

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
MULTIRRESIDUAL PARA DETERMINAÇÃO
DE PESTICIDAS EM CAFÉ VERDE
UTILIZANDO GC-MS (NCI-SIM)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bárbara Reichert

Santa Maria – RS, Brasil

2012

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
MULTIRRESIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS
EM CAFÉ VERDE UTILIZANDO GC-MS (NCI-SIM)**

Bárbara Reichert

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

Mestre em Química

Orientadora: Profa. Dra. Carmem Dickow Cardoso

Santa Maria, RS, Brasil

2012

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

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
MULTIRRESIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS
EMCAFÉ VERDE UTILIZANDO GC-MS (NCI-SIM)**

elaborada por
Bárbara Reichert

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dra. Carmem Dickow Cardoso
(Presidente/Orientadora)

Dra. Ionara Regina Pizzutti
(Coorientadora)

Dr. Roger Wagner (UFSM)

Dr. Rafael Roehrs (UNIPAMPA)

Santa Maria, 16 de janeiro de 2012

A minha querida família, principalmente aos meus pais Nelci e Egon, que sempre me auxiliaram com o que foi necessário para alcançar esta conquista, e aos meus irmãos por todo incentivo que me deram. Em especial ao Mauro, que sempre esteve presente para me dar forças nos momentos de dificuldade, quem mais me apoiou nesta caminhada e nunca mediu esforços para me ajudar. Dedico esta conquista a vocês!

“E aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam. Descobre que se levam anos para se construir confiança e apenas segundos para destruí-la, e que você pode fazer coisas em um instante das quais se arrependerá pelo resto da vida. Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher. Aprende que não temos que mudar de amigos se compreendemos que os amigos mudam, percebe que seu melhor amigo e você podem fazer qualquer coisa, ou nada, e terem bons momentos juntos.

Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa, por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pode ser a última vez que as vejamos. Aprende que as circunstâncias e os ambientes tem influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos. Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser. Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto. Aprende que não importa onde já chegou, mas onde está indo, mas se você não sabe para onde está indo, qualquer lugar serve. Aprende que, ou você controla seus atos ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem dois lados.

Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as conseqüências. Aprende que paciência requer muita prática. Descobre que algumas vezes a pessoa que você espera que o chute quando você cai é uma das poucas que o ajudam a levantar-se. Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens, poucas coisas são tão humilhantes e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso.

Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém, algumas vezes você tem que aprender a perdoar-se a si mesmo. Aprende que com a mesma severidade com que julga, você será em algum momento condenado. Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte. Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás.”

(William Shakespeare)

AGRADECIMENTOS

- Às professoras Carmem e Ionara, pela confiança que em mim depositaram, pela oportunidade de fazer parte do CEPARC, pelos ensinamentos, pela amizade, pelas vezes que me deram força nos momentos de dificuldade e acima de tudo e pela oportunidade de realizar este trabalho;
- *To Dr. Andre de Kok, I gratefully thank for the opportunity, for the support, for the reception in the Netherlands, for all the teaching, for the trips and for the friendship. Thank you very much for everything Andre;*
- *To Dr. Martien Spanjer, for all the help, for the teaching, for take the Brazilian students to sail and to the Ajax game, for the trips and for all the other happy moments;*
- *To the NVWA directors Lia Mijnsbergen and Willem Brouwer, thanks for approve this project;*
- *To Wouter, for teach me handle the GC-MS system, for the help with the laboratory work and for be a good friend during my state in Amsterdam;*
- *To Djorn, for teach me the pesticide routine work and process GC-MS data, for all the help and for be a good friend;*
- *To Elma and to Adrian, for teach me the mycotoxins routine work;*
- *To Jos, for teach me handle the LC-MS system and for all the help;*
- *To Marijke, Wouter and Jos, for help with the validation work;*
- *To Wilma for always be so nice to me and to the other Brazilian students and, of course, for the “lekker” soup;*
- *To all the NVWA colleges: Agnieszka, Humphrey, Gregory, Marco, Ruud, Teuni, Kees, Mahboubeh, Rahma, Yuklai, Marianne, Annelies, Henk, Emile, Alwin and Anneke thanks for any help and for your company;*
- Aos colegas de apartamento e de laboratório, Cristiano, Wagner e Laís; aos rapazes por terem nos recebido bem em Amsterdam, por nos mostrarem o NVWA e a cidade, entre outras coisas, e à Laís pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pelo apoio nos momentos de dificuldade e pela parceria.
- Aos colegas do CEPARC (Jaqueline, Darliana, Jonatan, Maju, Rose, Gabriel, Ângela, Lílian, Laís, Karla, Cátia, Tina, Jefferson, Cristiano, Wagner e Melissa) obrigada pela ajuda, parceria, momentos de alegria e descontração;

