente em 1972 por Tindle e Stalling (TINDLE & STALLING, 1972). Desde então GPC tornou-se a técnica de *clean up* universal para separar pesticidas de compostos com elevada massa molecular, como lipídios, ceras, pigmentos e outros interferentes apolares de baixa volatilidade, purificando extratos para análise por GC ou por LC, abrangendo uma ampla faixa de compostos (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005a).

A remoção de compostos poucos voláteis da matriz, reduz o acúmulo de interferentes no sistema de injeção do cromatógrafo a gás, que contribui para evitar a deterioração e desempenho do instrumento (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005b).

O volume de eluentes orgânicos foi consideravelmente reduzido nos últimos anos, devido a miniaturização (STAN, 2000). Atualmente, muitos laboratórios empregam colunas miniaturizadas, que possuem diâmetro interno (d.i.) menores que 10 mm, onde o consumo de solvente é bastante reduzido (MASTOVSKA *et al.*, 2001).

A etapa de *clean up* da amostra pode ser realizada ainda por partição líquido-líquido, SPE e MSPD (STAJNBAHER & KRALJ, 2003).

2.8.2 Determinação Cromatográfica na Análise Multirresíduo

O fantástico desenvolvimento da espectrometria de massas nos últimos 30 anos, ampliou a utilização desta técnica em vários campos da química. A Espectrometria de Massas é baseada na produção de íons, análise das razões massa/carga (m/z) e detecção. Em nível instrumental, 3 componentes são essenciais: a fonte de íons; o analisador de massas e o detector. A performance de cada um destes componentes, reflete na qualidade dos dados quali e quantitativos (LAVAGNINI *et al.*, 2006).

A produção de íons é um fenômeno que afeta amplamente os dados obtidos. A escolha do modo de ionização a ser empregado é definido pelas propriedades físico-químicas dos analitos de interesse como: volatilidade, peso molecular,

termolabilidade e complexidade da matriz. Os modos de ionização empregados em GC-MS são: ionização por impacto de elétrons e ionização química (LAVAGNINI *et al.*, 2006).

Atualmente pode-se discutir que a quantificação do analito é sem sentido sem a confirmação de sua identidade. Tradicionalmente, para a confirmação de resultados positivos em análise de resíduo de pesticidas, diferentes técnicas são adotadas, como GC com dois detectores diferentes, duas colunas de diferentes polaridades ou a combinação de duas técnicas cromatográficas. No entanto, estas técnicas clássicas de confirmação não fornecem a informação estrutural suficiente sobre o analito. De acordo com as recentes normas divulgadas na Comunidade Européia e Estados Unidos, a informação estrutural necessária para a confirmação do analito, somente é possível aplicando-se técnicas espectrométricas. A combinação de GC com MS, tornou-se a ferramenta principal de confirmação para análise de resíduos de contaminantes (SOBOLEVA *et al.*, 2004).

Na técnica de Espectrometria de Massas, o modo SIM têm sido o modo utilizado na análise de resíduos de pesticidas, fornecendo seletividade e sensibilidade requeridos. Atualmente instrumentos por tempo de voo fornecem possibilidades adicionais (SOBOLEVA *et al.*, 2004).

Há determinados pontos que são comuns nos documentos oficiais que tratam dos critérios de confirmação, como por exemplo: a determinação do tempo de retenção relativo e seleção dos íons para cada analito. As diretrizes para monitoramento de pesticidas na União Européia, estabelece uma exigência mínima de três íons de razão massa/carga >100 ou dois íons de razão massa/carga >200 . Outras exigências na seleção do íon no modo SIM, incluem preferencialmente o íon molecular, ou íons com intensidades maiores que 30% (SOBOLEVA *et al.*, 2004).

Na análise multirresíduo, onde a identificação de mais de 250 compostos com diferentes propriedades é comum, alguns critérios são difíceis ou impossíveis de se aplicar, devido a diversas razões práticas. Um dos problemas é a falta de um número suficiente de íons com a abundância exigida nos espectros de massa de alguns pesticidas. Por exemplo, os espectros dos compostos bitertanol e etoxicloro no modo de ionização por EI, que fornecem íons com abundância de

apenas 10% do pico base, não podem ser utilizados para propósitos de quantificação devido à alta incerteza da medida (SOBOLEVA *et al.*, 2004).

Geralmente o íon mais abundante (pico base) é utilizado para a quantificação e utilizado para estabelecer o limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*). No entanto, a intensidade dos íons para a confirmação de muitos pesticidas, é muitas vezes abaixo de 20 ou 30% do pico base, e conseqüentemente aumenta o valor do LOQ em 3 a 5 vezes (SOBOLEVA *et al.*, 2004).

A Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas é considerada uma técnica versátil e sensível para monitorar os baixos níveis de pesticidas em alimentos. A detecção por MS, fornece informações sobre a estrutura molecular do composto, podendo ser empregada como detector universal quando utilizado no modo *full scan*, ou como técnica altamente seletiva e sensível no modo de monitoramento de íon seletivo (TADEO *et al.*, 2000).

No modo *full scan*, o analisador de massas monitora uma faixa ampla de razões *m/z*. No modo SIM, o analisador monitora somente poucos íons que são característicos de cada composto. Este modo é significativamente mais sensível que o modo *full scan*, mas somente fornece informações sobre os íons monitorados, podendo-se perder informações adicionais para a identificação do composto. Já o modo *full scan* é utilizado para análises quali e quanti, onde a informação espectral completa é considerada importante (TAHBOUB *et al.*, 2005), embora, a confiança na confirmação da identidade possa ser reduzida se um ou mais íons selecionados forem afetados por interferências da matriz (PATEL *et al.*, 2005).

Detectar um certo número de pesticidas, requer tipicamente o uso de técnicas analíticas de separação como: a Cromatografia Gasosa com Detecção como Captura de Elétrons (ECD), Detecção Fotométrica de Chama (FPD), e Detecção de Nitrogênio-Fósforo (NPD). Em nenhum caso, o uso destes sistemas de detecção encontram os critérios de identificação necessárias, além de todos eles estarem sujeitos à interferências da matriz. A espectrometria de massas tornou-se muito popular em laboratórios de análise de resíduos de pesticidas. A combinação de GC com MS *tandem* (MS-MS) é amplamente utilizada na análise de quantidades de traços de contaminantes como pesticidas e seus metabólitos

em amostras complexas como, líquidos biológicos, águas, frutas, vegetais e cereais (MARTINEZ VIDAL *et al.*, 2002).

Uma análise multirresíduo completa inclui a determinação e a confirmação, e para isto a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas ganhou popularidade nos últimos anos, pois oferece a confirmação e a quantificação simultâneas de um grande número de pesticidas. A limitação principal encontra-se na sensibilidade relativamente baixa obtida para muitos pesticidas no modo *full scan* ou quando o modo de ionização por impacto de elétrons é selecionado. A introdução do detector de aprisionamento de íons realçou os LODs mas a presença de componentes da matriz nas amostras ainda interfere nos resultados da análise, conduzindo à uma detecção falso/negativa ou falso/positiva. Para superar estas dificuldades, é de interesse ter técnicas mais seletivas a fim de satisfazer a todas as exigências dos órgãos regulamentadores. Neste sentido, as modalidades de operação como, monitoramento de íon seletivo, ionização química e MS-MS fornecem um alto grau de confiança nos resultados, devido a qualidade de informação obtida (HERNANDO *et al.*, 2001).

A Espectrometria de Massas *tandem* mostra uma sensibilidade e uma seletividade superior em níveis de traços em matrizes complexas. Embora não seja uma técnica nova, sua aplicação em análises de rotina é limitada devido ao alto custo do instrumento e a necessidade de analistas treinados. Esta técnica promove uma eliminação de interferências de *background*, aumentando assim, a razão sinal/ruído e também a sensibilidade, simultaneamente a confirmação dos pesticidas é obtida com elevado grau de certeza, devido ao espectro de massas muito característico do íon produto. Este espectro é específico para cada composto e não possui influência dos íons interferentes da matriz, pois são excluídos durante a seleção do íon (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

O GC acoplado ao detector triplo quadrupolo é uma estratégia alternativa para a determinação rápida de analitos em baixas concentrações. O analisador triplo quadrupolo pode analisar um maior número de pesticidas co-eluentes, se for operado no modo SIM, pois monitora somente alguns produtos de íons selecionados por analito. A ausência de varredura (*full scan*) permite que o instrumento seja focado no íon precursor e no fragmento por tempos mais longos, aumentando a sensibilidade (FRENICH *et al.*, 2005).

A cromatografia gasosa é muito utilizada devido a sua potencialidade de determinar diversos pesticidas em uma única análise. As vantagens de sua combinação com a espectrometria de massas são, a quantificação e a confirmação de baixas concentrações de pesticidas em extratos complexos, podendo ser realizadas em uma única etapa em com um nível elevado de confiança. Por esta razão diversos métodos empregando GC-MS têm sido propostos para analisar resíduos de pesticidas em vegetais e frutas. Alguns autores recomendam o uso do modo *full scan*, mas este modo de aquisição possui determinadas limitações com relação a sensibilidade quando baixas concentrações do analito devem ser determinadas na presença de altas concentrações de interferentes da matriz. O aumento da seletividade e conseqüentemente um aumento na sensibilidade é realizado utilizando o monitoramento de íon seletivo. Este modo de discriminação entre o analito e os sinais interferentes, reduz os limites de detecção e de quantificação do método (ARREBOLA *et al.*, 2003).

Atualmente, MS-MS têm sido proposto para analisar 50-60 pesticidas em uma única injeção, ou 80-100 pesticidas em duas injeções diferentes. Nesta última opção, os autores recomendam aplicar o modo de ionização por impacto de elétrons e ionização química em duas corridas diferentes, com o objetivo de otimizar a ionização para cada pesticida. Este modo de operação, apresenta as desvantagens de aumentar consideravelmente o tempo total necessário por amostra (GAMÓN *et al.*, 2001).

HERNANDO *et al.* (2001) desenvolveram um método cromatográfico que combina MS/MS e ionização química, para a determinação de pesticidas em vegetais. A facilidade do sistema em mudar o modo de ionização de positiva para negativa durante a análise permite condições mais sensíveis que podem ser selecionadas para cada composto. Uma maior seletividade é obtida com a ionização química, e a baixa fragmentação observada nos espectros resulta numa maior abundância do pico base, que é o íon selecionado como íon precursor para as demais fragmentações por MS/MS.

Com o objetivo de obter a máxima sensibilidade para cada composto, todos os compostos foram analisados por CI modo positivo (PCI, do inglês *Positive Chemical Ionization*) e negativo (NCI, do inglês *Negative Chemical Ionization*),

utilizando metano como gás reagente. A melhor sensibilidade para a maioria dos compostos foi obtida por NCI, deste modo o analisador de massas ITD, foi programado para alterar os modos de ionização durante a análise, demonstrando assim a versatilidade deste analisador.

PATEL *et al.* (2005) analisaram 19 pesticidas organoclorados em amostras gordurosas por GC-MS/MS. No modo de ionização por impacto de elétrons, alguns pesticidas como lindano e DDT, demonstraram alta razão sinal/ruído. Baseado no perfil dos compostos, o modo de aquisição foi dividido em vários segmentos, para obter o máximo de sinal para os pesticidas de baixa resposta. O número de transições foi restrito (2 a 4 transições), para manter a adequada sensibilidade para as baixas concentrações de interesse.

AGÜERA *et al.* (2002) analisaram 55 organofosforados, organoclorados e piretróides em amostras de vegetais. A quantificação e a identificação foi realizada por GC-MS/MS, utilizando dois modos de ionização, impacto de elétrons e ionização química positiva. Na otimização das condições de operação do detector, dois aspectos foram considerados: a seleção do modo de ionização e a otimização dos parâmetros do MS/MS. A maioria dos compostos apresentou boa resposta por EI, com exceção dos compostos mais polares que mostraram melhor performance em PCI. Os espectros obtidos para estes compostos, exibem poucas fragmentações, obtendo altos valores de razão massa/carga para o pico base, que é o mais adequado a ser selecionado como íon precursor para as demais fragmentações.

MARTINEZ VIDAL *et al.* (2002) propuseram um novo método analítico para determinar 81 pesticidas em vegetais. O espectrômetro de massas foi programado para operar nos modos CI e EI, com o objetivo de determinar cada pesticida no melhor modo de ionização. Os pesticidas que eluíram nos primeiros 13 minutos, apresentaram melhor sensibilidade no modo CI, enquanto que os demais foram analisados no modo EI.

2.9 Efeito matriz em GC

A complexidade das amostras e o número de compostos que co-eluem acabam gerando um problema durante a análise, o efeito matriz. O efeito matriz é um ponto crítico na análise de pesticidas por GC, e depende de vários fatores como: o analito em si, o tipo de matriz e a relação da concentração do analito na matriz. Este efeito pode ser notado pela significativa diferença de resposta obtida em padrões preparados no solvente daqueles preparados no extrato da matriz. Uma das maneiras de minimizar e/ou eliminar este efeito é reduzir a quantidade de componentes da matriz que co-eluem com os analitos no detector, para isto, métodos de extração mais seletivos e etapas mais extensivas de *clean up* devem ser desenvolvidos (PICÓ *et al.*, 2004; TEKEL *et al.*, 2001).

A presença de componentes da matriz, pode levar a uma quantificação inexata, pois podem ocorrer mascaramentos dos picos, gerando assim, falsos positivos. A comparação entre as curvas analíticas preparadas em solvente e no extrato da matriz deve ser avaliada, pois a presença de sítios ativos no insersor do injetor, pode adsorver ou induzir degradação térmica de alguns pesticidas na ausência de componentes da matriz (SCHENCK & LEHOTAY, 2000).

Quando a matriz está presente na solução, seus componentes bloqueiam estes sítios ativos, aumentando assim a eficiência e resultados mais exatos serão obtidos (KIRCHNER *et al.*, 2005).

Entre as diversas maneiras utilizadas para compensar o efeito matriz em GC, podemos citar: 1) uso do método da adição padrão; 2) uso de padrão interno deuterado; 3) preparo das soluções analíticas no extrato da matriz (*matrix matched standards*); 4) uso de analitos protetores, entre outras alternativas (TOMAS *et al.*, 2005).

Os analitos protetores são compostos que interagem fortemente com os sítios ativos do sistema cromatográfico, ocorrendo com isso diminuição da degradação e/ou adsorção dos analitos de interesse, sendo portanto, a solução mais conveniente para os problemas ocasionados pelo efeito matriz na análise de resíduos de pesticidas. A adição destes compostos nas soluções analíticas preparadas tanto no extrato da matriz como no solvente, faz com que ocorra um aumento da resposta em ambas as soluções minimizando as perdas dos analitos

de interesse, além de proporcionar baixos limites de detecção (TOMAS *et al.*, 2005).

O objetivo de se adicionar analitos protetores, é promover uma melhor resposta dos analitos nas soluções padrões preparadas em solvente, tornando deste modo a preparação da curva de calibração mais fácil e menos laborosa, comparada aos padrões preparados no extrato da matriz (KIRCHNER *et al.*, 2007).

ANASTASSIADES *et al.* (2003b) avaliaram mais de 90 compostos a fim de, encontrar um agente que poderia mascarar os sítios ativos no sistema GC. Três compostos foram selecionados como melhores analitos protetores: etilglicerol, sorbitol e gulonolactona.

No estudo do desenvolvimento do método de QuEChERS, ANASTASSIADES *et al.* (2003a) observaram que o efeito matriz foi significativamente reduzido após a etapa de SPE dispersivo utilizando PSA, concluindo que certos tipos de compostos protegeram os analitos das interações com a matriz quando adicionados à solução. PSA contém grupos amino primários e secundários, possuindo assim a facilidade de interagir através das pontes de hidrogênio (e das interações iônicas). Portanto, um agente protetor eficaz deve conseqüentemente necessitar grupos hidroxil e/ou amino múltiplos, para poder interagir com os sítios ativos.

As características práticas de um agente protetor ideal para finalidades específicas e gerais incluem: (a) deve ser inerte com o analito na solução ou no sistema GC e não induzir a degradação; (b) não deve afetar o desempenho da coluna ou do detector; (c) não deve interferir na detecção (assim deve ter uma intensidade baixa e íons de massa pequena em seus espectros de massas); (d) não deve acumular no injetor do GC ou em outra parte no sistema; (e) deve ser disponível, barato, e atóxico (f) deve ser solúvel no solvente de interesse (ANASTASSIADES *et al.*, 2003b).

Injeções *on-column* seriam uma alternativa para minimizar este efeito, mas esta técnica levaria a uma maior manutenção da coluna e seria impraticável para aplicações de rotina com matrizes complexas. A injeção por vaporização de temperatura programável é outra alternativa, mas esta envolve o uso de um

insersor como nas técnicas clássicas de injeção. Estas técnicas da injeção reduzem somente o efeito e não o eliminam (WYLIE & UCHIYAMA, 1996).

O *clean up* extensivo dos extratos é uma alternativa na teoria para eliminar os componentes da matriz que causam o efeito, mas é na prática, incapaz de remover todos os interferentes devido à ampla escala da polaridade dos analitos em métodos multirresíduos (SCHENCK & LEHOTAY, 2000).

Uma vez que os efeitos da matriz não podem ser eliminados, uma alternativa de evitar seus problemas é compensar este efeito. O uso de padrões internos deuteros para cada pesticida suscetível ao efeito resolveria o problema, mas tais padrões não estão geralmente disponíveis, além de serem caros. Atualmente, é praticamente consenso entre muitos laboratórios, que as soluções analíticas dos pesticidas devem ser preparadas em extrato da matriz ao invés de em solventes puros, a menos que tenha sido provada a insignificância do efeito matriz, que pode ser observado através da análise da intensidade dos picos obtidos a partir da injeção destas soluções. Este procedimento é bastante eficiente, mas as desvantagens incluem: necessita de uma grande quantidade de matriz “branco” (idealmente a mesma que as amostras), seu armazenamento a longo prazo, dificuldade de se encontrar amostras “branco”, sem a presença de pesticidas e trabalho extra para preparar os extratos branco para padrões da curva analítica. Isto resulta também numa quantidade maior de material da matriz injetada na coluna e em conseqüência conduz a uma manutenção mais rotineira do sistema GC (ANASTASSIADES *et al.*, 2003b).

Outra maneira de minimizar os problemas são o uso da técnica denominada Introdução Direta da Amostra (DSI, do inglês *Direct Sample Introduction*) a qual está disponível comercialmente numa versão automatizada denominada Introdução de Amostras Complexas (DMI, do inglês *Difficult Matrix Introduction*). Esta técnica está fundamentada na adição de 30 µL de extrato em um *microvial* e este é colocado dentro do insersor do GC, após evaporação do solvente, a temperaturas relativamente baixas, o injetor é aquecido gradualmente até que ocorra a volatilização dos analitos de interesse. Sendo assim, somente os compostos que estão numa determinada faixa de volatilização são direcionados para a coluna. No sistema DMI, a cada injeção o insersor deve ser removido para que um novo *microvial* seja recolocado. Entre as vantagens da utilização desta

técnica estão: 1) redução no número de manutenções do sistema, uma vez que a contaminação por componentes não voláteis da matriz é quase inexistente e 2) redução do número das etapas de *clean up* nas amostras. Porém, a não-realização da etapa de *clean up*, permite que uma quantidade de componentes semi-voláteis da matriz seja injetada no sistema, podendo interferir na detecção dos analitos. Assim, os sistemas de detecção devem utilizar MS ou MS/MS, uma vez que fornecem resultados da quantificação de resíduos de pesticidas, com bastante exatidão (TOMAS *et al.*, 2005).

Independentemente do procedimento escolhido para minimizar o efeito matriz, a seleção dos íons para quantificação deve ser realizada de forma criteriosa, pois estes mesmos íons podem estar presentes na matriz, o que levaria a grandes erros na quantificação e identificação de um composto. Geralmente para a quantificação, emprega-se os íons mais abundantes, desde que estes não estejam presentes na matriz, e que, apresentem melhor razão sinal/ruído. Os íons selecionados, devem apresentar altos valores de massa, de modo a evitar interferências de baixas razões massa/carga (AGÜERA *et al.*, 2002).

2.10 Validação de Métodos Analíticos

A validação de um procedimento analítico consiste na avaliação da capacidade do processo analítico em produzir resultados confiáveis e adequados com à qualidade pretendida, sendo compatíveis com a precisão e exatidão, consideradas, na prática, como satisfatórias. A variabilidade associada a um método analítico deve levar em consideração todas as incertezas do processo analítico, incluindo àquelas atribuídas aos equipamentos, padrões, calibrações, analista e ambiente, ou seja, se um método existente for modificado, ou um método totalmente novo for desenvolvido, deve-se assegurar de que as características de desempenho do método atendam aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (INMETRO, 2003; ZANELLA *et al.*, 2000).

Na área de análise de resíduos de pesticidas, o desenvolvimento de métodos analíticos constitui-se de uma etapa muito importante, onde a

investigação deve sempre incluir a validação do método desenvolvido e não apenas sua otimização.

Do ponto de vista prático, pode-se dizer que um método, após ser selecionado e desenvolvido, deve ser submetido ao processo de avaliação que estime sua eficiência e mérito. Um método será considerado validado se suas características estiverem em conformidade com os pré-requisitos exigidos por literaturas de referência na área. Desta forma, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, tais como: procedimento de amostragem, preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e avaliação dos dados (FEINBERG & RAGUÉNÉS, 1999).

Os parâmetros, geralmente, envolvidos no procedimento de validação de métodos analíticos são: curva analítica e linearidade, seletividade, limite de detecção e limite de quantificação, exatidão e precisão (ZANELLA *et al.*, 2000).

2.10.1 Curva analítica

A linearidade de um método analítico pode ser definida como sendo a facilidade deste método em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma determinada faixa de concentração (INMETRO, 2003).

Na prática, a linearidade é determinada através das chamadas curvas analíticas, que são gráficos de calibração que relacionam a resposta do equipamento em função das diferentes concentrações do analito (LANÇAS, 2004).

A variável independente (eixo horizontal ou x) relaciona-se às várias concentrações preparadas do padrão analítico da substância de interesse, e a variável dependente (eixo vertical ou y) relaciona o sinal analítico obtido para cada concentração do padrão. Essa relação produz uma equação de regressão linear $y = ax + b$, que relaciona as duas variáveis x e y. Essa equação é válida para um intervalo determinado de concentração do analito, independente da técnica instrumental utilizada. O coeficiente angular **a**, expressa a inclinação do gráfico em relação aos eixos, enquanto que o coeficiente linear **b** expressa a interseção do gráfico com os eixos (RIBANI *et al.*, 2004; LANÇAS, 2004).

O número mínimo de pontos geralmente aceito nos gráficos de calibração varia entre 5 e 6 pontos (CHASIN *et al.*, 1998), ou mais do que 6 (INMETRO; 2003). Essas concentrações devem ser escolhidas de forma a cobrir uma faixa de 50 a 150% do valor que se espera encontrar na amostra de estudo (LANÇAS, 2004), ou seja, a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho (INMETRO, 2003).

Também é possível calcular o coeficiente de correlação r ou o coeficiente de determinação r^2 , que pode ser utilizado para estimar a qualidade da curva analítica uma vez que demonstra uma menor variação dos dados obtidos quanto mais próximo de 1 (RIBANI *et al.*, 2004). Valores de r iguais ou superiores a 0,99 e 0,90, são recomendados, respectivamente, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003a) e pelo Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2003) enquanto que valores de r^2 iguais ou maiores que 0,999 são descritos por PIMENTEL & NETO (1996).

A faixa linear de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições específicas do ensaio. A faixa linear é definida como sendo a faixa de concentração na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico (INMETRO, 2003).

2.10.2 Exatidão

É uma medida da concordância existente entre os dados obtidos em uma determinada medida e um valor de referência assumido como sendo o verdadeiro (RIBANI *et al.*, 2004). É geralmente, determinada por intermédio do uso de uma amostra certificada cuja concentração do analito de interesse é conhecida (LANÇAS, 2004).

Na indisponibilidade de material de referência certificado, a exatidão pode ser avaliada através dos ensaios de fortificação e recuperação (CODEX

ALIMENTARIUS, 2001), onde é realizada a adição de uma quantidade conhecida de um padrão certificado do analito de interesse à matriz, após a etapa de extração e análise instrumental, a resposta é comparada com aquela dada pela análise do padrão de referência, dissolvido em um solvente puro (LANÇAS, 2004). A exatidão geralmente expressa em percentual, podendo esta ser calculada através da Equação 1.

$$R\% = \frac{C_1 - C_2}{C_3} 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração usada para fortificação.

A exatidão representa a existência de erros sistemáticos, que provocam desvios ou tendências nos resultados. Erros sistemáticos típicos na exatidão de resultados analíticos provêm de equipamentos não calibrados ou aferidos; interferentes na amostra; baixa recuperação na extração; medidas volumétricas incorretas; seringas contaminadas, etc (LANÇAS, 2004). Deste modo, pode-se dizer que a exatidão é um dos critérios mais importantes para o julgamento do desempenho de um método analítico (PRIMEL, 2003).

Em geral, são aceitos intervalos de recuperação entre 70 e 120%, com precisão de até 20% para validação de métodos analíticos para análise de resíduos de pesticidas em alimentos (SANCO, 2007).

2.10.3 Precisão

É o termo geral utilizado para avaliar a dispersão dos resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou

soluções analíticas de referência, analisadas em condições definidas (INMETRO, 2003).

A precisão é expressa como a porcentagem do coeficiente de variação ou desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) de uma série de medidas, e pode ser calculada através da Equação 2.

$$RSD \% = \frac{s}{x_m} \cdot 100 \quad \text{Equação 2}$$

onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto = $\{\sum(x_i - x_m)^2 / N - 1\}^{1/2}$;

x_i = valores individuais; x_m = média das medidas em replicatas;

N = número de medidas.

Para métodos empregados em determinações ao nível de traços, valores de RSD de até 20% são aceitáveis (MELOAN, 1996; SANCO 2007). Para análise de resíduos, o limite aceito pelo roteiro de validação de métodos cromatográficos aplicados a pesticidas (GARP, 1999), estabelece como precisão valores de RSD que devem ser $\leq 15\%$.

A precisão pode ser determinada em termos de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (RIBANI *et al.*, 2004).

Repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, ou seja, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento, mesmo local, repetições em um curto intervalo de tempo. A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações é, também denominada precisão intra-ensaio, e pode ser expressa através da estimativa RSD (RIBANI *et al.*, 2004).

Precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes tempos. Esta

medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável de usar. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (INMETRO, 2003; CHASIN *et al.*, 1998).

Reprodutibilidade indica o grau de concordância dos resultados de testes obtidos para análise de uma mesma amostra usando o mesmo método, porém em diferentes laboratórios, por diferentes operadores ou empregando diferentes equipamentos (INMETRO, 2003; CHASIN *et al.*, 1998).

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

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, como por exemplo análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado ou quantificado pelo método (INMETRO, 2003).

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 (LANÇAS, 2004). Ambos são geralmente expressos em unidades de concentração (CHASIN *et al.*, 1998, MELOAN, 1996).

Há várias maneiras de se calcular a estimativa do valor do LOD, como através do método visual, método da relação sinal/ruído e aquele baseado em parâmetros da curva analítica.

Nesse estudo, a maneira utilizada para a obtenção da estimativa do LOD e do LOQ, tanto do instrumento como do método, está descrita no item 3.12.2.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu na otimização e validação do Método QuEChERS modificado para a extração de pesticidas em grãos de trigo, farinha e farelo, e avaliação da degradação dos pesticidas durante o preparo do pão. A quantificação dos pesticidas foi realizada por GC-MS, onde avaliou-se o melhor modo de ionização química e voltagens a serem aplicadas.

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

3.1 Instrumentação

- ⇒ Sistema GC-MS: Cromatógrafo a gás CP 3800 (Varian, EUA) equipado com:
 - Amostrador automático CP 8400 (Varian, EUA);
 - Injetor 1079, com insersor de vidro silanizado, d.i. de 3,4 mm, contendo cerca de 0,5 cm de carbofrita;
 - Coluna capilar CP VF-5-MS (5% fenil 95% metilpolisiloxano), de sílica fundida, 30 m de comprimento, 0,25 mm de d.i. e 0,25 μm de espessura de filme (Varian, EUA);
 - Detector MS Triplo Quadrupolo 1200, atuando no modo SIM (Varian, EUA);
 - Sistema de aquisição de dados através do *software MS Workstation 6.4* (Varian, EUA);
- ⇒ Sistema de purificação de água Milli-Q[®] - resistividade 18,2 M Ω cm MilliPore[®] (Molsheim, França);
- ⇒ Balança analítica de precisão com 4 casas decimais HR-120 (A & D Company, Japão);
- ⇒ Centrífuga Jouan C 412 (Saint-Herblain, França);
- ⇒ Mixer (SHG, Alemanha);
- ⇒ Panificadora Multi Pan (Britânia, Brasil).

3.2 Gases

- ⇒ Hélio 99,999% de pureza (Air Products, Brasil) (gás de arraste do cromatógrafo a gás);
- ⇒ Ar sintético 99,9% de pureza (Air Products, Brasil) (para o amostrador automático);
- ⇒ Metano 99,9995% de pureza (AGA, Brasil) (para ionização química no GC-MS).

3.3 Materiais

- ⇒ Seringas de volumes de 50, 100, e 1000 μ L (Hamilton, Suíça);
- ⇒ Tubos de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha).

3.4 Solventes e Reagentes

- ⇒ Tolueno, grau pesticida (Mallinckrodt, EUA);
- ⇒ Isooctano (2,2,4-trimetilpentano), grau pesticida (Mallinckrodt, EUA);
- ⇒ Acetonitrila, grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- ⇒ Ácido acético p.a. (Merck, Alemanha);
- ⇒ Acetato de sódio p.a. (Quimex, Brasil);
- ⇒ Cloreto de sódio p.a. (Vetec, Brasil);
- ⇒ Citrato de sódio p.a. (Vetec, Brasil);
- ⇒ Sulfato de magnésio anidro (Vetec, Brasil);
- ⇒ Strata C18-E (55 μ m, 70 Å) (Phenomenex, EUA).

3.5 Pesticidas Seleccionados

Os compostos seleccionados para este estudo foram adquiridos da firma Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha) e estão listados na Tabela 7, com sua pureza, classe e grupo químico. As estruturas químicas destes compostos estão apresentadas em Anexo A.

Tabela 7. Pesticidas seleccionados e analisados por GC-MS no modo SIM

Pesticidas	Classe	Grupo Químico	Pureza (%)
Aldrin	Inseticida	Organoclorado	97,0
Azoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	99,5
Bifentrina	Acaricida/Inseticida	Piretróide	97,0
Cialotrina-lambda	Inseticida	Piretróide	98,2
Cipermetrina	Inseticida/Fungicida	Piretróide	98,0
Clorpirifós-metílico	Acaricida/Inseticida	Organofosforado	99,0
Clortalonil	Fungicida	Isoftalonitrila	98,0
Clorpirifós-etílico	Acaricida/Inseticida	Organofosforado	99,0
Deltametrina	Formicida/Inseticida	Piretróide	97,0
Dicofol	Acaricida	Organoclorado	98,0
Dieldrin	Inseticida	Organoclorado	99,0
Dimetoato	Acaricida/Inseticida	Organofosforado	99,0
Endossulfan-alfa	Acar/Inset/Formicida	Clorociclodieno	99,0
Endossulfan-beta	Acar/Inset/Formicida	Clorociclodieno	99,0
Endossulfan-sulfato	Acar/Inset/Formicida	Clorociclodieno	99,0
Endrin	Inseticida	Organoclorado	99,5
Fenitrotiona	Inseticida/Formicida	Organofosforado	97,7
Heptacloro (p.s.)	Inseticida	Organoclorado	99,7
Heptacloro epóxido (p.i.)	Inseticida	Organoclorado	99,7
Lindano	Inseticida	Organoclorado	99,0
Malationa	Acaricida/Inseticida	Organofosforado	99,5
Parationa-etílica	Acaricida/Inseticida	Organofosforado	94,0
Permetrina-cis	Inseticida/Formicida	Piretróide	94,0
Permetrina-trans	Inseticida/Formicida	Piretróide	94,0
Pirimifós-metílico	Inseticida/Formicida	Piretróide	99,0
Tetradifona	Acaricida	Clorodifenilsulfona	99,0

p.i. Padrão interno

p.s. Padrão de substituição

3.6 Seleção do Padrão Interno e de Substituição

Padrão interno e de substituição (*surrogate*) são definidos como um composto ou elemento puro adicionado ao material teste (amostra), onde o comportamento físico e químico deve ser representativo da substância de interesse (CUADROS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

Os compostos escolhidos para serem utilizados como padrão interno e padrão de substituição, deveriam ser pesticidas que tiveram seus usos proibidos para fins agrícolas, deste modo, apresentariam características semelhantes aos demais pesticidas analisados e não estariam presentes nas amostras encaminhadas para análise. Para selecionar o padrão interno e de substituição, injetou-se algumas soluções de padrões individuais e selecionou-se os que apresentariam melhor sinal. Os padrões avaliados foram: metamidofós; 1,3-difenoxibenzeno; 1,4-diclorobenzeno-d4; nafteno-d8; acenafteno-d10; antraceno-d10; criseno-d12; pirileno-d12; heptacloro e heptacloro epóxido.

3.7 Preparo das Soluções Analíticas

Para o preparo das soluções analíticas estoques, efetuou-se o cálculo para determinar a quantidade de cada padrão sólido puro a ser pesado. As soluções analíticas estoque foram preparadas individualmente através da dissolução dos respectivos padrões analíticos apresentados na Tabela 7 nas concentrações de 1000 mg L⁻¹ em tolueno, armazenadas em frasco âmbar a temperatura de -18 °C. A partir destas soluções estoque, mediu-se 1 mL de cada solução, preparando-se 10 mL de cada solução nas concentrações de 100 mg L⁻¹.

Estas soluções estoques apresentam estabilidade de cerca de 8 anos, desde que armazenadas em freezer, e corretamente manipuladas.

Em seguida, preparou-se 100 mL de uma mistura de concentração 1,0 mg L⁻¹, contendo todos os pesticidas a serem estudados, chamada de solução de trabalho. Para isso, transferiu-se 1 mL de cada solução de concentração 100 mg L⁻¹ para balão volumétrico de 100 mL, já contendo um pequeno volume de

isooctano/tolueno 9:1 (v/v), sendo, posteriormente, o volume completado com este mesmo solvente.

Esta solução de trabalho foi utilizada para os ensaios de fortificação e também para preparar as soluções analíticas, através de sua diluição, nas concentrações de 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 20,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (estabilidade de cerca de 3 meses), para o estudo de linearidade e confecção das curvas analíticas, de cada composto. As soluções analíticas foram preparadas em acetonitrila e nos extratos do trigo, farinha, farelo e pão.

Todas as soluções analíticas foram armazenadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo que antes de serem utilizadas foram retiradas do freezer, deixadas para atingir temperatura ambiente.

3.8 Parâmetros de otimização do sistema GC-MS

3.8.1 Condições Cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas nesse estudo foram estabelecidas de acordo com os estudos desenvolvidos por PRESTES (2006) no *Food and Consumer Product Safety Authority (VWA)*, Ministério da Agricultura da Holanda.

3.8.2 Avaliação do modo de ionização química negativa e positiva

O primeiro passo para otimizar o modo de ionização, foi avaliar o modo que apresentaria a máxima sensibilidade, obtendo a melhor resposta para cada composto. Para isto, preparou-se uma solução padrão contendo todos os pesticidas em estudo na concentração de $100\ \mu\text{g L}^{-1}$, e realizou-se a injeção no modo *full scan*, tanto no modo de ionização química positiva (PCI) quanto negativa (NCI).

3.8.3 Avaliação da voltagem da eletromultiplicadora de elétrons

Avaliou-se três diferentes voltagens, 1000, 1200, 1400 V, a fim de obter-se a melhor razão sinal/ruído. Para isto, preparou-se uma solução padrão de concentração $5 \mu\text{g L}^{-1}$ em acetonitrila e realizou-se a injeção no modo ionização química negativa (NCI) e monitoramento do íon seletivo (SIM).

3.8.4 Seleção dos íons

Para selecionar os íons que serão monitorados no modo SIM, realizou-se a injeção de cada composto individualmente no modo *full scan*, obtendo-se o seu respectivo espectro de massas. A seleção dos íons foi baseada na escolha de três íons de razão massa/carga >100 ou dois íons de razão massa/carga >200 (SOBOLEVA *et al.*, 2004).

3.9 Amostras para a etapa de validação

As amostras utilizadas no processo de validação do método multirresíduo, devem ser amostras isentas de qualquer tipo de resíduo de pesticidas que possa interferir no processo de validação, pois com esta amostra se preparará as curvas de calibração (no extrato da matrix) e se realizará as fortificações para avaliar o percentual de recuperação do método de extração. Este tipo de amostra é denominado amostra “branco”.

Foram adquiridas amostras de trigo, farinha e farelo, denominados como produtos orgânicos e adquiridos em comércio de produtos naturais. Amostras de trigo foram também adquiridas em supermercado local. Foram adquiridos 1 kg de cada amostra, sendo que as amostras de trigo foram moídas até se obter um farelo fino (a granulometria foi aquela conseguida na moagem). Para a farinha e farelo não houve esta necessidade. Todas as amostras foram mantidas a $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da sua utilização.

3.10 Otimização do método QuEChERS modificado para análise multirresíduo em grãos de trigo

A partir do método QuEChERS modificado, realizou-se testes para avaliar e obter as melhores condições de extração dos compostos em estudo. Inicialmente, partiu-se do método utilizado por PRESTES (2006) que empregou o método QuEChERS modificado para análise de arroz.

3.10.1 Adição de água

De acordo com o método originalmente publicado por ANASTASSIADES *et al.*, 2003a, amostras com baixo teor de umidade (<80%), necessitam de adição de água antes de iniciar-se a etapa de extração, com o objetivo de melhorar a capacidade de extração dos compostos, pois formam-se poros, permitindo o melhor acesso do solvente de extração.

Deste modo, avaliou-se a adição de 10, 15 e 20 mL de água a cada 10 g de trigo, farinha, farelo e pão.

3.10.2 Otimização do método de extração

3.10.2.1 Ensaio 1

Para os testes preliminares para avaliar a eficiência da extração do método, preparou-se uma mistura de grãos de trigo moído e água com auxílio de um *mixer*, para tornar a amostra o mais homogênea possível. Pesou-se $10,0 \pm 0,1$ g desta mistura, diretamente em tubos de polipropileno (capacidade de 50 mL) com tampa rosqueada. Para a fortificação realizada no nível de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, adicionou-se $100 \mu\text{L}$ da solução analítica 1 mg L^{-1} , contendo todos os pesticidas a serem analisados, inclusive o padrão de substituição nesta mesma concentração.

Adicionou-se, 10 mL de acetonitrila contendo 1% de ácido acético, e realizou-se agitação manual e vigorosa por cerca de 1 min. Em seguida, acrescentou-se 3,0 g de sulfato de magnésio anidro e 1,7 g de acetato de sódio anidro. Com a presença de água, a adição do sulfato de magnésio pode promover a formação de um aglomerado de sal não solubilizado. Isto pode ser evitado com a imediata agitação do tubo por poucos segundos logo após a adição do sal, assegurando-se assim da completa interação entre o extrato líquido e os reagentes sólidos.

Em seguida, os tubos foram agitados manualmente por 1 min, e centrifugados a 4000 rpm durante 8 min. Posteriormente, transferiu-se 4 mL do extrato líquido para outro tubo de polipropileno (capacidade de 15 mL), adicionou-se 600 mg de sulfato de magnésio anidro e 500 mg de C18, sendo novamente agitados vigorosa e manualmente por 1 min, e centrifugados como citado anteriormente. Alíquotas de 1 mL foram transferidas para frascos de vidro, onde adicionou-se 20 µL do padrão interno, para posterior análise por GC-MS.

Este procedimento foi realizado utilizando-se uma amostra de trigo "branco" fortificada na concentração de 50 µg kg⁻¹, que foi comparada a uma solução padrão equivalente de mesma concentração (20 µg L⁻¹), na mesma matriz.

3.10.2.2 Ensaio 2

A partir do método descrito no item 3.8.2, realizou-se alterações com relação aos sais utilizados, quantidades destes sais e a não adição de ácido acético à acetonitrila.

Na realização do ensaio 2, manteve-se a adição de 1% de ácido acético na acetonitrila, e além dos 3,0 g de sulfato de magnésio anidro e 1,7 g de acetato de sódio anidro, adicionou-se mais 1 g de cloreto de sódio. A partir da adição dos sais, o procedimento foi igualmente concluído como já descrito anteriormente.

3.10.2.3 Ensaio 3

Na realização do ensaio 3, utilizou-se acetonitrila sem a adição de 1% de ácido acético, mantendo-se os 3,0 g de sulfato de magnésio anidro e 1,7 g de acetato de sódio anidro e a adição de 1 g de cloreto de sódio.

3.10.2.4 Ensaio 4

Na realização do ensaio 4, manteve-se a adição de 1% de ácido acético em acetonitrila, e substituiu-se o acetato de sódio por 1,7 g de cloreto de sódio, mantendo 3,0 g de sulfato de magnésio anidro.

3.10.2.5 Ensaio 5

Na realização do ensaio 5, utilizou-se acetonitrila sem a adição de 1% de ácido acético, a adição de 1,7 g de cloreto de sódio e 3,0 g de sulfato de magnésio anidro.

3.10.2.6 Ensaio 6

Na realização do ensaio 6, manteve-se a adição de 1% de ácido acético na acetonitrila, e além dos 3,0 g de sulfato de magnésio anidro e 1,7 g de acetato de sódio anidro, adicionou-se mais 1 g de citrato de sódio.

A Tabela 8, resume as alterações que foram realizadas na etapa de extração para os 6 ensaios realizados com nível de fortificação $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabela 8. Ensaio realizados para a otimização da etapa de extração

Ensaio	Modificações na etapa de extração
Ensaio 1	10 mL acetonitrila + 1% ácido acético + 3,0 g sulfato de magnésio + 1,7 g acetato de sódio
Ensaio 2	10 mL acetonitrila + 1% ácido acético + 3,0 g sulfato de magnésio + 1,7 g acetato de sódio + 1,0 g cloreto de sódio
Ensaio 3	10 mL acetonitrila + 3,0 g sulfato de magnésio + 1,7 g acetato de sódio + 1,0 g cloreto de sódio
Ensaio 4	10 mL acetonitrila + 1% ácido acético + 3,0 g sulfato de magnésio + 1,7 g cloreto de sódio
Ensaio 5	10 mL acetonitrila + 3,0 g sulfato de magnésio + 1,7 g cloreto de sódio
Ensaio 6	10 mL acetonitrila + 1% ácido acético + 3,0 g sulfato de magnésio + 1,7 g acetato de sódio + 1,0 g de citrato de sódio

3.10.3 Otimização da etapa de *clean up*

Para otimizar a etapa de *clean up* dispersivo, foram realizados testes com diferentes quantidades de C18. Deste modo, pôde-se avaliar se esta etapa está sendo efetiva e se realmente não estão ocorrendo perdas do analito.

Esta avaliação foi realizada utilizando-se, 500, 600, 700 e 800 mg de C18 que foram adicionados juntamente com 600 mg de sulfato de magnésio à 4 mL de extrato.

O Fluxograma no Anexo C, apresenta o processo de otimização do método QuEChERS modificado.

3.11 Análise dos solventes e reagentes pelo método de extração QuEChERS modificado

Para avaliar a pureza dos solventes e reagentes utilizados em todo procedimento, realizou-se a extração sem a presença da amostra, ou seja, utilizando-se somente acetonitrila e água como solventes e todos os demais reagentes.