- Às amigas e colegas de apartamento, Mônica, Marina e Tefa, que estiveram comigo durante grande parte dessa caminhada e acompanharam de perto todo esforço para alcançar esta conquista, obrigada pela amizade, parceria, festas e tudo mais;
- Às amigas Camila e Renata, pelos chimarrões, almoços, jantas e festas, que muito me ajudaram a descontrair durante as épocas de aulas, laboratório e provas;
- Ao Ademir e à Valéria, meus agradecimentos por toda ajuda e atenção;
- *To the friends from Amsterdam, Renato, Daniela, Milos, Guilherme, Álvaro, Lorena and specially to Matt, who was our “Angel” during the 10 month in Amsterdam;*
- Ao meu amado namorado Cesar, agradeço por todo incentivo, paciência, compreensão e apoio nos momentos difíceis;
- À minha amada família, pelo incentivo, compreensão e também pelo apoio financeiro;
- À querida tia Delci e à sua família, pelo incentivo, ajuda e pelos churrascos de domingo;
- Ao estimado amigo e colega de mestrado Gui Cervi, pelas palavras de incentivo nos momentos de dificuldade, pela parceria e pela amizade;
- Aos demais colegas de mestrado, em especial a Daiane Skupin, pelos cadernos e materiais de aula emprestados, pela companhia e parceria;
- Aos professores Roger e Rafael, pela participação na banca, pelas sugestões e correções.

RESUMO

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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM CAFÉ VERDE UTILIZANDO GC-MS (NCI-SIM)

Autora: Bárbara Reichert

Orientadora: Dra. Carmem Dickow Cardoso

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 16 de janeiro de 2012.

Neste estudo, foi desenvolvido e validado um método multirresidual para determinação de 40 pesticidas em grãos de café verde. Para se obter uma amostra bem homogênea, os grãos de café verde foram previamente moídos e em seguida preparou-se um *slurry* de café e água (razão 1:4, m/m). Para o procedimento de extração utilizou-se o método QuEChERS, no qual foram introduzidas algumas modificações. Como solvente extrator, utilizou-se acetonitrila contendo 1% de ácido acético e padrão interno do procedimento (P.I.P.). Após a adição da acetonitrila, para promover o particionamento entre as fases orgânica e aquosa, adicionou-se 3 g de sulfato de magnésio anidro. Para a purificação do extrato de café, foram testados dois adsorventes, separadamente e em diferentes quantidades e também misturas entre os dois adsorventes, em uma etapa de extração em fase sólida dispersiva (dSPE), sendo que os melhores resultados foram obtidos com a utilização de 500 mg de C18 juntamente com 600 mg de sulfato de magnésio, para remoção de água. A determinação dos pesticidas foi feita em um sistema de cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS). Em função das características dos pesticidas e da complexidade da matriz, o GC-MS foi operado no modo de ionização química negativa (NCI) e monitoramento seletivo de íons (SIM), que forneceu grande sensibilidade e seletividade na determinação dos pesticidas. A validação foi realizada pela análise de amostras de café fortificado em três diferentes concentrações (10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$), com 6 replicatas ($n=6$) para cada concentração. Para cada um dos pesticidas, avaliou-se a linearidade da curva analítica (r), exatidão (recuperação%), limite de detecção e quantificação (LOD e LOQ) do instrumento e do método, precisão (RSD%) e efeito matriz (%). Dos 51 pesticidas estudados, aproximadamente 76% obtiveram recuperações médias entre 70-120% e 75% apresentaram $\text{RSD} \leq 20\%$ para amostras fortificadas na concentração de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para as fortificações de 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ os resultados foram ainda melhores. O LOQ do método foi estabelecido em 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente para 33, 3 e 6 pesticidas, 4 pesticidas somente puderam ser detectados via seus produtos de degradação e 5 compostos não apresentaram recuperações entre 70-120% e $\text{RSD} \leq 20\%$, assim o LOQ do método não pode ser estabelecido para esses pesticidas. Mesmo com a utilização de uma etapa de purificação do extrato de café o efeito matriz manteve-se presente para todos os pesticidas, dessa forma, para que o método possa ser implantado em análises de rotina, a confecção das curvas analíticas deve ser feita em matriz (*matrix-matched calibration*).