3.12 Avaliação do efeito matriz para os extratos de trigo, farinha, farelo e pão nas análises por GC-MS

Para a avaliação da existência do efeito matriz nos extratos do trigo, farinha, farelo e pão, nas análises por GC-MS, realizou-se a comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas preparadas em acetonitrila, daquelas obtidas com soluções analíticas preparadas no extrato de cada matriz. O cálculo foi efetuado através da Equação 5.

$$EfeitoMatriz\% = \frac{bm - bs}{bs} 100 \quad \text{Equação 5}$$

onde:

bm= inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada pesticida, preparadas no extrato da matriz (trigo, farinha, farelo e pão);

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

Assim, verifica-se se a matriz exerce efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (decréscimo de sinal) sobre o resultado da análise. Quando o resultado for acima de 10% considera-se que o efeito matriz começa a exercer influência nas análises (ZROSTLIKOVA *et al.*, 2001).

3.13 Validação do método QuEChERS modificado para análise multirresíduo em trigo, farinha, farelo e pão

Depois de definidas as melhores condições de extração e de análise, o passo seguinte foi realizar a validação do procedimento, segundo os parâmetros que serão descritos a seguir.

3.13.1 Determinação da linearidade

As curvas analíticas dos compostos em estudo foram obtidas preparando-se soluções analíticas com concentrações de 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 20,0; 50,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para trigo e pão; e 2,0; 4,0; 8,0; 20,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a farinha e farelo. Cada solução padrão foi injetada quatro vezes.

As curvas analíticas foram traçadas gerando as equações de regressão linear, utilizando o programa Microsoft Office Excel[®] 2003, o qual forneceu o coeficiente de determinação (r^2), a inclinação (a) e intercepto (b) das curvas analíticas.

3.13.2 Determinação da estimativa do LOD e LOQ, do instrumento e do método

A partir da avaliação dos dados de linearidade das curvas analíticas, de cada um dos pesticidas estudados, procedeu-se à determinação da estimativa do LOD do instrumento (LOD_i) e do método (LOD_m), bem como do LOQ do instrumento (LOQ_i) e do método (LOQ_m) (VERWAAL & HIEMSTRA, 1997; THOMPSON *et al.*, 2002).

A partir, das áreas e dos valores de RSD%, de cada composto presente nas sete soluções analíticas estudadas, aplicando-se a Equação 3, obteve-se a estimativa do LOD_i , em $\mu\text{g L}^{-1}$.

$$\text{LOD}_i (\mu\text{g L}^{-1}) = 3 \times \text{RSD} \times C \quad \text{Equação 3}$$

onde:

RSD: Desvio padrão relativo das áreas obtidas;

C: Concentração da solução analítica.

Multiplicando-se o valor estimado do LOD_i pelo fator obtido para o método de extração (fator = 2,5 para trigo, farinha e farelo e 2,0 para o pão), obtém-se a estimativa do LOD_m , em $\mu\text{g kg}^{-1}$. O cálculo da determinação dos fatores, para cada método de extração, encontram-se no Anexo B.

A partir do LOD_i , aplicando-se a Equação 4, obtém-se o LOQ_i .

$$LOQ_i (\mu\text{g L}^{-1}) = LOD_i \times 3,33 \quad \text{Equação 4}$$

Multiplicando-se o LOQ_i , pelos fatores de cada método de extração, obtém-se o LOQ_m estimado calculado. Entretanto, considera-se o valor verdadeiro do LOQ_m (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%.

3.1.3 Ensaios de fortificação para avaliação da exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária)

Para avaliar a exatidão, utilizou-se ensaios de fortificação, avaliando-se deste modo a recuperação dos compostos em estudo. Os ensaios de fortificação foram realizados a partir da solução analítica de concentração 1 mg L^{-1} contendo todos os pesticidas, em quatro níveis diferentes de concentração, obtendo-se as seguintes concentrações nas amostras de trigo, farinha, farelo e pão: 5, 10, 20 e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os volumes da solução analítica correspondentes para cada nível de fortificação foram: 20, 40, 80 e $100 \mu\text{L}$, que foram adicionados a cada tubo logo após a pesagem das amostras.

O estudo da precisão do procedimento (repetitividade - RSD_r) foi realizado efetuando-se três injeções de cada fortificação em cada uma das matrizes, avaliando-se assim, o procedimento de extração e análise dos extratos fortificados.

Para avaliar a precisão intermediária realizou-se o procedimento completo em dois dias diferentes. Procedeu-se a fortificação, extração e análise das amostras fortificadas em quatro níveis diferentes de concentração, obtendo-se $n=6$ (2 extrações x 3 injeções cada) para cada nível de fortificação.

3.14 Aplicação do procedimento em amostras reais

Depois de efetuada a validação do método, este foi aplicado em duas amostras de trigo, nas respectivas amostras de farinha e uma amostra de farelo, obtidas através do processamento em moinho. As amostras foram coletadas durante o processamento em dois moinhos diferentes localizados na região. As amostras de pão foram obtidas através do preparo em panificadora doméstica (Britânea) a partir das duas amostras de farinha. A Tabela 9, define como estão classificadas as amostras.

Tabela 9. Amostras de trigo, farinha, farelo e pão

Amostragem	Tipos de amostras
Coleta 1	Trigo em grão, farinha e pão
Coleta 2	Trigo em grão, farinha, farelo e pão

3.14.1 Preparo das amostras de pão

O preparo do pão foi realizado em panificadora doméstica. A programação de preparo foi de 1 hora, onde durante os primeiros 15 min ocorreu o preparo da massa com leve aquecimento, enquanto nos próximos 45 min, a temperatura foi aumentando gradativamente até alcançar 180 °C.

Os ingredientes utilizados para o preparo do pão seguiram receita recomendada pela marca da panificadora. Para o preparo de um pão de 600 g utilizou-se:

- ✓ 1 copo de água morna (240 mL);
- ✓ 1 colher de chá de margarina;
- ✓ 1 colher de chá de sal;
- ✓ 1 colher de sopa de leite em pó;
- ✓ 3 copos de farinha branca (240 mL);

✓ 2 colheres de chá de fermento biológico seco.

O único ingrediente não utilizado foi o açúcar, devido às possíveis interferências e danos à coluna cromatográfica com a elevação da temperatura.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Condições do sistema GC-MS

Abaixo estão apresentadas as condições utilizadas para o sistema GC-MS, para análise dos 24 compostos validados para análise em amostras de trigo, farinha, farelo e pão.

Para o cromatógrafo a gás:

- Programação de temperatura do injetor por vaporização com temperatura programada (PTV): temperatura inicial de 80 °C (0,1 min), com incremento de temperatura de 200 °C min⁻¹ até 300 °C ;
- Programação da válvula do *split* do injetor PTV: inicialmente válvula do *split* aberta na razão 1/10, após 0,1 min válvula do *split* fechada, e após 2,0 min válvula do *split* aberta na razão 1/40);
- Volume de injeção de 2 µL;
- A injeção efetuada com o auxílio de amostrador automático, consistiu na aspiração de 1,0 µL de ar, 3,0 µL de solução a analisar e 1,0 µL de ar, com velocidade de injeção de 0,5 µL s⁻¹ ;
- Programação de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 80 °C (1,0 min), com incremento de temperatura de 25 °C min⁻¹ até 180 °C; e posteriormente de 5 °C min⁻¹ até 280 °C;
- Vazão do gás de arraste (hélio) constante em 1,3 mL min⁻¹ na coluna;
- Tempo total de corrida de 30 min.

Para o espectrômetro de massas, modo CI negativo :

- Temperatura do *transfer line*: 250 °C;
- Temperatura da fonte de ionização: 230 °C;
- Modo de aquisição SIM;
- Modo de ionização CI negativo, com metano a pressão de 12 mbar;
- *Scan time* constante de 0,5 s.

4.1.1 Avaliação do modo de ionização química

Para esta avaliação, injetou-se uma solução padrão contendo todos os pesticidas na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em acetonitrila e fez-se aquisição no modo *full scan*. A Figura 4, apresenta o cromatograma obtido para os dois modos de ionização, onde pode-se observar que a sensibilidade para todos os compostos foi muito maior no modo negativo, pois compostos contendo halogênios ou átomos muito eletronegativos formam ânions muito estáveis, gerando grupos específicos de fragmentos de alta intensidade.

4.1.2 Avaliação da voltagem da eletromultiplicadora de elétrons

Na avaliação das três diferentes voltagens, 1000, 1200, 1400 V, do sistema de detecção, observa-se na Figura 5, que a intensidade do sinal aumentou significativamente com o aumento da voltagem da eletromultiplicadora. No entanto, mesmo com sinal mais intenso, não houve uma melhora muito significativa na razão sinal/ruído, como se observa para alguns picos selecionados, pois com o aumento da voltagem, ocorreu também um aumento do sinal do ruído. Como a sensibilidade apresentada em 1000 V foi considerada satisfatória, apresentando também uma boa razão sinal/ruído, optou-se pela utilização desta voltagem, permitindo também, que não haja um desgaste tão elevado da eletromultiplicadora de elétrons.

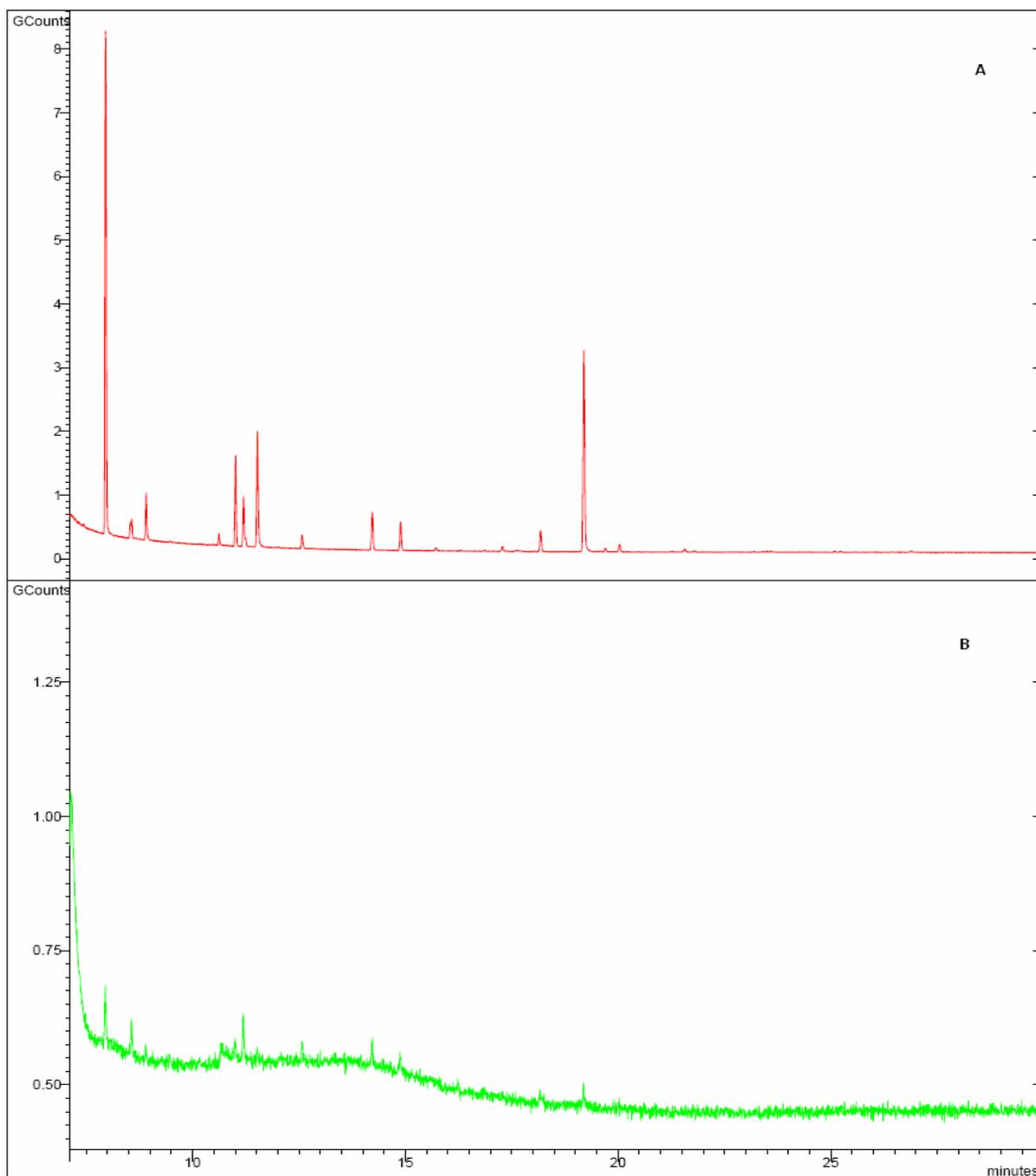


Figura 4. Cromatograma total obtido por GC-MS de uma solução de concentração $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em acetonitrila, no modo de ionização química negativa (A) e positiva (B)

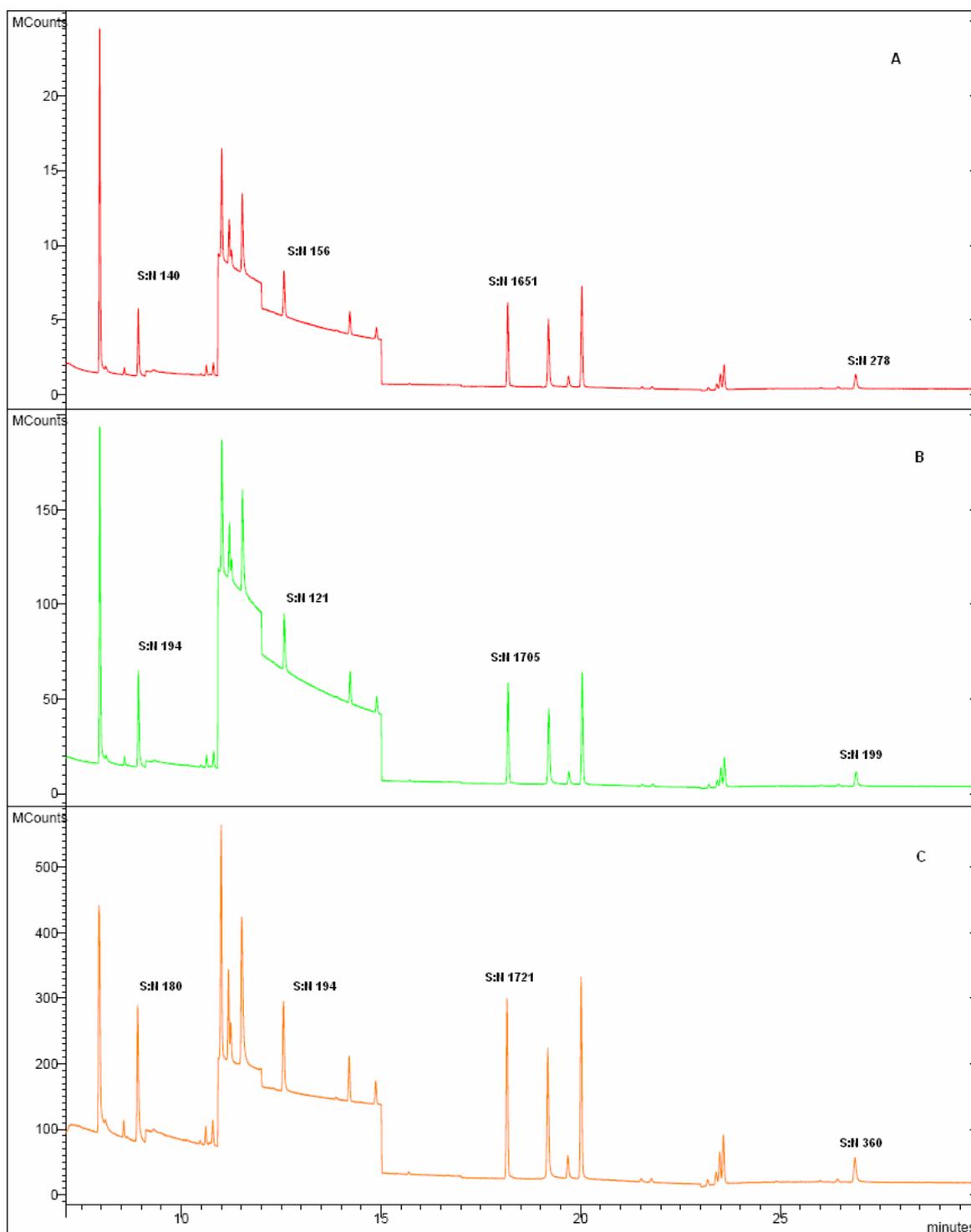


Figura 5. Efeito das diferentes voltagens da eletromultiplicadora de elétrons, A: aplicação de 1000 V; B: 1200 V e C: 1400 V no cromatograma total de uma solução de concentração 5 µg L⁻¹ em acetonitrila

4.1.3 Seleção dos íons

Os íons selecionados para cada pesticida, que foram os íons monitorados durante a análise por GC-MS no modo CI negativo de ionização e modo SIM de aquisição, estão listados na Tabela 10, ordenados de acordo com seus tempos de retenção.

Na seleção dos íons para cada composto, procurou-se selecionar 3 íons com razão $m/z > 100$. No entanto, para o composto endossulfan-sulfato selecionou-se 4 íons, pois este apresenta apenas um íon de razão $m/z > 100$. Para o composto lindano e deltametrina, selecionou-se também os quatro íons mais abundantes, pois dois deles apresentaram razões $m/z < 100$.

Depois da seleção dos íons, dividiu-se os compostos em 9 segmentos, cada segmento monitora uma quantidade de íons num determinado tempo, pois o monitoramento de um grande número de íons em um curto espaço de tempo, diminui a sensibilidade, devido ao pouco tempo para monitorar um grande número de íons.

Tabela 10. Pesticidas analisados por GC-MS, com seus respectivos t_R , íons monitorados, segmento e *time window* (min)

Nº	Pesticida	t_R (min)	Íons monitorados	Segmento	<i>time window</i>
1	Dimetoato	8,06	157+159+158	2	
2	Lindano	8,54	71+73+255+253	2	7,0 – 9,1
3	Clorotalonil	8,89	266+264+268	2	
4	Clorpirifós-metílico	9,78	141+214+212	3	
5	Heptacloro *	10,21	266+264+268	3	
6	Pirimifós-metil	10,45	141+304+290	3	9,1 – 10,9
7	Fenitrotiona	10,59	168+141+169	3	
8	Malationa	10,77	157+159+172	3	
9	Clorpirifós-etílico	10,98	169+214+212	4	
10	Aldrin	11,17	237+235+239	4	10,9 – 12,0
11	Parationa-etílica	11,22	154+169+155	4	
12	Dicofol	11,49	250+252+251	4	
13	Heptacloro-epóxido**	12,37	237+235+246	5	
14	Endossulfan-alfa	13,35	242+240+244	5	
15	Dieldrin	14,18	237+239+235	5	12,0 – 15,0
16	Endrin	14,85	237+239+240	5	
17	Endossulfan-beta	15,21	99+242+240	6	
18	Endossulfan-sulfato	16,44	97+386+80+99	6	15,0 – 17,0
19	Bifentrina	18,13	205+241+206	7	17,0 – 19,0
20	Tetradifona	19,15	320+318+245	8	
21	Cialotrina-lambda	19,99	205+241+243	8	19,0 – 23,0
22	Permetrina-cis	21,50	207+209+171	8	
23	Permetrina-trans	21,75	207+209+171	8	
24	Cipermetrina	23,38	207+209+171	9	
25	Deltametrina	26,39	79+81+137+139	9	23,0 – 30,0
26	Azoxistrobina	26,83	371+356+301	9	

* padrão de substituição

** padrão interno

De acordo com a Tabela 10 e a Figura 6, observa-se que houve baixa resolução para os compostos aldrin e parationa-etílica, pois possuem tempos de retenção muito próximos, não possibilitando a separação completa destes compostos. No entanto, através da técnica de GC-MS operado no modo SIM, onde somente os respectivos íons de cada composto são monitorados, pode-se realizar a separação destes, possibilitando a sua análise sem interferências. A Figura 7 apresenta um cromatograma obtido no modo SIM de acordo com a Tabela 10, com uma solução padrão de concentração $200 \mu\text{g L}^{-1}$ preparada no extrato do trigo, nas condições cromatográficas apresentadas no item 4.1, onde observa-se a boa resolução para os demais compostos estudados.

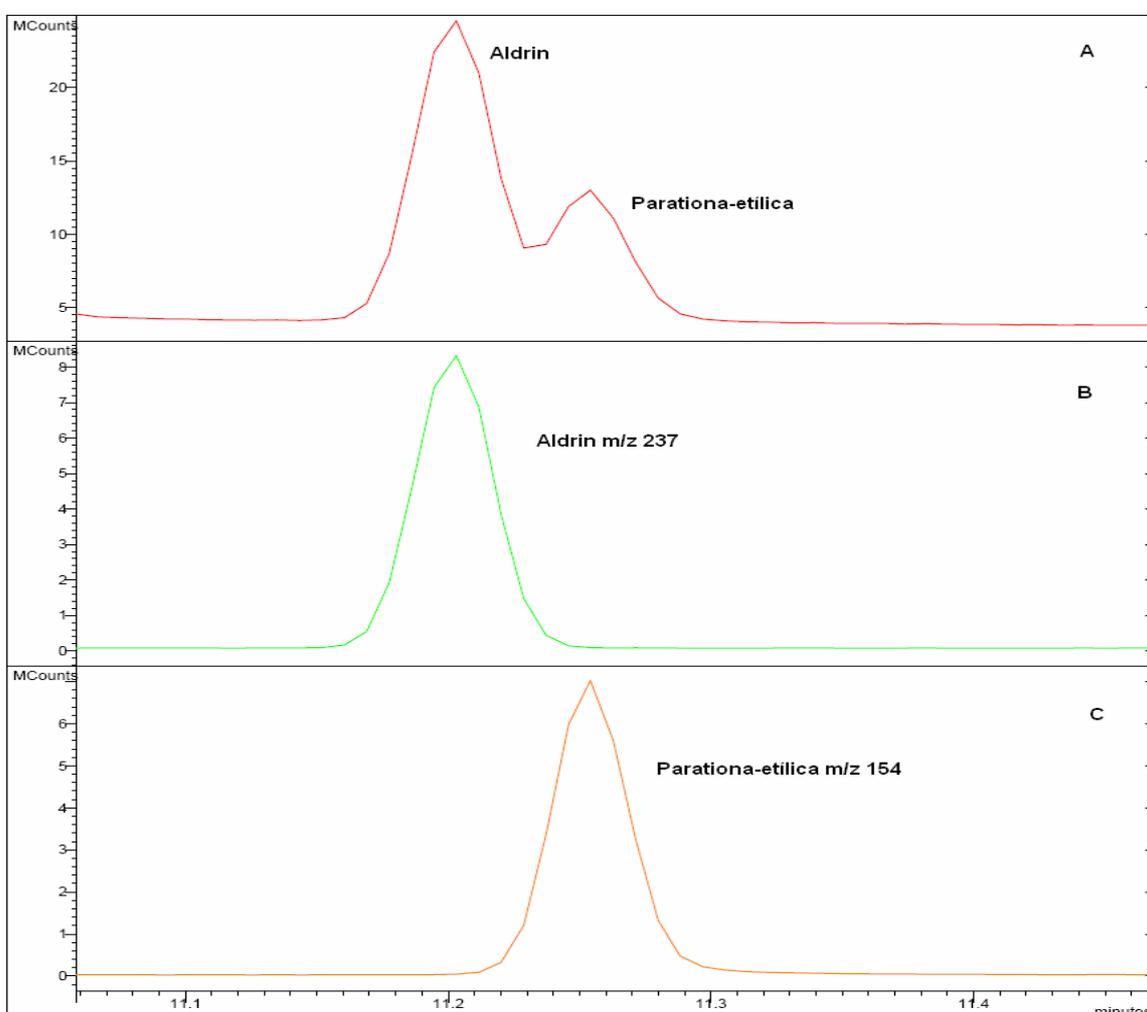


Figura 6. Cromatograma obtido por GC-MS (NCI) modo *full scan*, A: modo *full scan*; B: seleção do íon 237 para aldrin; C: seleção do íon 154 para parationa-etílica em extrato da matriz trigo

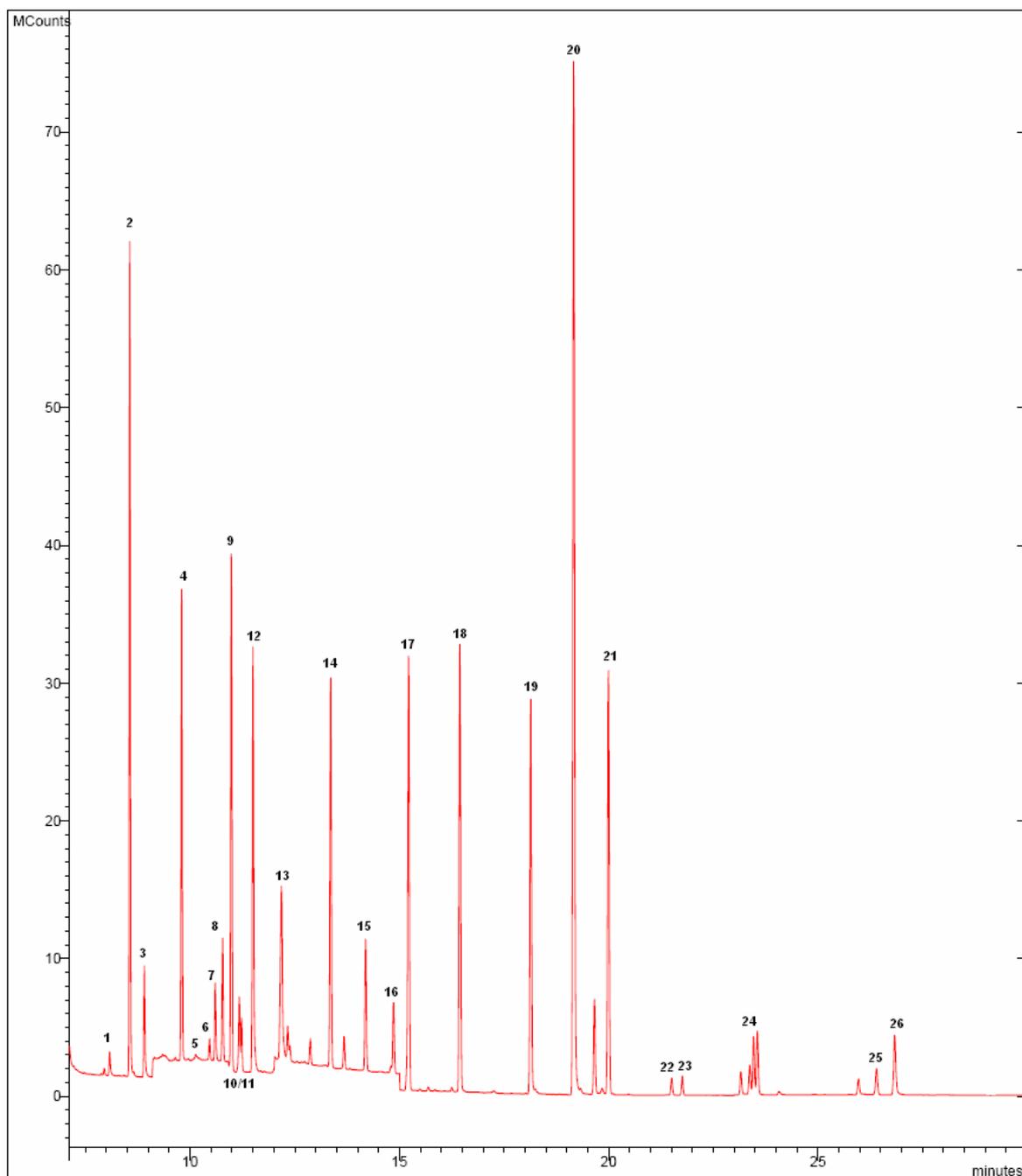


Figura 7. Cromatograma total obtido por GC-MS (NCI) modo SIM, para uma solução no extrato da matriz do trigo na concentração de $200 \mu\text{g L}^{-1}$

4.2 Seleção do padrão interno e de substituição

O pesticida selecionado como padrão interno foi o heptacloro-epóxido, na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$, e como padrão de substituição (*surrogate*) foi selecionado o heptacloro, na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Ambos padrões apresentaram melhor sinal nas condições cromatográficas utilizadas neste estudo em comparação com os outros compostos avaliados. O pesticida heptacloro epóxido apresentou sinal maior em relação ao heptacloro, deste modo optou-se em utilizar o composto heptacloro epóxido como padrão interno, objetivando-se apenas o monitoramento da análise cromatográfica. Ambos os compostos apresentaram valores de RSD abaixo de 20% e o padrão de substituição, obteve recuperações entre 70 e 120% (SANCO, 2007). Este foi utilizado para monitorar a análise das amostras reais, permitindo avaliar o percentual de recuperação no processo de extração das amostras.

4.3 Otimização do método de extração QuEChERS modificado

4.3.1 Adição de água

Para avaliar a quantidade de água a ser utilizada nas amostras, pesou-se 10 g de trigo moído e adicionou-se 10, 15 e 20 mL de água. Com a adição de apenas 10 mL, ocorreu uma absorção muito grande por parte do trigo e do farelo, não permitindo uma homogeneização perfeita da amostra. O volume de 15 mL foi considerado o mais adequado para trigo, farinha e farelo, pois permitiu uma boa homogeneização de toda a amostra com auxílio de um *mixer*. Para pão, o volume de 10 mL foi considerado adequado.

4.3.2 Avaliação dos procedimentos de extração

Para avaliar os seis procedimentos de extração utilizados neste estudo, utilizou-se uma amostra "branco" de trigo em grão, fortificada na concentração de

50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os resultados dos seis ensaios de extração descritos no item 3.8, estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Recuperações médias (%) obtidas para os seis ensaios de extração

Pesticidas	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6
Lindano	122	116	211	192	56	97
Clorotalonil	80	125	75	167	1	102
Fenitrotiona	70	112	108	141	66	110
Aldrin	72	90	100	105	99	74
Endosulfan alfa	77	95	106	113	75	90
Endosulfan beta	77	102	117	121	67	97
Endosulfan sulfato	57	144	136	144	21	103
Bifentrina	57	79	84	89	72	81
Cialotrina-lambda	67	94	68	110	2	100
Deltametrina	74	99	58	121	2	97
Permetrina-cis	49	70	65	82	48	91
Permetrina-trans	55	80	78	93	64	90
Azoxistrobina	78	113,9	116	128	72	107
Cipermetrina-beta	62	95	72	110	2	97
Clorpirifós-metílico	74	105	112	128	63	102
Clorpirifós-etílico	77	97	104	119	75	96
Dicofol	56	63	121	33	82	93
Dimetoato	80	125	99	145	27	107
Malationa	92	115	103	136	3,9	109
Parationa-etílica	77	105	98	123	78	112
Pirimifós-metílico	71	98	99	112	75	111
Dieldrin	89	109	125	130	120	91
Tetradifona	82	98	109	118	92	94
Endrin	77	107	128	124	115	92

A partir deste teste preliminar, pôde-se avaliar quais dos métodos de extração apresentaram as melhores recuperações para os compostos em estudo. Os resultados obtidos para o ensaio 1, apresentaram baixos valores de recuperação (< 70%) para grande parte dos compostos. No ensaio 2, onde a diferença em relação ao ensaio 1, foi a adição de mais um sal, o cloreto de sódio, observou-se que as recuperações aumentaram para a maioria dos pesticidas, com boas recuperações para quase todos os compostos, pois estão dentro dos valores aceitos, conforme descrito na literatura para métodos cromatográficos aplicados para determinação de resíduos de pesticidas, as quais devem estar entre 70 e 120% (SANCO, 2007). Os resultados do ensaio 3, onde a única alteração foi a não adição de ácido acético na acetonitrila, apresentaram alguns valores de recuperação muito acima de 120% e também muitos valores abaixo de 70% de recuperação.

Com relação aos ensaios 4 e 5, onde empregou-se cloreto de sódio no lugar do acetato de sódio, e a adição ou não de ácido acético, observa-se que no ensaio 4 com a adição de ácido na acetonitrila, os valores de recuperação para a grande maioria dos compostos, foram muito superiores aos permitidos, no entanto, no ensaio 5, onde não houve a adição do ácido, os valores de recuperação foram muito abaixo do esperado. Na avaliação do ensaio 6, onde utilizou-se citrato de sódio, observa-se bons valores de recuperação para todos os compostos.

Depois desta avaliação preliminar, onde os ensaios 2 e 6 apresentaram os melhores resultados, realizou-se um novo ensaio com os níveis de fortificação 10 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com ambos os ensaios (2 e 6), deste modo poderia-se avaliar melhor qual dos dois métodos de extração forneceria os melhores valores de recuperação nas diferentes faixas de concentração. A Tabela 12, apresenta os valores de recuperação (%) para os níveis de fortificação 10 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ no trigo, avaliando-se deste modo, o método de extração 2 e 6.

Tabela 12. Recuperações médias (%) obtidas para os níveis de concentração 10 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ no trigo, empregando ensaio 2 e 6

Pesticidas	Ensaio 2	Ensaio 6	Ensaio 2	Ensaio 6	Ensaio 2	Ensaio 6
	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Lindano	109	99	102	97	116	97
Clorotalonil	112	106	106	106	125	102
Fenitrotiona	125	112	112	113	112	110
Aldrin	83	70	78	74	90	74
Endosulfan alfa	100	90	95	91	95	90
Endosulfan beta	106	98	100	97	102	97
Endosulfan sulfato	109	100	102	105	144	103
Bifentrina	94	81	87	81	79	81
Cialotrina-lambda	108	98	103	101	94	100
Deltametrina	107	101	91	99	99	97
Permetrina-cis	95	86	94	92	70	91
Permetrina-trans	105	89	94	90	80	90
Azoxistrobina	119	104	112	108	113,9	107
Cipermetrina-beta	106	94	103	99	95	97
Clorpirifós-metílico	114	102	107	103	105	102
Clorpirifós-etílico	111	94	102	96	97	96
Dicofol	104	96	93	98	63	93
Dimetoato	136	115	117	109	125	107
Malationa	125	105	115	109	115	109
Parationa-etílica	121	110	106	116	105	112
Pirimifós-metílico	106	82	118	104	98	111
Dieldrin	105	88	98	92	109	91
Tetradifona	105	91	99	95	98	94
Endrin	103	93	96	93	107	92
Heptacloro (p.s.)	88	80	94	85	95	90

Observa-se, que ambos os métodos de extração, apresentaram valores de recuperação satisfatórios para os dois níveis de fortificação, no entanto, observa-se que o método de extração 2, apresenta valores de recuperação um pouco maiores que o método de extração 6, inclusive acima de 120% no nível de fortificação mais baixo. Deste modo, o método de extração escolhido, foi o método 6 que emprega 10 mL de acetonitrila com adição de 0,1% de ácido acético, 3 g de sulfato de magnésio, 1,7 g de acetato de sódio e 1 g de citrato de sódio.

4.3.3 Avaliação da etapa de *clean up*

Para avaliar a etapa de *clean up*, realizou-se fortificação dos pesticidas na concentração de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ no trigo, onde diferentes quantidades de sorvente C18 foram empregadas, de acordo com o item 3.10.3. Os resultados estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Recuperações médias (%) obtidas com diferentes quantidades de C18 na etapa de *clean up*

Pesticidas	500 mg	600 mg	700 mg	800 mg
Lindano	99	96	91	86
Clorotalonil	106	102	99	88
Fenitrotona	112	97	104	98
Aldrin	70	60	56	53
Endosulfan alfa	90	84	81	74
Endosulfan beta	98	86	83	81
Endosulfan sulfato	100	96	96	92
Bifentrina	81	72	68	61
Cialotrina-lambda	98	93	91	81
Deltametrina	101	91	81	83
Permetrina-cis	86	74	68	58

Continuação da Tabela 13

Permetrina-trans	89	84	71	71
Azoxistrobina	104	100	97	95
Cipermetrina-beta	94	89	91	81
Clorpirifós-metílico	102	97	90	86
Clorpirifós-etílico	94	89	84	78
Dicofol	96	88	84	77
Dimetoato	115	97	79	75
Malationa	105	97	94	94
Parationa-etílica	110	102	104	91
Pirimifós-metílico	81	64	75	74
Dieldrin	88	84	80	76
Tetradifona	91	85	84	76
Endrin	93	84	79	77
Heptacloro (p.s)	80	75	71	67

Observa-se que aumentando a quantidade de C18 adicionado na etapa de *clean up* os valores de recuperação diminuem. Quantidades de 700 e 800 mg reduziram os percentuais de recuperação, apresentando recuperações abaixo dos valores aceitos. A quantidade que apresentou melhor relação custo/benefício, foi a de 500 mg, embora a quantidade de 600 mg também tenha apresentado bons resultados, mas deve-se considerar também o custo do material.

A partir dos resultados dos ensaios de extração e de *clean up*, obteve-se o procedimento de extração e *clean up* otimizado, como apresenta a Figura 8.

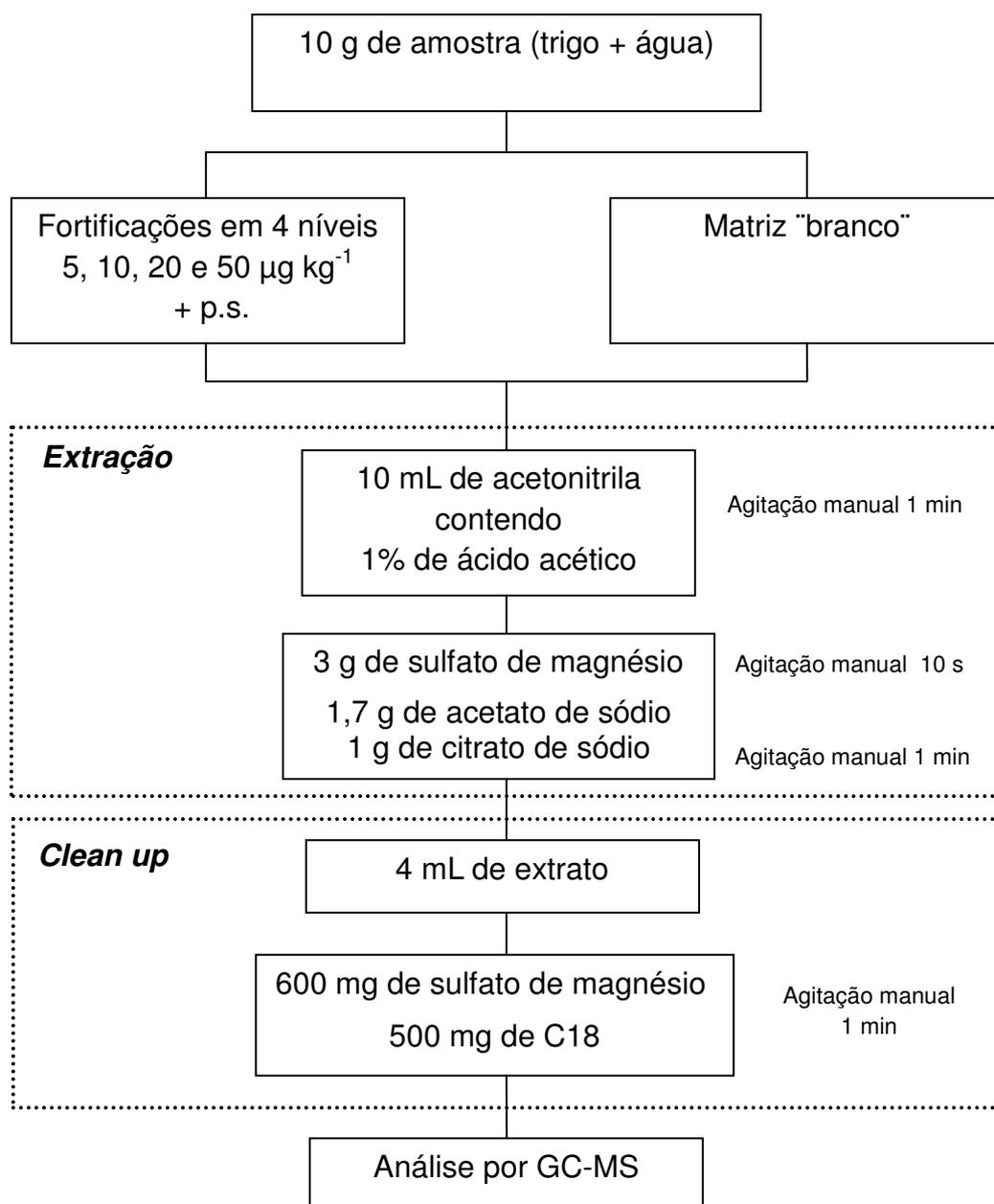


Figura 8. Representação esquemática do método de extração e *clean up*

4.3.4 Análise dos solventes e reagentes pelo método de extração QuEChERS modificado

Visando avaliar a pureza dos solventes e reagentes através do método de extração otimizado de acordo com a Figura 8, onde realizou-se a extração sem a presença da amostra, utilizando-se somente acetonitrila e água e todos os demais reagentes. Não se observou nenhuma contaminação, a Figura 9 apresenta o cromatograma obtido, onde nenhum sinal significativo nos tempos de retenção dos compostos estudados foi encontrado.

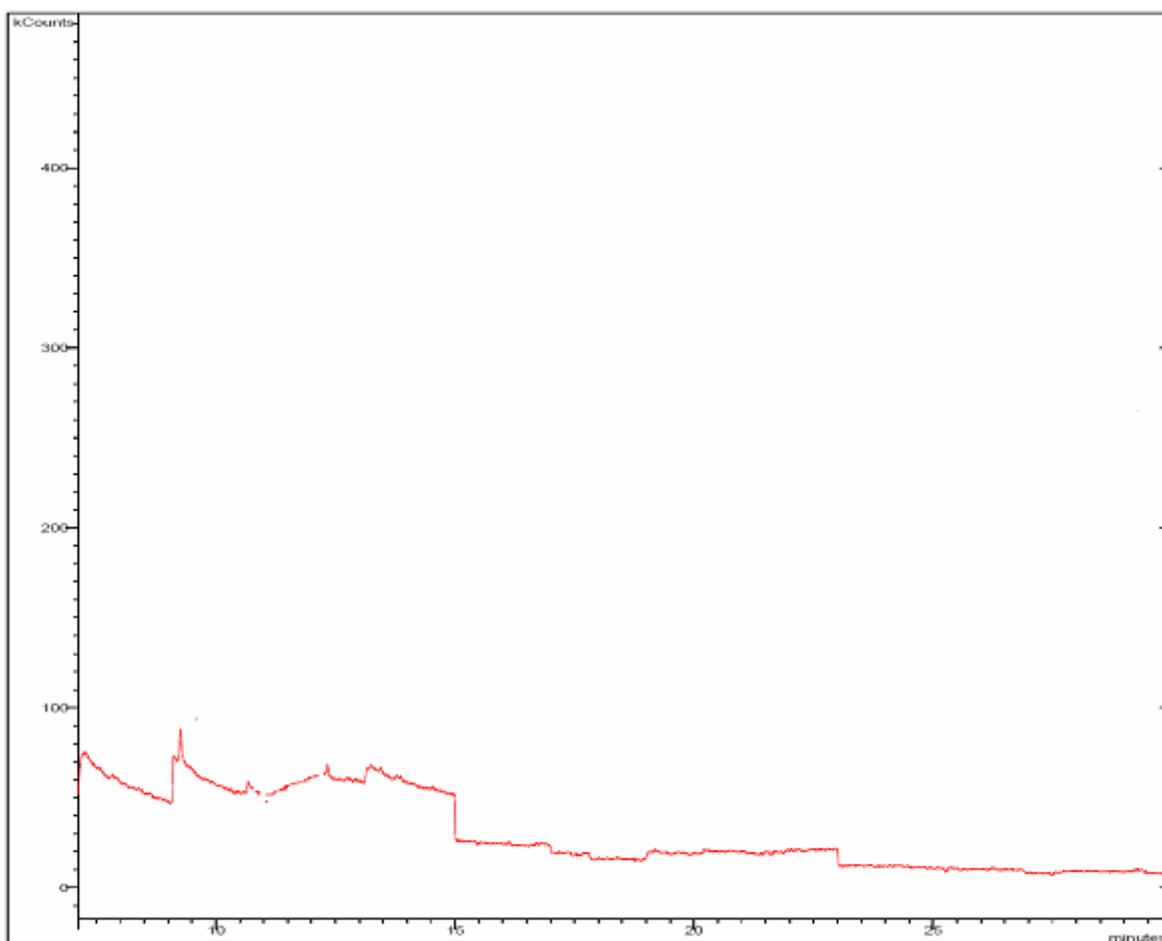


Figura 9. Cromatograma total obtido por GC-MS modo CI negativo para análise dos solventes e reagentes

4.3.5 Avaliação das amostras para a etapa de validação

A Figura 10, apresenta os cromatogramas dos extratos "branco" para cada uma das matrizes em estudo, que foram utilizadas para a construção das curvas analíticas e os ensaios de fortificações. Em cada uma das matrizes (exceto pão) constatou-se a presença de resíduos de pesticidas, onde para os compostos identificados, efetuou-se sua integração e obtenção da área, que foi compensada subtraindo-se os valores de área encontrados para os cálculos da curva analítica e fortificações. A única matriz que não apresentou contaminação de resíduos foi o pão.

Nos extratos "branco" foram identificados os seguintes compostos: para o trigo, constatou-se a presença de malationa, clorpirifós-metílico e permetrina-cis, na farinha ocorreu a presença de fenitrotiona, bifentrina, cialotrina, cipermetrina, clorpirifós-etílico, pirimifós-metílico e tetradifona e no farelo a presença de cipermetrina e clorpirifós-etílico. Embora, tenha-se verificado a presença de alguns resíduos de pesticidas, as concentrações encontradas foram muito baixas, de modo que as amostras "branco" puderam ser utilizadas neste estudo, após a devida compensação dos valores de área encontrados.

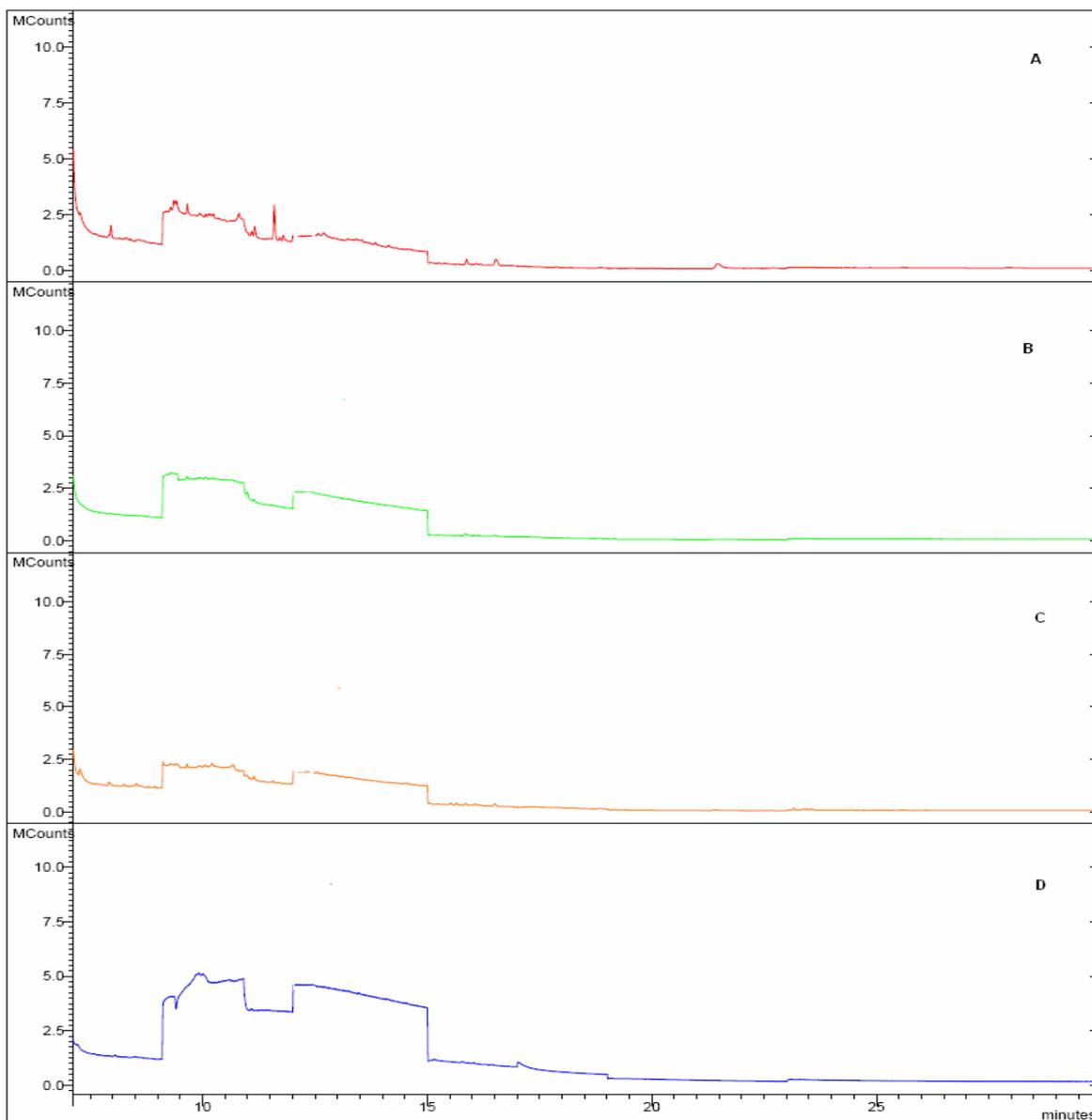


Figura 10. Cromatograma total obtido por GC-MS (NCI) modo SIM, para os extratos "branco" do trigo (A); farinha (B); farelo (C) e pão (D)

4.4 Avaliação do efeito matriz para os extratos de trigo, farinha farelo e pão nas análises por GC-MS

Efeito matriz é o efeito observado pelo aumento ou decréscimo na resposta do detector, para um determinado analito, presente no extrato da matriz, comparado com a resposta do detector para o analito em solvente orgânico. O efeito matriz sempre sofre variações ao longo do tempo e também varia dependendo da condição do instrumento utilizado, devendo, por isso, ser constantemente avaliado, tanto na etapa de desenvolvimento do método quanto na aplicação deste método nas análises de rotina.

As Figuras 12 a 15 apresentam as variações do efeito matriz para cada amostra em estudo, onde observa-se o considerável efeito positivo para a grande maioria dos compostos, e para outros efeito negativo, principalmente para a matriz do pão.

Várias são as interpretações no comportamento das inclinações das retas construídas na matriz, não devendo ser ignoradas pelo analista na quantificação dos pesticidas. Para isto, soluções analíticas preparadas em extratos da matriz são essencialmente importantes, quando as amostras são complexas.

Assim, com a constatação da presença do efeito matriz nas curvas analíticas dos pesticidas estudados, confirmou-se a importância do uso destas preparadas no extrato da matriz para a quantificação de resíduos de pesticidas em extratos de trigo, farinha, farelo e pão, analisados por GC-MS no modo SIM.

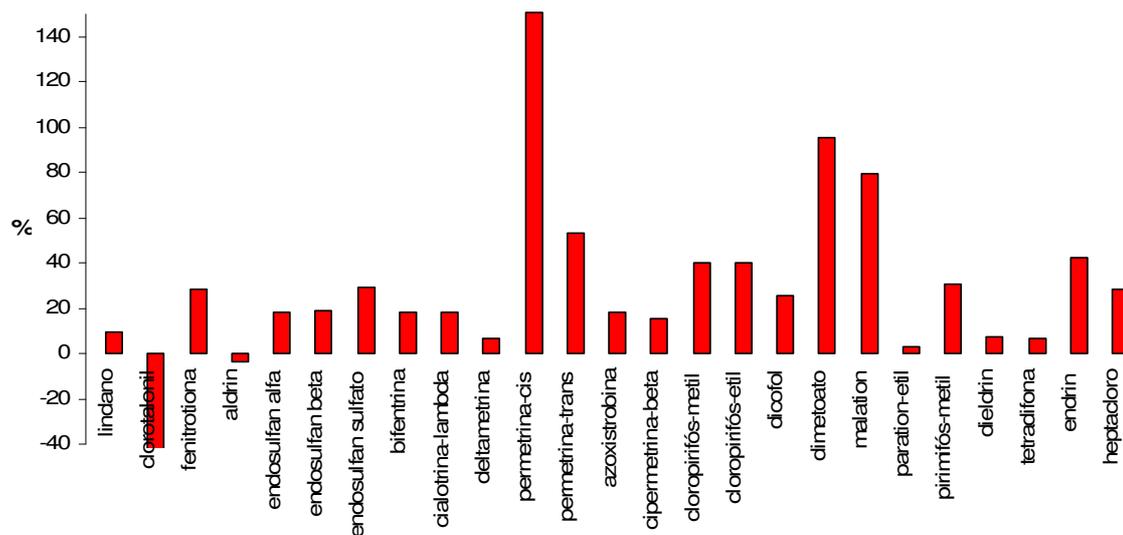


Figura 11. Percentual de efeito matriz para o extrato do trigo

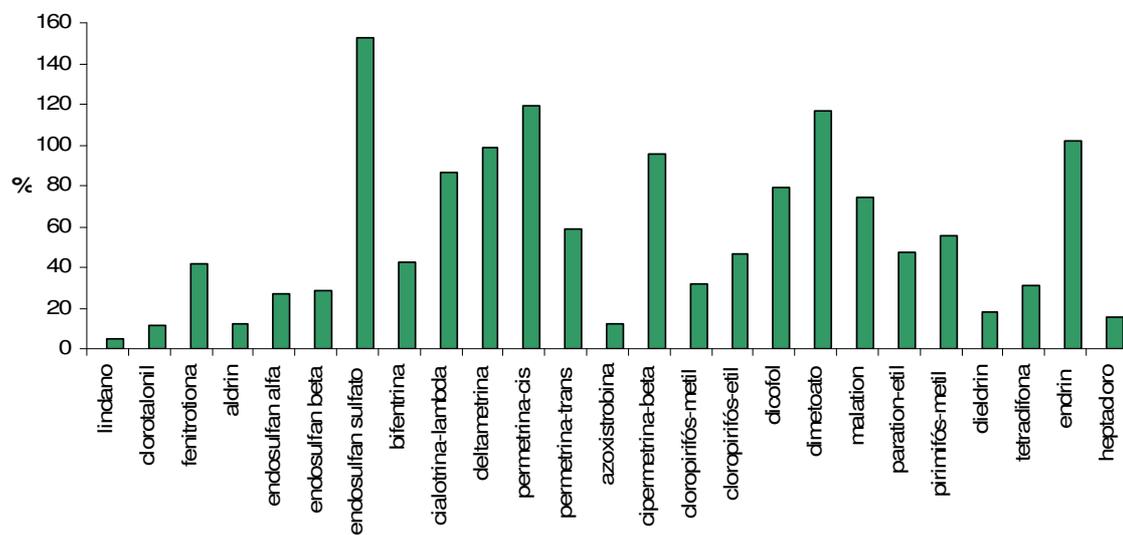


Figura 12. Percentual de efeito matriz para o extrato da farinha

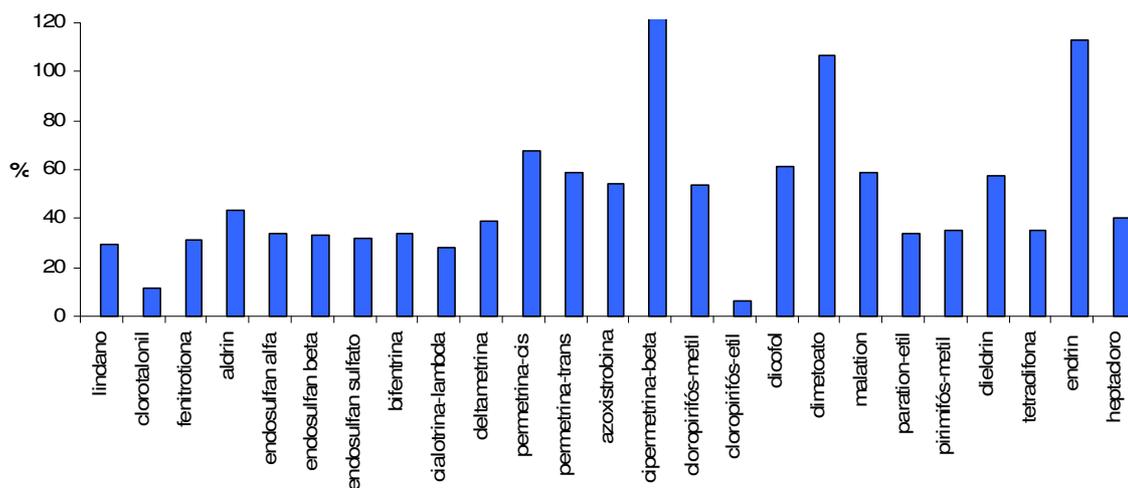


Figura 13. Percentual de efeito matriz para o extrato do farelo

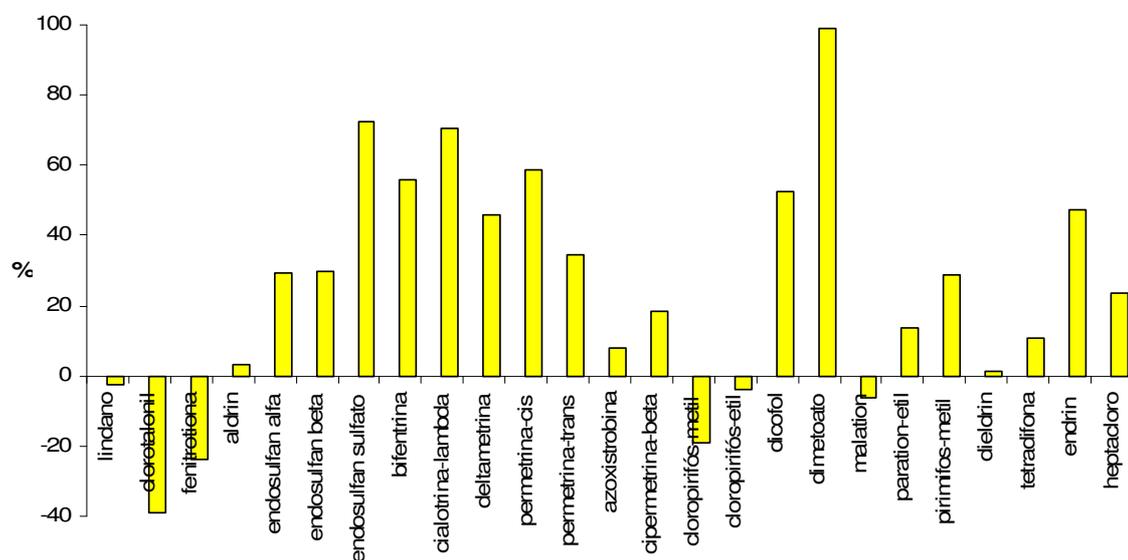


Figura 14. Percentual de efeito matriz para o extrato do pão

4.5 Validação do método QuEChERS modificado para análise multirresíduo em trigo, farinha, farelo e pão

4.5.1 Determinação da linearidade

As curvas analíticas para determinação da linearidade foram construídas com quatro injeções sucessivas de cada ponto, iniciando da menor para a maior concentração, onde utilizou-se a média das áreas para a construção das curvas.

As Tabelas 14, 15, 16 e 17 apresentam os resultados das curvas analíticas obtidas para o trigo, farinha, farelo e pão respectivamente, cada curva foi preparada no seu respectivo extrato da matriz.

Analisando as equações das curvas analíticas, pode-se concluir que o modelo é linear e adequado para a grande maioria dos pesticidas em estudo, pois forneceram coeficientes de determinação (r^2) maiores que 0,99, o que demonstra que o método fornece resultados diretamente proporcionais à concentração do composto em estudo, dentro da faixa de aplicação.

Os pesticidas que apresentaram coeficientes de determinação menores que 0,99 foram: bifentrina na matriz farelo, e sete pesticidas na matriz pão, sendo que para o dimetoato não se obteve relação linear, de modo que não foi construída a sua curva analítica em virtude do efeito matriz. Na prática, as curvas devem ser definidas por no mínimo cinco pontos, que não incluem o ponto zero (THOMPSON *et al.*, 2002). Neste estudo, utilizou-se sete pontos para a construção das curvas analíticas.

Tabela 14. Parâmetros relativos às curvas analíticas, obtidos para os pesticidas no extrato do trigo e analisados por GC-MS

Pesticida	Intervalo Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Equação da curva
Lindano	1,0 - 100,0	0,9957	$y = 88495x - 25021$
Clorotalonil	1,0 - 100,0	0,9996	$y = 321731x - 34737$
Fenitrotiona	1,0 - 100,0	0,9999	$y = 740975x + 648879$
Aldrin	1,0 - 100,0	0,9964	$y = 184908x + 502003$
Endosulfan alfa	1,0 - 100,0	0,9992	$y = 462042x + 483901$
Endosulfan beta	1,0 - 100,0	0,9998	$y = 501317x + 486261$
Endosulfan sulfato	1,0 - 100,0	0,9999	$y = 308266x + 232440$
Bifentrina	1,0 - 100,0	0,9992	$y = 3E+06x + 4E+06$
Cialotrina-lambda	1,0 - 100,0	0,9999	$y = 3E+06x + 3E+06$
Deltametrina	1,0 - 100,0	0,9998	$y = 84814x + 16746$
Permetrina-cis	1,0 - 100,0	0,9983	$y = 138343x + 33327$
Permetrina-trans	1,0 - 100,0	0,9999	$y = 164769x + 144639$
Azoxistrobina	1,0 - 100,0	1,0000	$y = 597768x + 259695$
Cipermetrina-beta	1,0 - 100,0	0,9998	$y = 2E+06x + 3E+06$
Clorpirifós-metílico	1,0 - 100,0	0,9990	$y = 2E+06x + 2E+06$
Clorpirifós-etílico	1,0 - 100,0	0,9993	$y = 1E+06x + 2E+06$
Dicofol	1,0 - 100,0	0,9996	$y = 672708x - 36292$
Dimetoato	1,0 - 100,0	0,9994	$y = 385101x + 548171$
Malationa	1,0 - 100,0	0,9997	$y = 690617x + 595137$
Parationa-etílica	1,0 - 100,0	1,0000	$y = 745914x + 473852$
Pirimifós-metílico	1,0 - 100,0	1,0000	$y = 48604x + 26324$
Dieldrin	1,0 - 100,0	0,9992	$y = 232781x + 266223$
Tetradifona	1,0 - 100,0	0,9997	$y = 5E+06x + 5E+06$
Endrin	1,0 - 100,0	0,9991	$y = 112804x + 180840$
Heptacloro (p.s.)	1,0 - 100,0	0,9967	$y = 57869x - 26400$

Tabela 15. Parâmetros relativos às curvas analíticas, obtidos para os pesticidas no extrato da farinha e analisados por GC-MS

Pesticida	Intervalo Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Equação da curva
Lindano	2,0 - 200,0	0,9999	$y = 694968x + 414757$
Clorotalonil	2,0 - 200,0	0,9999	$y = 170259x - 309336$
Fenitrotiona	2,0 - 200,0	0,9998	$y = 81073x + 31210$
Aldrin	2,0 - 200,0	0,9965	$y = 68968x + 357266$
Endosulfan alfa	2,0 - 200,0	0,9998	$y = 273672x + 243728$
Endosulfan beta	2,0 - 200,0	1,0000	$y = 278315x - 18546$
Endosulfan sulfato	2,0 - 200,0	0,9999	$y = 446963x + 329734$
Bifentrina	2,0 - 200,0	0,9991	$y = 415153x + 1E+06$
Cialotrina-lambda	2,0 - 200,0	1,0000	$y = 493317x + 68570$
Deltametrina	2,0 - 200,0	1,0000	$y = 45046x - 8651.7$
Permetrina-cis	2,0 - 200,0	0,9999	$y = 20084x + 1694$
Permetrina-trans	2,0 - 200,0	1,0000	$y = 20819x - 3350.8$
Azoxistrobina	2,0 - 200,0	1,0000	$y = 97236x - 83034$
Cipermetrina-beta	2,0 - 200,0	1,0000	$y = 305983x + 376513$
Clorpirifós-metílico	2,0 - 200,0	0,9999	$y = 503957x + 213542$
Clorpirifós-etílico	2,0 - 200,0	0,9993	$y = 566369x + 2E+06$
Dicofol	2,0 - 200,0	1,0000	$y = 428633x - 341805$
Dimetoato	2,0 - 200,0	1,0000	$y = 38415x + 16512$
Malationa	2,0 - 200,0	0,9999	$y = 160342x + 39428$
Parationa-etílica	2,0 - 200,0	0,9999	$y = 52275x + 17493$
Pirimifós-metílico	2,0 - 200,0	1,0000	$y = 21455x - 5629.1$
Dieldrin	2,0 - 200,0	0,9999	$y = 123520x + 44933$
Tetradifona	2,0 - 200,0	0,9999	$y = 1E+06x + 595550$
Endrin	2,0 - 200,0	0,9998	$y = 35227x + 27341$
Heptacloro (p.s.)	2,0 - 200,0	0,9989	$y = 65276x - 34172$

Tabela 16. Parâmetros relativos às curvas analíticas, obtidos para os pesticidas no extrato do farelo e analisados por GC-MS

Pesticida	Intervalo Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Equação da curva
Lindano	2,0 - 200,0	0,9981	$y = 525285x + 480829$
Clorotalonil	2,0 - 200,0	0,9985	$y = 74159x - 214501$
Fenitrotiona	2,0 - 200,0	0,9987	$y = 128301x + 93494$
Aldrin	2,0 - 200,0	0,9983	$y = 77190x + 281157$
Endosulfan alfa	2,0 - 200,0	0,9957	$y = 255711x + 440879$
Endosulfan beta	2,0 - 200,0	0,9993	$y = 257484x + 161669$
Endosulfan sulfato	2,0 - 200,0	0,9999	$y = 312608x - 159310$
Bifentrina	2,0 - 200,0	0,9896	$y = 500725x + 2E+06$
Cialotrina-lambda	2,0 - 200,0	0,9993	$y = 740799x + 169965$
Deltametrina	2,0 - 200,0	0,9998	$y = 38425x - 44935$
Permetrina-cis	2,0 - 200,0	0,9971	$y = 29793x - 964.39$
Permetrina-trans	2,0 - 200,0	0,9990	$y = 32918x - 12329$
Azoxistrobina	2,0 - 200,0	0,9997	$y = 90807x - 156781$
Cipermetrina-beta	2,0 - 200,0	0,9993	$y = 319987x + 1E+06$
Clorpirifós-metílico	2,0 - 200,0	0,9970	$y = 445940x + 802295$
Clorpirifós-etílico	2,0 - 200,0	0,9900	$y = 572414x + 2E+06$
Dicofol	2,0 - 200,0	0,9999	$y = 511655x - 223393$
Dimetoato	2,0 - 200,0	0,9999	$y = 35734x + 48172$
Malationa	2,0 - 200,0	0,9959	$y = 146715x + 265883$
Parationa-etílica	2,0 - 200,0	0,9969	$y = 118238x + 99553$
Pirimifós-metílico	2,0 - 200,0	0,9993	$y = 23589x - 12052$
Dieldrin	2,0 - 200,0	0,9979	$y = 137716x + 67359$
Tetradifona	2,0 - 200,0	0,9982	$y = 2E+06x + 1E+06$
Endrin	2,0 - 200,0	0,9943	$y = 52273x - 134051$
Heptacloro (p.s.)	2,0 - 200,0	0,9999	$y = 59639x - 27105$

Tabela 17. Parâmetros relativos às curvas analíticas, obtidos para os pesticidas no extrato do pão e analisados por GC-MS

Pesticida	Intervalo Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Equação da curva
Lindano	1,0 - 100,0	0,9981	$y = 313774x + 208982$
Clorotalonil	1,0 - 100,0	0,9952	$y = 48953x + 5817.5$
Fenitrotiona	1,0 - 100,0	0,9864	$y = 72329x + 42067$
Aldrin	1,0 - 100,0	0,9982	$y = 143218x - 68218$
Endosulfan alfa	1,0 - 100,0	0,9988	$y = 265150x + 200647$
Endosulfan beta	1,0 - 100,0	0,9983	$y = 288112x + 306518$
Endosulfan sulfato	1,0 - 100,0	0,9911	$y = 433838x + 486547$
Bifentrina	1,0 - 100,0	0,9975	$y = 563966x + 822957$
Cialotrina-lambda	1,0 - 100,0	0,9936	$y = 551385x + 736564$
Deltametrina	1,0 - 100,0	0,9755	$y = 18875x + 22004$
Permetrina-cis	1,0 - 100,0	0,9971	$y = 10349x + 14048$
Permetrina-trans	1,0 - 100,0	0,9899	$y = 14736x + 31974$
Azoxistrobina	1,0 - 100,0	0,9888	$y = 109167x - 23173$
Cipermetrina-beta	1,0 - 100,0	0,9789	$y = 163837x + 390991$
Clorpirifós-metílico	1,0 - 100,0	0,9921	$y = 306375x + 35078$
Clorpirifós-etílico	1,0 - 100,0	0,9842	$y = 673192x + 211615$
Dicofol	1,0 - 100,0	0,9939	$y = 176621x + 41635$
Dimetoato	1,0 - 100,0	-	-
Malationa	1,0 - 100,0	0,9767	$y = 84900x + 51746$
Parationa-etílica	1,0 - 100,0	0,9932	$y = 137087x + 110675$
Pirimifós-metílico	1,0 - 100,0	0,9933	$y = 17958x + 26329$
Dieldrin	1,0 - 100,0	0,9955	$y = 137389x - 2485.9$
Tetradifona	1,0 - 100,0	0,9985	$y = 3E+06x + 2E+06$
Endrin	1,0 - 100,0	0,9901	$y = 51354x + 21601$
Heptacloro (p.s.)	1,0 - 100,0	0,9954	$y = 113931x + 12021$

4.5.2 Determinação da estimativa do LOD e LOQ

A partir das soluções padrões utilizadas para avaliar a linearidade, calculou-se os valores estimados dos LOD_i , LOD_m e LOQ_i que estão apresentados nas Tabelas 18 e 19.

Aplicando-se a Equação 3, obteve-se os valores de LOD_i a partir das soluções analíticas preparadas no extrato da matriz. Quando a solução analítica de menor concentração apresentava um valor calculado de LOD_i , esta concentração era considerada a menor concentração detectável, para um determinado pesticida. Uma vez que, estes valores são estimados, aplica-se uma margem de segurança para o resultado final, ou seja, mesmo que os valores calculados do LOD_i , sejam maiores ou menores que a concentração da solução analítica, o valor do LOD_i sempre será a concentração da respectiva solução.

Multiplicando-se o valor estimado do LOD_i pelo fator obtido para o método de extração (fator = 2,5 para o trigo, farinha e farelo, e 2,0 para o pão), obteve-se a estimativa do LOD_m , em $\mu\text{g kg}^{-1}$. A partir do LOD_i , aplicou-se a Equação 4, onde obteve-se o LOQ_i . Para determinação da estimativa do LOQ_m , considerou-se a menor concentração que, ao ser fortificada na matriz, apresentaria recuperações entre 70 e 120%, com RSD% menor ou igual a 20%.

Para a grande maioria dos compostos, observa-se que o LOQ do método é de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$, pois é o primeiro nível de fortificação que apresentou as recuperações entre 70 e 120%. Para o trigo, obteve-se 8 compostos que apresentaram recuperações maiores que 120%: clorotalonil, fenitrotona, azoxistrobina, clorpirifós-metílico, dimetoato, malationa, parationa-etílica e pirimifós-metílico, deste modo, o valor de LOQ foi o próximo nível de fortificação, ou seja a concentração de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, que apresentou as recuperações satisfatórias.

Para os extratos da farinha, todos os compostos apresentaram valores de LOQ de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$, já os extratos do farelo, cinco compostos apresentaram valores de LOQ na concentração de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para os extratos do pão, obteve-se valores de LOQ de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ para endosulfan alfa e beta, clorpirifós-metílico, dicofol e tetradifona. LOQ de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ obtiveram os compostos permetrina-cis e trans. Para dimetoato e bifentrina, não foi possível estimar seus valores de LOQ,

pois os 4 níveis de fortificação apresentaram valores de recuperações fora da faixa de 70 a 120%.

Tabela 18. Valores calculados para o LOD e LOQ, do instrumento e do método, nos extratos do trigo e farinha para os pesticidas analisados por GC-MS

Pesticidas	Trigo				Farinha			
	LOD _i	LOD _m	LOQ _i	LOQ _m	LOD _i	LOD _m	LOQ _i	LOQ _m
Lindano	1,0	2,5	3,3	5,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Clorotalonil	1,0	2,5	3,3	10,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Fenitrotiona	1,0	2,5	3,3	10,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Aldrin	1,0	2,5	3,3	5,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Endosulfan alfa	1,0	2,5	3,3	5,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Endosulfan beta	1,0	2,5	3,3	5,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Endosulfan sulfato	1,0	2,5	3,3	5,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Bifentrina	1,0	2,5	3,3	5,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Cialotrina-lambda	1,0	2,5	3,3	5,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Deltametrina	1,0	2,5	3,3	5,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Permetrina-cis	1,0	2,5	3,3	5,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Permetrina-trans	1,0	2,5	3,3	5,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Azoxistrobina	1,0	2,5	3,3	10,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Cipermetrina-beta	1,0	2,5	3,3	5,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Clorpirifós-metílico	1,0	2,5	3,3	10,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Clorpirifós-etílico	1,0	2,5	3,3	5,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Dicofol	1,0	2,5	3,3	5,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Dimetoato	1,0	2,5	3,3	10,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Malationa	1,0	2,5	3,3	10,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Parationa-etílica	1,0	2,5	3,3	10,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Pirimifós-metílico	1,0	2,5	3,3	10,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Dieldrin	1,0	2,5	3,3	5,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Tetradifona	1,0	2,5	3,3	5,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Endrin	1,0	2,5	3,3	5,0	2,0	5,0	6,6	5,0
Heptacloro (p.s.)	1,0	2,5	3,3	5,0	2,0	5,0	6,6	5,0

LOD_i e LOQ_i= $\mu\text{g L}^{-1}$

LOD_m e LOQ_m= $\mu\text{g kg}^{-1}$

Tabela 19. Valores calculados para o LOD e LOQ, do instrumento e do método, nos extratos do farelo e do pão, para os pesticidas analisados por GC-MS

Pesticidas	Farelo				Pão			
	LOD _i	LOD _m	LOQ _i	LOQ _m	LOD _i	LOD _m	LOQ _i	LOQ _m
Lindano	2,0	5,0	6,6	5,0	1,0	2,0	3,3	5,0
Clorotalonil	2,0	5,0	6,6	5,0	1,0	2,0	3,3	5,0
Fenitrotiona	2,0	5,0	6,6	10,0	1,0	2,0	3,3	5,0
Aldrin	2,0	5,0	6,6	5,0	1,0	2,0	3,3	5,0
Endosulfan alfa	2,0	5,0	6,6	5,0	1,0	2,0	3,3	20,0
Endosulfan beta	2,0	5,0	6,6	5,0	1,0	2,0	3,3	20,0
Endosulfan sulfato	2,0	5,0	6,6	5,0	1,0	2,0	3,3	5,0
Bifentrina	2,0	5,0	6,6	5,0	1,0	2,0	3,3	-
Cialotrina-lambda	2,0	5,0	6,6	5,0	1,0	2,0	3,3	5,0
Deltametrina	2,0	5,0	6,6	5,0	1,0	2,0	3,3	5,0
Permetrina-cis	2,0	5,0	6,6	5,0	1,0	2,0	3,3	50,0
Permetrina-trans	2,0	5,0	6,6	5,0	1,0	2,0	3,3	50,0
Azoxistrobina	2,0	5,0	6,6	10,0	1,0	2,0	3,3	5,0
Cipermetrina-beta	2,0	5,0	6,6	5,0	1,0	2,0	3,3	5,0
Clorpirifós-metílico	2,0	5,0	6,6	5,0	1,0	2,0	3,3	20,0
Clorpirifós-etílico	2,0	5,0	6,6	5,0	1,0	2,0	3,3	5,0
Dicofol	2,0	5,0	6,6	5,0	1,0	2,0	3,3	20,0
Dimetoato	2,0	5,0	6,6	10,0	-	-	-	-
Malationa	2,0	5,0	6,6	5,0	1,0	2,0	3,3	5,0
Parationa-etílica	2,0	5,0	6,6	10,0	1,0	2,0	3,3	5,0
Pirimifós-metílico	2,0	5,0	6,6	10,0	1,0	2,0	3,3	5,0
Dieldrin	2,0	5,0	6,6	5,0	1,0	2,0	3,3	5,0
Tetradifona	2,0	5,0	6,6	5,0	1,0	2,0	3,3	20,0
Endrin	2,0	5,0	6,6	5,0	1,0	2,0	3,3	5,0
Heptacloro (p.s.)	2,0	5,0	6,6	5,0	1,0	2,0	3,3	5,0

LOD_i e LOQ_i= $\mu\text{g L}^{-1}$

LOD_m e LOQ_m= $\mu\text{g kg}^{-1}$

4.5.3 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária)

Dentre os critérios estabelecidos para validação de métodos analíticos empregados para análise de resíduos de pesticidas em alimentos estão a faixa percentual de recuperação aceita para métodos multirresíduos que deve ser de 70 a 120% (SANCO, 2007), com valor de RSD que não deve ser superior a 20%. Assim, estes foram os critérios estabelecidos para esse estudo.

Os resultados da precisão em termos de repetitividade e precisão intermediária obtidos para a maioria das concentrações são aceitáveis, uma vez que estão dentro do limite. Os valores estão apresentados nas Tabelas 20 a 27.

Avaliando-se as Tabelas de todas as matrizes estudadas, observa-se que a matriz que obteve os melhores resultados foi a farinha, pois apresentou 100% dos valores para todas as matrizes de fortificação, dentro dos critérios estabelecidos acima. Para o trigo, obteve-se oito compostos que apresentaram recuperações acima de 120% para o nível de fortificação $5 \mu\text{g kg}^{-1}$, para os demais níveis somente o composto aldrin apresentou recuperação abaixo de 70%. A matriz farelo, apresentou cinco compostos com recuperações acima de 120% para o nível de fortificação $5 \mu\text{g kg}^{-1}$, um composto também acima do limite no nível de fortificação $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, um composto acima e um abaixo dos limites no nível de fortificação $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, e no nível $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, obteve-se dez compostos acima da faixa de recuperação de 120% e um composto abaixo de 70% de recuperação.

Tabela 20. Médias dos percentuais de recuperação e RSD% para a repetitividade, obtidas para a extração do trigo

Pesticidas	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	5		10		20		50	
	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%
Lindano	113	2,9	89	1,9	91	0,4	91	0,3
Clorotalonil	131	3,1	94	3,8	95	1,7	102	1,9
Fenitrotiona	137	1,9	102	6,0	98	0,2	99	2,9
Aldrin	87	19,1	67	0,9	67	1,2	66	1,0
Endosulfan alfa	106	0,9	82	0,7	81	0,9	82	1,1
Endosulfan beta	103	2,7	83	0,6	83	1,4	89	2,0
Endosulfan sulfat.	104	3,9	88	3,4	93	2,0	95	1,5
Bifentrina	94	0,7	75	1,7	73	0,8	76	1,4
Cialotrina-lambda	117	1,2	91	2,1	90	0,6	89	0,6
Deltametrina	114	1,3	90	4,2	88	0,2	85	1,1
Permetrina-cis	119	11,9	75	5,7	71	2,1	70	0,7
Permetrina-trans	102	3,4	78	2,9	75	0,5	75	0,6
Azoxistrobina	125	0,1	96	3,1	93	2,2	92	0,8
Cipermetrina-beta	111	5,5	90	1,7	87	1,4	85	2,0
Clorpirifós-metílico	127	1,3	96	3,5	92	1,7	90	1,8
Clorpirifós-etílico	115	1,8	90	1,5	87	1,3	82	1,6
Dicofol	101	7,1	83	0,4	82	1,2	85	1,8
Dimetoato	131	5,6	93	4,1	95	4,2	90	2,0
Malationa	138	0,6	100	5,4	90	2,0	83	3,3
Parationa-etílica	122	3,6	98	3,4	93	2,3	91	3,4
Pirimifós-metílico	134	4,4	97	5,7	89	2,8	89	2,0
Dieldrin	105	2,9	79	4,0	81	0,4	83	0,8
Tetradifona	106	3,3	85	3,1	84	1,2	87	0,3
Endrin	109	5,3	80	4,9	81	0,7	83	0,5
Heptacloro (p.s.)	97	2,4	78	1,6	78	0,1	82	1,8

Tabela 21. Médias dos percentuais de recuperação e RSD% para a precisão intermediária, obtidas para a extração do trigo

Pesticidas	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	5		10		20		50	
	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%
Lindano	108	6,1	92	4,5	95	5,0	96	7,6
Clorotalonil	131	1,0	102	11,5	102	8,7	108	8,0
Fenitrotiona	113	29,6	103	1,0	95	5,4	102	4,4
Aldrin	75	21,3	65	4,4	67	1,4	71	9,1
Endosulfan alfa	96	15,0	84	2,4	84	3,6	88	8,9
Endosulfan beta	87	25,2	86	4,0	81	3,8	94	8,0
Endosulfan sulfat.	101	3,8	94	9,2	94	1,5	101	8,6
Bifentrina	83	18,7	75	0,1	75	3,5	81	9,1
Cialotrina-lambda	109	10,1	92	1,4	92	2,7	94	7,4
Deltametrina	107	8,9	88	3,0	90	2,2	92	10,6
Permetrina-cis	93	29,3	70	9,7	72	2,7	77	12,6
Permetrina-trans	88	21,7	78	0,3	77	4,9	83	12,4
Azoxistrobina	120	6,6	98	2,6	99	8,8	102	14,0
Cipermetrina-beta	102	12,7	92	1,9	91	7,2	92	11,4
Clorpirifós-metílico	111	19,4	96	0,7	93	2,0	96	9,0
Clorpirifós-etílico	100	21,1	90	0,0	90	4,0	90	12,4
Dicofol	99	2,6	88	7,9	87	7,6	89	6,6
Dimetoato	121	11,4	104	13,9	99	6,5	102	15,5
Malationa	124	16,0	102	2,5	95	7,1	98	21,7
Parationa-etílica	109	17,2	105	9,2	93	0,6	95	5,8
Pirimifós-metílico	109	32,1	95	2,5	88	1,3	97	10,8
Dieldrin	99	9,0	82	4,7	83	3,4	88	8,6
Tetradifona	90	24,2	85	0,5	84	0,0	93	9,2
Endrin	96	19,3	82	3,5	81	0,6	88	8,7
Heptacloro (p.s.)	82	25,3	78	1,0	76	3,7	83	2,1

Tabela 22. Médias dos percentuais de recuperação e RSD% para a repetitividade, obtidas para a extração da farinha

Pesticidas	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	5		10		20		50	
	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%
Lindano	105	1,3	95	1,6	99	2,6	97	1,0
Clorotalonil	120	8,5	100	4,1	100	5,0	101	3,0
Fenitrotiona	101	13,1	93	1,8	111	6,6	110	3,9
Aldrin	81	13,1	78	4,9	73	5,4	73	0,9
Endosulfan alfa	95	1,0	86	0,5	89	1,6	88	1,8
Endosulfan beta	89	4,6	89	0,3	96	1,6	94	1,1
Endosulfan sulfat.	88	5,2	93	2,0	104	3,1	97	2,8
Bifentrina	82	2,6	73	10,4	80	2,1	79	2,1
Cialotrina-lambda	100	2,2	93	0,8	96	2,0	94	1,3
Deltametrina	101	2,8	89	0,9	92	1,1	92	1,6
Permetrina-cis	82	11,2	75	3,5	79	1,0	85	0,8
Permetrina-trans	95	8,6	87	5,9	86	3,1	86	1,1
Azoxistrobina	106	5,5	99	1,1	100	0,9	98	2,7
Cipermetrina-beta	98	2,3	90	4,5	97	1,8	93	1,6
Clorpirifós-metílico	104	3,3	96	1,5	101	4,2	99	2,6
Clorpirifós-etílico	90	2,8	91	0,9	95	1,7	92	2,5
Dicofol	93	2,5	84	0,3	90	1,9	91	3,0
Dimetoato	117	7,8	97	7,2	103	6,4	104	1,3
Malationa	119	4,0	96	0,9	104	4,2	99	1,1
Parationa-etílica	88	13,0	82	2,4	106	6,6	103	6,1
Pirimifós-metílico	93	3,0	93	2,6	98	4,0	93	2,2
Dieldrin	100	14,2	85	3,2	91	0,5	87	1,6
Tetradifona	101	0,7	85	1,2	93	2,8	92	0,8
Endrin	93	7,2	82	2,3	90	3,2	89	1,6
Heptacloro (p.s.)	82	7,0	78	1,4	83	3,2	88	2,1

Tabela 23. Médias dos percentuais de recuperação e RSD% para a precisão intermediária, obtidas para a extração da farinha

Pesticidas	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	5		10		20		50	
	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%
Lindano	98	9,8	92	4,4	95	5,8	95	5,8
Clorotalonil	115	6,0	96	4,8	95	6,4	95	6,4
Fenitrotiona	104	4,5	95	2,6	104	10,6	104	10,6
Aldrin	82	2,3	74	6,9	71	3,5	71	3,5
Endosulfan alfa	93	2,8	85	1,4	86	4,0	86	4,0
Endosulfan beta	91	4,3	88	1,4	92	7,2	92	7,2
Endosulfan sulfat.	89	2,6	93	0,2	99	7,0	99	7,0
Bifentrina	80	3,6	73	0,5	77	4,8	77	4,8
Cialotrina-lambda	96	6,8	90	4,4	93	5,1	93	5,1
Deltametrina	94	10,5	88	1,9	89	4,0	89	4,0
Permetrina-cis	85	4,8	77	3,5	78	1,7	78	1,7
Permetrina-trans	90	7,7	83	6,7	83	4,2	83	4,2
Azoxistrobina	106	0,4	99	0,4	99	2,4	99	2,4
Cipermetrina-beta	91	9,9	88	4,0	93	6,7	93	6,7
Clorpirifós-metílico	105	1,4	97	0,7	96	6,4	96	6,4
Clorpirifós-etílico	91	1,4	90	1,8	93	3,8	93	3,8
Dicofol	96	4,7	86	2,3	89	2,9	89	2,9
Dimetoato	104	17,2	99	2,9	102	1,9	102	1,9
Malationa	101	25,3	89	11,3	99	7,1	99	7,1
Parationa-etílica	90	2,7	85	5,9	99	9,6	99	9,6
Pirimifós-metílico	103	14,2	94	0,8	95	4,0	95	4,0
Dieldrin	98	2,5	86	1,8	88	5,6	88	5,6
Tetradifona	98	4,3	86	0,5	91	3,4	91	3,4
Endrin	93	0,6	84	3,4	87	5,3	87	5,3
Heptacloro (p.s.)	83	2,5	79	2,9	81	3,2	81	3,2

Tabela 24. Médias dos percentuais de recuperação e RSD% para a repetitividade, obtidas para a extração do farelo

Pesticidas	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	5		10		20		50	
	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%
Lindano	117	2,5	88	0,7	99	1,6	104	10,4
Clorotalonil	111	2,9	82	1,7	117	4,2	178	2,3
Fenitrotiona	134	7,5	102	3,2	118	3,4	166	2,9
Aldrin	115	8,2	67	10,1	69	2,4	69	4,2
Endosulfan alfa	97	5,7	79	0,3	83	1,9	87	7,2
Endosulfan beta	95	2,2	82	2,1	90	3,6	91	11,1
Endosulfan sulfat.	108	5,5	89	0,6	115	3,8	150	0,5
Bifentrina	89	1,2	75	0,7	74	2,4	82	5,0
Cialotrina-lambda	113	0,2	89	1,8	92	2,5	103	5,7
Deltametrina	118	8,4	78	7,1	88	1,4	99	5,6
Permetrina-cis	117	9,2	80	8,5	77	5,3	104	4,4
Permetrina-trans	114	2,8	80	4,8	81	2,7	97	7,0
Azoxistrobina	123	2,9	88	2,8	105	5,4	120	9,4
Cipermetrina-beta	96	1,7	79	0,8	111	3,1	126	1,4
Clorpirifós-metílico	113	1,8	90	1,0	103	2,3	126	2,2
Clorpirifós-etílico	102	1,3	87	1,4	92	2,5	103	6,2
Dicofol	106	0,4	83	1,6	89	2,1	98	0,3
Dimetoato	135	1,6	107	2,7	122	3,6	208	6,5
Malationa	119	5,1	99	2,4	109	2,4	142	1,5
Parationa-etílica	141	0,3	96	5,2	103	2,5	169	1,0
Pirimifós-metílico	126	4,0	93	8,4	98	5,2	112	7,0
Dieldrin	115	15,5	78	3,1	85	1,8	88	4,5
Tetradifona	100	0,3	81	0,0	83	3,2	99	5,2
Endrin	112	11,2	78	4,9	89	3,0	96	1,5
Heptacloro (p.s.)	105	2,2	76	4,2	80	2,7	89	3,1

Tabela 25. Médias dos percentuais de recuperação e RSD% para a precisão intermediária, obtidas para a extração do farelo

Pesticidas	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	5		10		20		50	
	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%
Lindano	107	2,1	98	6,9	101	0,4	109	3,3
Clorotalonil	111	15,3	92	2,8	102	8,8	159	6,2
Fenitrotiona	124	12,1	100	2,0	121	2,6	152	7,6
Aldrin	118	9,7	75	5,4	72	0,9	78	6,4
Endosulfan alfa	99	4,7	88	4,5	87	1,6	96	8,3
Endosulfan beta	109	3,0	92	3,6	94	1,1	95	2,0
Endosulfan sulfat.	98	4,3	99	7,9	110	1,4	146	2,7
Bifentrina	99	4,0	83	6,9	84	6,4	85	2,9
Cialotrina-lambda	115	3,5	98	4,4	88	1,3	100	1,0
Deltametrina	120	3,2	80	1,2	89	0,5	97	1,2
Permetrina-cis	115	1,7	85	2,1	71	4,9	114	7,1
Permetrina-trans	112	6,6	98	8,2	86	3,2	108	9,4
Azoxistrobina	120	1,2	98	7,0	100	1,8	117	1,9
Cipermetrina-beta	99	5,0	89	8,1	115	1,9	121	1,8
Clorpirifós-metílico	103	2,4	95	3,7	107	4,2	120	1,6
Clorpirifós-etílico	99	5,3	95	5,5	96	1,8	108	3,0
Dicofol	102	6,0	88	5,5	93	2,7	103	1,9
Dimetoato	125	6,1	122	13,2	121	0,3	188	7,0
Malationa	114	7,6	105	13,3	116	4,0	137	9,7
Parationa-etílica	137	5,6	102	3,9	105	1,4	149	8,4
Pirimifós-metílico	124	5,7	95	2,5	102	2,8	101	6,8
Dieldrin	111	7,1	81	1,7	88	0,5	102	12,6
Tetradifona	99	8,1	101	17,0	86	1,3	115	14,7
Endrin	100	6,0	82	3,6	93	1,5	101	5,2
Heptacloro (p.s.)	108	3,9	81	3,9	87	2,1	98	1,6

Tabela 26. Médias dos percentuais de recuperação e RSD% para a repetitividade, obtidas para a extração do pão

Pesticidas	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	5		10		20		50	
	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%
Lindano	80	3,1	76	6,5	95	2,0	93	2,4
Clorotalonil	110	6,0	78	6,5	99	4,3	122	7,3
Fenitrotiona	74	6,3	62	3,7	100	8,2	119	4,3
Aldrin	73	1,5	51	7,6	58	3,1	58	1,0
Endosulfan alfa	61	2,8	66	1,5	70	6,0	75	1,7
Endosulfan beta	65	10,7	66	8,0	76	7,3	83	3,2
Endosulfan sulfat.	90	2,5	76	6,5	101	6,4	116	6,4
Bifentrina	45	6,7	51	0,5	51	5,5	61	2,9
Cialotrina-lambda	70	5,0	69	2,3	68	8,4	84	7,7
Deltametrina	71	5,7	73	11,5	63	10,6	84	10,1
Permetrina-cis	50	24,4	54	8,7	62	11,8	73	1,9
Permetrina-trans	44	5,2	58	4,4	64	5,8	80	5,8
Azoxistrobina	81	3,0	74	7,6	87	17,6	117	4,4
Cipermetrina-beta	80	7,5	64	2,0	65	8,0	92	8,5
Clorpirifós-metílico	68	1,0	67	1,8	91	6,7	102	4,5
Clorpirifós-etílico	119	0,5	90	1,9	73	11,1	84	5,4
Dicofol	55	7,1	60	0,9	72	4,8	82	3,1
Dimetoato	-	-	-	-	-	-	-	-
Malationa	85	3,6	75	5,4	96	7,9	116	6,3
Parationa-etílica	85	10,1	75	3,9	90	3,1	104	4,8
Pirimifós-metílico	91	7,5	63	8,2	81	5,1	90	5,7
Dieldrin	74	9,4	78	4,6	69	7,3	78	3,0
Tetradifona	67	4,1	68	2,0	79	6,1	87	4,3
Endrin	78	6,6	68	9,0	71	7,4	85	2,7
Heptacloro (p.s.)	73	7,1	67	1,8	65	8,1	75	1,9

Tabela 27. Médias dos percentuais de recuperação e RSD% para a precisão intermediária, obtidas para a extração do pão

Pesticidas	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	5		10		20		50	
	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%	Rec %	RSD%
Lindano	70	9,7	78	2,5	96	4,4	90	7,0
Clorotalonil	100	12,3	72	7,4	95	18,1	114	1,9
Fenitrotiona	65	10,7	66	3,9	95	13,5	111	9,7
Aldrin	75	1,9	54	7,4	60	3,7	62	2,7
Endosulfan alfa	67	10,7	67	2,9	76	12,0	77	4,9
Endosulfan beta	61	5,4	68	4,0	73	5,2	84	3,8
Endosulfan sulfat.	100	9,1	78	0,7	97	6,0	113	4,3
Bifentrina	55	11,5	54	4,6	60	13,1	64	12,7
Cialotrina-lambda	60	10,3	72	2,8	64	5,2	85	3,2
Deltametrina	65	11,1	75	3,2	60	8,8	86	5,9
Permetrina-cis	55	3,3	57	3,1	68	14,4	76	8,2
Permetrina-trans	52	12,8	62	6,8	60	10,8	82	1,4
Azoxistrobina	78	1,8	67	11,3	92	7,7	114	5,4
Cipermetrina-beta	70	8,2	68	8,6	68	0,8	88	2,9
Clorpirifós-metílico	73	9,6	70	4,9	95	8,2	98	3,9
Clorpirifós-etílico	108	8,4	92	3,2	77	14,0	80	8,8
Dicofol	64	6,9	65	7,8	71	2,3	78	11,1
Dimetoato	-	-	-	-	-	-	-	-
Malationa	93	11,1	77	12,3	94	17,5	112	10,4
Parationa-etílica	88	11,8	76	3,1	85	10,5	100	10,5
Pirimifós-metílico	102	15,9	60	7,7	76	11,6	88	5,3
Dieldrin	85	6,8	72	2,3	66	13,3	74	7,5
Tetradifona	73	10,3	70	11,4	74	9,3	90	5,3
Endrin	83	19,1	72	5,4	77	8,0	89	4,2
Heptacloro (p.s.)	78	5,8	70	2,9	63	2,7	77	3,4

Avaliando-se a matriz pão, observa-se que esta apresentou a maior quantidade de compostos fora dos limites estabelecidos, onde a tendência foi de recuperações abaixo de 70%. No nível $5 \mu\text{g kg}^{-1}$, oito compostos apresentaram recuperações abaixo, no nível de fortificação $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, obteve-se quinze

compostos abaixo de 70%, no nível $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, nove compostos estão também abaixo do limite e no nível de fortificação $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, apenas um composto está acima e um abaixo dos limites estabelecidos para a recuperação. Estes resultados se devem principalmente devido a complexidade da matriz que possui diferente composição em relação ao trigo, farinha e farelo. Desta forma, verifica-se que o método desenvolvido não é tão eficiente para este tipo de matriz, necessitando uma otimização da etapa de extração e *clean up* mais efetivo, como por exemplo, a técnica de GPC, já avaliada anteriormente para este tipo de amostra (UYGUN *et al.*, 2005). A adição de gordura, sal, leite e fermento aumentam a quantidade de substâncias interferentes nos sistema cromatográfico, levando à baixas recuperações e uma relação não linear nas curvas de calibração.

A Figura 11 apresenta os cromatogramas obtidos para uma solução padrão de concentração $20 \mu\text{g L}^{-1}$ preparada no extrato da matriz trigo, e a fortificação equivalente, de concentração $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Verifica-se que os sinais são proporcionais, ou seja, que o sinal da fortificação equivale realmente ao ponto da curva analítica, demonstrando os bons resultados de recuperação já demonstrados na Tabela 20.

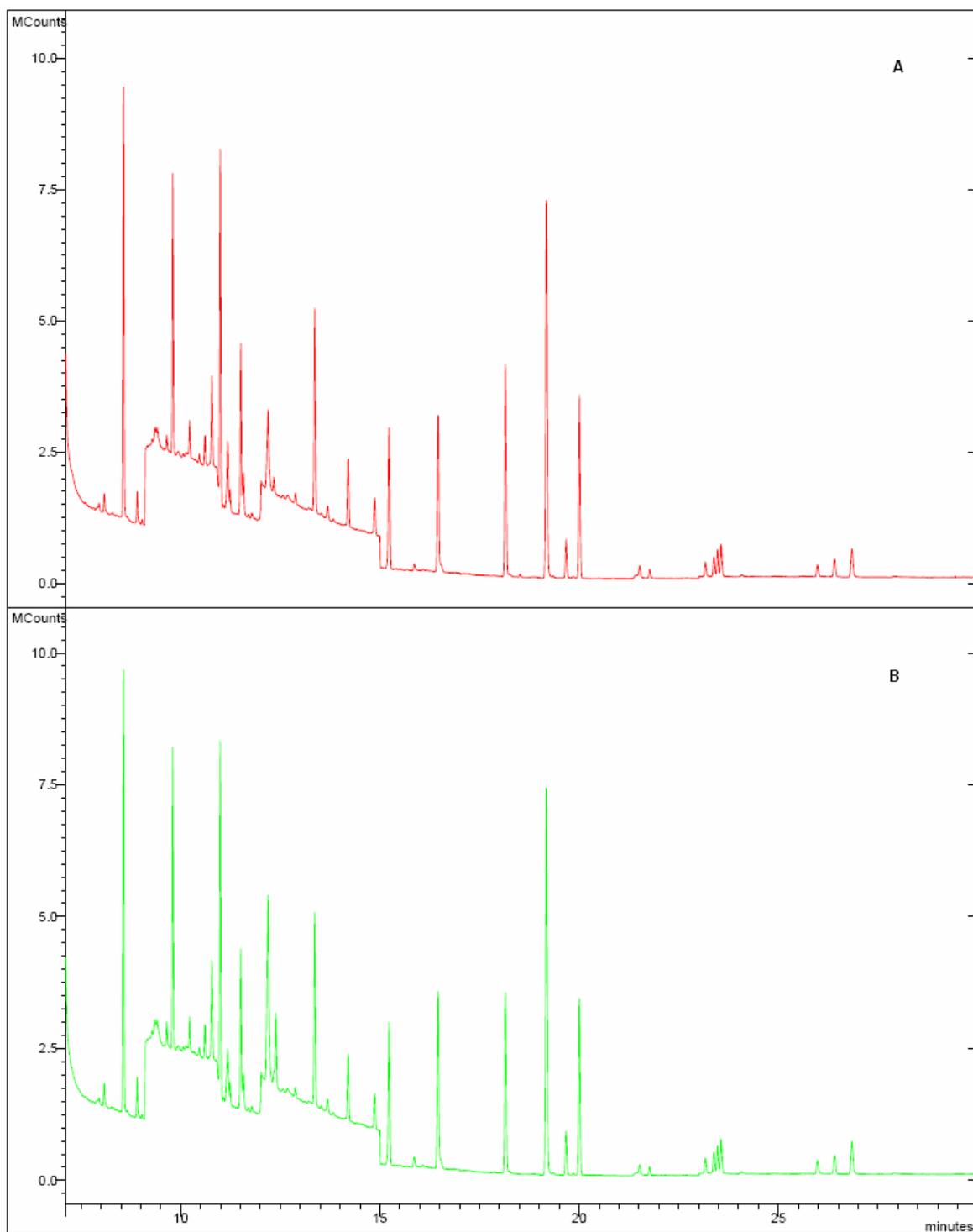


Figura 15. Cromatograma total obtido por GC-MS (NCI) modo SIM, para o padrão preparado na matriz trigo de concentração $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (A) e o nível de fortificação $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (B)

4.5.4 Aplicação do procedimento em amostras reais

Neste estudo aplicou-se o procedimento desenvolvido em duas amostras reais, conforme já citado na Tabela 10. Os resultados encontrados para as análises no trigo, farinha, farelo e pão estão apresentados na Tabela 28 e 29.

Tabela 28. Concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de resíduos de pesticidas encontrados nas amostras da coleta 1

Pesticida	Trigo	Farinha	Pão
Fenitrotiona	4,2 (<LOQ)	7,4	nd
Bifentrina	16,4	29,7	8,4 (<LOQ)
Cipermetrina beta	4,5 (<LOQ)	9,9	nd
Dicofol	6,8	1,2 (<LOD)	nd
Pirimifós-metílico	158,8	207,5	88,2

nd: não determinado

Tabela 29. Concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de resíduos de pesticidas encontrados nas amostras da coleta 2

Pesticida	Trigo	Farinha	Farelo	Pão
Fenitrotiona	3,3 (<LOQ)	67,4	471,3	26,3
Bifentrina	1,3 (<LOD)	33,4	113,9	10,5 (<LOQ)
Deltametrina	nd	16,4	73,3	5,6
Cipermetrina beta	6,4	11,1	19,1	nd
Pirimifós-metílico	12,6	595,6	3575,0	283,3
Clorpirifós-metílico	nd	7,7	38,9	2,4 (<LOQ)
Clorpirifós-etílico	nd	3,8 (<LOQ)	9,3	nd
Malationa	3,2 (<LOQ)	2,2 (<LOQ)	8,2	nd

nd: não determinado

De acordo com os resultados apresentados, observa-se que os pesticidas encontrados no grão de trigo permanecem em maior concentração nas partes

mais externas e oleosas do grão de trigo (casca e germe, que geram o farelo) e em menor concentração no endosperma, que gera a farinha branca. Isto se deve principalmente devido aos altos valores de coeficiente de partição octanol-água (Kow) apresentados no Anexo D, para os pesticidas encontrados nas amostras, uma vez que, quanto maior o valor de Kow, mais lipofílico é o composto, exceto a malation que possui valor de Kow considerado moderado.

Sabe-se que durante o processo de preparo do pão, podem ocorrer a formação de novos compostos, os produtos de degradação (UYGUN *et al.*, 2005), entretanto, este trabalho não objetivou avaliar estes possíveis produtos, e sim, verificar a diminuição da concentração que ocorre durante o preparo do pão, através de volatilização ou possível ação de microorganismos.

Na coleta 1, observa-se que os pesticidas encontrados se concentraram cerca de 2 vezes na farinha, apenas o dicofol apresentou redução de 82% na farinha em relação ao grão. Avaliando-se a diminuição da concentração ocorrida durante o preparo do pão, apenas para o pirimifós-metílico foi possível realizar a quantificação, uma vez que a concentração encontrada para bifentrina está abaixo do LOQ. Para os demais pesticidas encontrados na farinha, constatou-se a perda total, uma vez que, estes já apresentavam baixas concentrações na farinha. Para o pesticida bifentrina, observa-se uma redução de 71,8% e para o pirimifós-metílico, uma redução de 57,5%. Avaliando-se os valores de pressão de vapor dos dois compostos, onde para bifentrina a pressão de vapor é 0,024, e para o pirimifós-metílico 0,002, pode-se explicar os resultados encontrados, pois quanto maior a pressão de vapor, mais volátil é o composto.

Para a coleta 2, observa-se que os pesticidas encontrados, possuem concentrações maiores no farelo, bem como na farinha, quando comparados com as concentrações encontradas nas amostras da coleta 1. É importante ressaltar que as amostras adquiridas foram coletadas durante o seu processamento, ou seja, não se tem a garantia de que uma exata quantidade de trigo, gerou a farinha e o farelo analisados, o que pode explicar as diferentes concentrações encontradas nas amostras. Avaliando-se a perda ocorrida durante o preparo do pão, observa-se que os compostos sofreram perda de 50 a 70%. Estes dados são concordantes com a literatura, SHARMA *et al.* (2005), reportaram percentuais de

degradação de 46 a 70% durante o preparo do pão. Enquanto que UYGUN *et al.* (2005), observaram degradação em maiores níveis, de 80 a 90%.

O composto pirimifós-metílico apresentou perda de 52%, entretanto deve-se considerar também a concentração deste pesticida, pois em menores concentrações, existe a possibilidade de ocorrer volatilização em maiores níveis, quando comparada à um composto em concentrações maiores na amostra.

Avaliando-se os resultados encontrados, constata-se que nenhuma concentração de pesticidas está acima do LMR estabelecido pela ANVISA, *Codex Alimentarius* e União Européia, conforme a Tabela 6, para cada uma das matrizes avaliadas neste estudo.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que o método de extração QuEChERS modificado, empregando *clean up* dispersivo, reflete suas vantagens principais: rapidez, simplicidade, confiabilidade, robustez, baixo custo, baixo consumo de solventes, não necessitando de equipamentos e vidrarias especiais.

O método omite ou substitui muitas etapas analíticas complicadas empregadas geralmente nos métodos tradicionais, e a etapa de *clean up* é simples devido a SPE dispersiva, onde o C18 é misturado diretamente ao extrato e agitado manualmente. A eficiência da etapa de partição foi otimizada pela adição dos sais acetato de sódio e citrato de sódio, bem como a adição de 500 mg de C18 na etapa de *clean up*. Deste modo, pode-se afirmar que o método mostrou-se muito eficiente para a ampla faixa de compostos estudados.

O uso de GC-MS com ionização química negativa e aquisição no modo SIM, proporcionou grande especificidade, precisão e sensibilidade, de modo que grande parte dos compostos obtivesse valor de LOQ do método na concentração de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Os parâmetros avaliados durante a etapa de validação foram considerados satisfatórios para a grande maioria dos compostos, pois estão de acordo com os valores sugeridos na literatura para a análise de resíduos de pesticidas por métodos cromatográficos (SANCO, 2007). As curvas analíticas apresentaram linearidade dentro das suas respectivas faixas de aplicação para praticamente todos os compostos avaliados neste estudo. Os ensaios de fortificação também mostraram que o método pode ser aplicado a diferentes tipos de matrizes, mas torna-se necessária a sua validação e otimização. As recuperações encontradas mostraram-se dentro dos critérios de validação para a grande maioria dos compostos, embora os valores de recuperação encontrados para pão foram os menos satisfatórios, pois apresentaram valores de recuperação abaixo de 70% para muitos pesticidas.

A avaliação do efeito matriz, mostrou que em cada uma das matrizes, observou-se grande efeito matriz positivo, ou seja, um aumento de sinal, isto comprova a necessidade de se empregar curvas preparadas no extrato da matriz

e não em solvente, pois deste modo, estaria se superestimando as concentrações encontradas nas amostras. Embora não se tenha encontrado amostras totalmente isentas de resíduos de pesticidas, para utilização como amostra “branco” na etapa de validação, efetuou-se a compensação deste valor. Várias amostras de trigo, farinha e farelo adquiridas no mercado local foram avaliadas, onde constatou-se a utilização de uma grande variedade de resíduos de pesticidas.

Os resíduos de pesticidas encontrados em grãos de trigo, concentram-se preferencialmente no farelo e em menores quantidades na farinha. Isto demonstra a necessidade de se estabelecer LMRs na legislação nacional para estes tipos de alimentos, com o objetivo de se avaliar a quantidade de pesticidas que entram na dieta diária através do consumo destes alimentos processados.

O processo de preparo do pão, demonstrou que ocorreu uma diminuição na concentração dos pesticidas encontrados na farinha na faixa de 50 a 70%.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Aumento do número de pesticidas a serem analisados, bem como a aplicação do método validado para monitoramento dos grão de trigo, farinha e farelo comercializados;

Avaliar a concentração dos pesticidas em farinha e farelo, obtidas unicamente e exatamente de uma quantidade de trigo, por exemplo, submeter 10 kg de grãos de trigo ao processamento para obter assim as amostras de farinha e farelo mais representativas;

Otimização do método para análise no pão, bem como avaliar a degradação dos pesticidas em amostras de pão preparadas de forma caseira e assado em forno convencional.

7 REFERÊNCIAS

ABITRIGO (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO TRIGO), Importância do trigo e seus derivados para a alimentação e saúde humana, 2005. Disponível em: <<http://www.abitrigo.com.br>>. Acesso em 08 nov. 2007.

ADOU, K.; BONTOYAN, W. R.; SWEENEY, P. J. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4153-4160, 2001.

AGÜERA, A.; *et al.* **The Analyst**, v.127, p.347-354, 2002.

ALDER, L.; *et al.* **Mass Spectrometry Reviews**, v.25, p.838-865, 2006.

ALMEIDA, L. **Agronegócio brasileiro**. Coodetec (2003). Disponível em: <<http://www.coodetec.com.br/artigos.asp?id=95>>. Acesso em 14 jun. 2007.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 83, p. 412-431, 2003a.

ANASTASSIADES, M.; MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S. J. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, p. 163-184, 2003b.

ANDERSON, A.; PALSHEDEN, H. **Fresenius Anal. Chem.** v. 339, p. 365-367, 1991.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA), Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 65 de 25 de fevereiro, 2003a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/Glossario/glossario_v.htm>. Acesso em 22 jan. 2007.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA), 2008. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 12 jan 2008.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA), **Revista Saúde Pública**, v. 40, p. 361-363, 2006.

ARREBOLA, F. J.; *et al.* **Analytica Chimica Acta**, v. 484, p. 167-180, 2003.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas o homem e o Meio Ambiente**. Editora UFV: Viçosa, 2004, 215 p.

BECKER, G. **Deutsche Lebensmittel Rundschau**, v. 67, p. 125-126, 1971.

BRUM, A. L.; MÜLLER, P. K. **A competitividade do trigo brasileiro diante da concorrência argentina**. Ijuí: Editora Unijuí, 2006, 160 p.

BRUXELAS. Document n^o SANCO/2007/3131. European Commission, DG-SANCO, Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, p. 529-537, 2000.

CAMPOS, J. **Tabela para cálculos de rações**. 2 ed. Viçosa: UFV, 1981, 64 p.

CARVALHO, I. S. **Mundo & Vida**, v. 2, p. 29-31, 2000.

CHAO, H. R.; *et al.* **Chemosphere**, v. 62, p. 1774-1785, 2005.

CHASIN, A. A. M.; *et al.* **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.11, p.1-6, 1998.

CHU, X. G.; HU, X. Z.; YAO, H. Y. **Journal of Chromatography A**, v. 1063, p. 201-210, 2005.

CODEX ALIMENTARIUS METHOD VALIDATION, JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME, **Codex on Methods of Analysis and Sampling**, Budapeste, 2001.

CODEX ALIMENTARIUS, Limites Máximos de Resíduos de pesticidas em trigo, 2007. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp>. Acesso em 06 nov 2007.

COODETEC (Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola). **A história do trigo no Brasil**, 2004. Disponível em: <<http://www.coodetec.com.br/artigos.asp?id=105>>. Acesso em 16 mai. 2007.

COSTA, N. **Trigo e Soja**, n°112, p.2-30, 1990.

CUADROS-RODRÍGUES, L.; *et al.* **Trends Anal. Chem.**, v. 20, p. 620-632, 2001.

DIEZ, C.; *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 1131, p. 11-23, 2006.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA), Embrapa Soja. Disponível em: <http://www21.sede.embrapa.br/linhas_de_acao/alimentos/grao_fibra/index> Acesso em 18 jan. 2005.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA), Embrapa Soja. Disponível em: <http://cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=41&cod_pai=55>. Acesso em 16 mai. 2007.

FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations), 2005a. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?hasbulk=0&subset=FoodQuality&&language=EN>>. Acesso em 15 set. 2007.

FEINBERG, M.; RAGUÉNÉS, N. **Anal. Chim. Acta**. v. 39, p. 239-252, 1999.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. **Chromatographic – Mass Spectrometry Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues**, Editora Elsevier, Amsterdam, v. XLIII, Capítulo 4, 2005.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. **Chromatographic – Mass Spectrometry Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues**, Editora Elsevier, Amsterdam, v. XLIII, Capítulo 8, 2005.

FIOCRUZ (FUNDAÇÃO INSTITUTO OSWALDO CRUZ), 2008. Disponível em <<http://www.fiocruz.br/sinitox/agrotoxicos/agrotoxicos.htm>>. Acesso em 16 jan 2008.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1992, 307 p.

FRENICH, A. G.; BOLANOS, P. P.; VIDAL, J. L. M. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 194-202, 2007.

FRENICH, A. G.; *et al.* **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 4640-4648, 2005.

GAMÓN, M., *et al.* **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.**, v. 84, p. 1209-1214, 2001.

GARP – ASSOCIAÇÃO GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS, **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos**, 1999.

GENERAL INSPECTORATE FOR HEALTH PROTECTION, **Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs**, 6^a Ed., Ministry of Health, Welfare and Sport, The Hague, The Netherlands, 1996.

HERMES, L. C. **Epagri**, v. 97, p. 68, 1997.

HERNANDEZ, F.; *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 1109, p. 242-252, 2006.

HERNANDO, M. D.; *et al.* **The Analyst**, v. 126, p. 46-51, 2001.

HIEMSTRA, M.; de KOK, A. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 3-25, 2007.

HOLLAND, P.T.; HAMILTON, D.; OHLIN, B.; SKIDMORE, M. W. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p. 335-356, 1994.

IMOTO, M. N. Validação de Método Multirresíduo para pesticidas organohalogenados em maca por Cromatografia Gasosa com Captura de elétrons (CG/ECD) e Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (GC/MS). **Tese de Doutorado**. UFP, Curitiba, 2004.

Indicações técnicas da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo: Trigo e Triticale/ **XXXVII Reunião da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo**. Cruz Alta, 2005, 162 p.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL), **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

KIRCHNER, M.; *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 1084, p. 63-70, 2005.

KIRCHNER, M.; *et al.* **Journal of Chromatography A**, *in press*, 2007.

KRIJGSMAN, W.; van de KAMP, C. G. **Journal of Chromatography A**, v. 117, p. 201-205, 1976.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**, v.6, São Carlos, Editora RiMa, 2004.

LAVAGNINI, I.; MAGNO, F.; SERAGLIA, R.; TRALDI, P. **Quantitative Applications of Mass Spectrometry**, Chichester, Editora Wiley, 2006, 138p.

LEANDRO, C. C.; FUSSELL, R. J.; KEELY B. J. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, p. 207-212, 2005.

LEHOTAY, S. J.; *et al.* **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4589-4596, 2001.

LEHOTAY, S. J. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.83, p.680-697, 2000.

LEHOTAY, S.; MASTOVSKA, A. R.; LIGHTFIELD, J. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 88, p. 615-629, 2005.

LUKE, M. A.; FORBERG, J. E.; MASUMOTO, H. T. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 58, p. 1020-1026, 1975.

MARTINEZ-VIDAL, J. L.; ARREBOLA, F. J.; MATEU-SANCHEZ, M. **Journal of Chromatography A**, v. 959, p. 203-213, 2002.

MARTINEZ-VIDAL, J. L.; *et al.* **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 365-375, 2006.

MASTOVSKA, K.; *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 907, p. 235-245, 2001.

MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S. J. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, p. 259-272, 2004.

MELOAN, C. E., **Pesticides Laboratory Training Manual**, Editora AOAC International, Gaithersburg, EUA, 1996.

MESTRES, R.; MESTRES, G. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 124, p.1-25, 1992.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Herbicidas em Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997, 108 p.

MILLS, P. A.; ONLEY, J. J.; GAITHER, R. A. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 46, p. 186-191, 1963.

MUNDSTOCK, C. M. **Planejamento e manejo integrado da lavoura de trigo**. Porto Alegre: Editora Autor, 1999, 228 p.

OLIVA, R.; *et al.* **The Pesticide Data program of the Ministry of Health of Brazil**. In: 4th European Pesticides residues Workshop-EPRW, Roma, 2002.

PANG, G.; *et al.* **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 384, p. 1366-1408, 2006b

PANG, G. F.; *et al.* **Journal of Chromatography A**, v.1125, p.1-30, 2006a.

PATEL, K.; *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 1068, p. 289-296, 2005.

PENGYAN, L.; *et al.* **Chinese J. Chromatography**, v. 24, p. 228-234, 2006.

PICÓ, Y.; BLASCO, C.; FONT, G. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 23, p. 45-85, 2004.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. D. **Química Nova**, v. 19, p. 268-277, 1996.

PRESTES, O. D. Desenvolvimento e validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em arroz polido utilizando método de QuEChERS modificado, clean up dispersivo e GC-MS(NCI), **Dissertação de Mestrado**, UFSM, Santa Maria, 2007.

PRIMEL, E. G., Aplicação de Extração em Fase Sólida e Técnicas Cromatográficas para a Determinação de Herbicidas em Águas de Superfície e Acompanhamento da Degradação a Campo e no Laboratório, **Tese de Doutorado em Química**, UFSM, Santa Maria, 2003.

RIBANI, M. ; *et al.* **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

ROSSI, R. M.; *et al.* **Estratégias para o Trigo no Brasil**. São Paulo: Atlas, 2004, 224 p.

SCHENCK, F. J.; *et al.* **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.85, p. 1177-1180, 2002.

SCHENCK, F. J.; LEHOTAY, S. **Journal of Chromatography A**, v. 868, p. 51-61, 2000.

SCHERMA, J. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 84, p. 1303-1312, 2001.

SHARMA, J.; *et al.* **Chemical Health & Safety**, Jan/Fev, p. 17-22, 2005.

SHULING, S.; XIAODONG, M.; CHONGJIU, L. **Food Control**, v. 18, p. 448-453, 2007.

SILVA, D. B.; *et al.* **Trigo para o abastecimento familiar**. Embrapa-SPI, Brasília, 1996, 176 p.

SOBOLEVA, E.; *et al.* **The Analyst**, v.129, p. 1123-1129, 2004.

SOUZA, A. P. O.; ALCANTARA, R. L. C. **Produtos Orgânicos: Um estudo exploratório sobre as possibilidades do Brasil no mercado internacional**. Disponível em: <<http://planetaorganico/trabAnaPaula.htm>>. Acesso em 27 set. 2007.

SPECHT, W.; TILLKES, M. **Fresenius Z Anal. Chem.** v. 322, p. 443-455, 1985.

STAJNBAHER, D.; KRALJ, L. Z. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, p. 185-198, 2003.

STAN, H. J. **Journal of Chromatography A**, v. 892, p. 347-377, 2000.

TADEO, J. L.; *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 175-191, 2000.

TAHBOUB; Y. R.; *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 1098, p. 150-155, 2005.

TEKEL, J.; HUDECOVÁ, T.; PECNIKOVA, K. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 213, p. 250-258, 2001.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. **Pure and Applied Chemistry**, v.74, p.835-855, 2002.

TOMAS, C.; *et al.* **Journal Separation Science**, v.28, p.1048-1060, 2005

TINDLE, R. C.; STALLING, D. L. **Anal. Chem.** v. 44, p. 1768- , 1972.

TREVISAN, L. R. P.; BAPTISTA, G. C. **Scientia Agrícola**, v. 57, p. 199-203, 2000.

UNIÃO EUROPÉIA, Limites Máximos de Resíduos de Pesticidas em trigo, 2007.
Disponível em: < http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/index_en.htm>.
Acesso em 06 nov 2007.

UYGUN, U.; KOKSEL, H.; ATLI, A. **Food Chemistry**, v. 92, p. 643-647, 2005.

VERWAAL, W.; HIEMSTRA, M. **De Waren Chemicus**, v. 27, p. 231-246, 1997.

WINTER, C. K. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** v. 127, p. 23-66 , 1992.

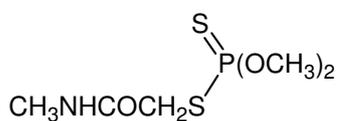
WYLIE, P. L.; UCHIYAMA, K. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 79, p. 571-580, 1996.

ZANELLA, R.; *et al.* **Journal of Chromatography A**, v. 904, p. 257, 2000.

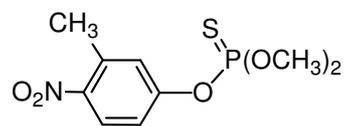
ZROSTLIKOVA, J.; *et al.* **Journal of Chromatography A**, v.937, p.73-86, 2001.

ANEXOS

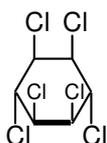
ANEXO A - Fórmula estrutural dos compostos em estudo



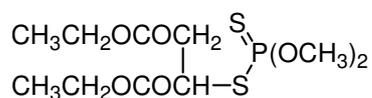
1. Dimetoato



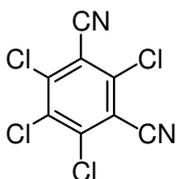
7. Fenitrotiona



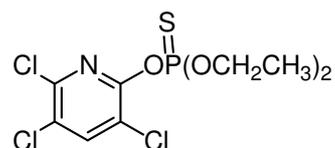
2. Lindano



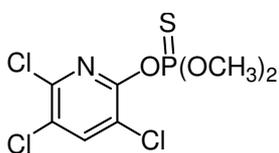
8. Malationa



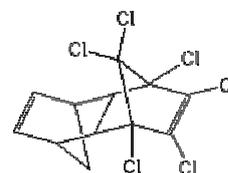
3. Clorotalonil



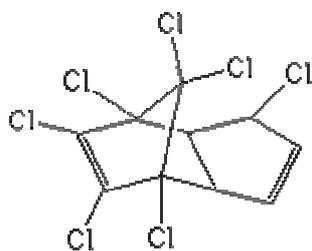
9. Clorpirifós-etílico



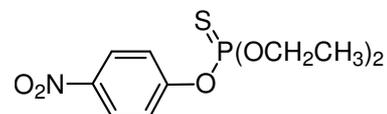
4. Clorpirifós-metílico



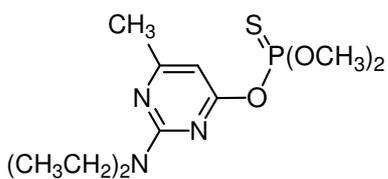
10. Aldrin



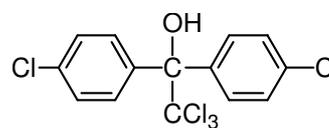
5. Heptacloro



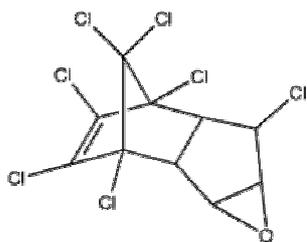
11. Partiona-etílica



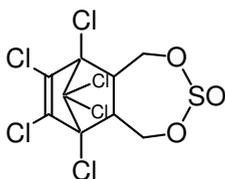
6. Pirimifós-metílico



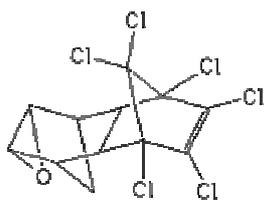
12. Dicofol



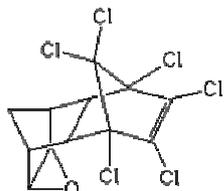
13. Heptacloro-epóxido



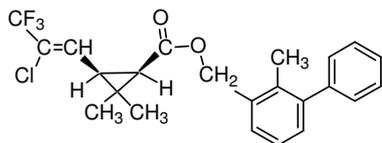
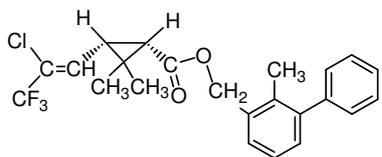
14, 17, 18. Endosulfan



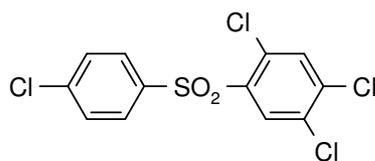
15. Dieldrin



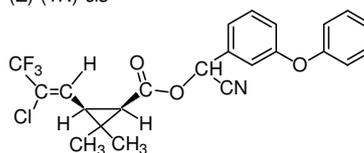
16. Endrin

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

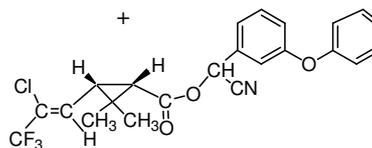
19. Bifentrina



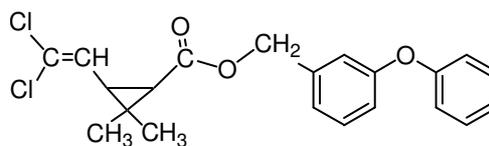
20. Tetradifona

(Z)-(1*R*)-*cis*-

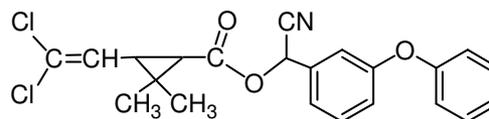
+

*(Z)*-(1*S*)-*cis*-

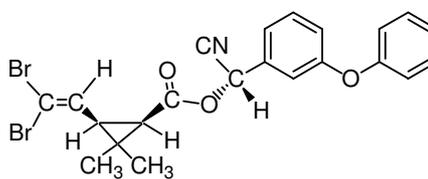
21. Cialotrina



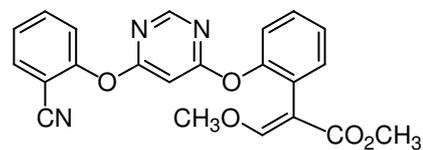
22, 23. Permetrina



24. Cipermetrina



25. Deltametrina



26. Azoxistrobina

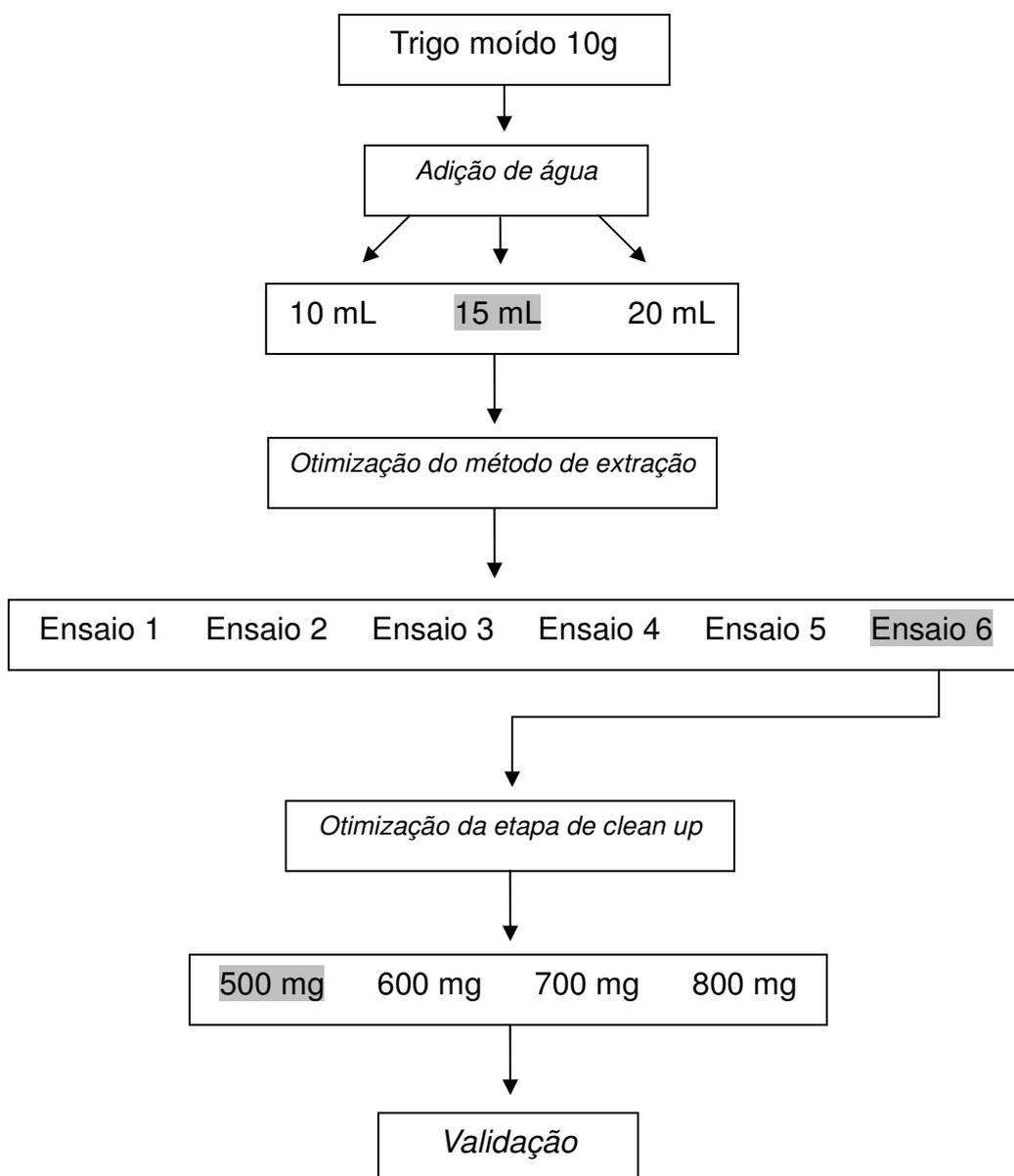
ANEXO B - Cálculos do fator de diluição

10 g trigo + 15 mL água → 25 g

Fator de diluição 2,5 para trigo, farelo e farinha

10 g pão + 10 mL água → 20 g

Fator de diluição 2,0 para pão

ANEXO C - Fluxograma da otimização do método de extração

ANEXO D - Constantes Kow e pressão de vapor

Pesticidas	Kow	Pressão de vapor
Cipermetrina	6,6	0,0002
Bifentrina	5,0	0,024
Clorpirifós-etílico	4,7	2,5
Deltametrina	4,6	0,0000124
Dicofol	4,3	0,25
Clorpirifós-metílico	4,24	5,6
Pirimifós-metílico	3,9	0,002
Fenitrotona	3,32	0,676
Malationa	2,75	0,45