Palavras-chave: Café verde. Pesticidas. GC-MS (NCI-SIM). Método QuEChERS.

ABSTRACT

Master Dissertation
Chemistry Post Graduate Program
Federal University of Santa Maria

DEVELOPMENT AND VALIDATION A MULTI-RESIDUE METHOD FOR PESTICIDES DETERMINATION IN GREEN COFFEE USING GC-MS (NCI-SIM)

Author: Bárbara Reichert

Adviser: Ph.D. Carmem Dickow Cardoso

Place and Date: Santa Maria, January, 16th, 2012.

In this study, was developed and validated a multi-residue method for the determination of 40 pesticides in green coffee beans. To obtain a very homogeneous sample, the coffee beans were first milled, followed by a slurry preparation of coffee and water (ratio 1:4, w/w). For the extraction procedure modifications of the QuEChERS method were developed. Acetonitrile containing 1% acetic acid and the procedure internal standard (P.I.S.) was used as extraction solvent. After the acetonitrile addition, 3 g of anhydrous magnesium sulfate were added, to promote phase separation between the organic phase (acetonitrile) and the aqueous phase. For the dispersive solid-phase extraction (dSPE) clean-up step, two sorbents were tested in separate and in different amounts and were also tested mixtures of them. Ergo the best results were obtained using 500 mg C18-bonded silica together with 600 mg of magnesium sulfate, for drying. The pesticides were determined by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS). Considering the characteristics of the pesticides and the complexity of the coffee matrix the GC-MS had to be operated in negative chemical ionization mode (NCI) and single ion monitoring mode (SIM) which provided high sensitivity and selectivity to pesticide detection. The validation was performed by analyzing spiked samples at three different concentrations (10, 20 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$), with 6 replicates ($n=6$) at each spike concentration. For each one of the 51 pesticides determined by GC-MS (NCI-SIM), the linearity (r) of calibration curves, accuracy (as recovery percent), instrument and method limits of detection and quantification (LOD and LOQ), precision (as RSD percent) and matrix effects (percent) were determined. From the 51 pesticides studied, approximately 76% showed average recoveries between 70-120% and 75% $\text{RSD} \leq 20\%$ for the spike concentration of 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. For the spike concentrations of 20 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, the recoveries (%) and RSD (%) values were even better. The method LOQ was 10, 20 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, for respectively 33, 3 and 6 pesticides, 4 pesticides could only be detected via their degradation products and 5 compounds did not presented recoveries between 70-120% and $\text{RSD} \leq 20\%$ thus the method LOQ could not be determined for those pesticides. The matrix effect was present for all the pesticides even with the use of a clean-up step, requiring therefore matrix-matched calibration standards for application in routine analysis.

Keywords: Green coffee. Pesticides. GC-MS (NCI-SIM). QuEChERS method.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação botânica do café.....	07
Tabela 2 -	Composição dos grãos de café.....	10
Tabela 3 -	Pesticidas estudados, com informações de pureza, classe, fornecedor, grupo químico, classificação toxicológica, fórmula molecular e LMR.....	44
Tabela 4 -	Pesticidas determinados por GC-MS (NCI-SIM), valores de t_R , íons monitorados, segmento e <i>time window</i>	58
Tabela 5 -	Médias das áreas das 6 injeções e RSD (%) para cada pesticida, nas soluções de concentração 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 20 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ em matriz, dos pesticidas determinados por GC-MS (NCI-SIM).....	62
Tabela 6 -	Médias das áreas das 6 injeções e RSD (%) para cada pesticida, nas soluções de concentração 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 20 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ em solvente orgânico, dos pesticidas determinados por GC-MS (NCI-SIM).....	63
Tabela 7 -	Valores dos LOD e LOQ, do instrumento e do método, obtidos pela análise das soluções de concentração 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 20 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ em matriz, por GC-MS (NCI-SIM).....	65
Tabela 8 -	Valores dos LOD e LOQ, do instrumento e do método, obtidos a partir da análise das soluções de concentração 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 20 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ em solvente orgânico, por GC-MS (NCI-SIM).....	66
Tabela 9 -	Parâmetros das curvas analíticas, obtidos para os pesticidas determinados a partir das soluções analíticas de concentração 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 20 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ em matriz, por GC-MS (NCI-SIM).	69
Tabela 10 -	Parâmetros das curvas analíticas, obtidos para os pesticidas determinados a partir das soluções analíticas de concentração 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 20 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ em solvente orgânico, por GC-MS (NCI-SIM).....	70
Tabela 11 -	Recuperações médias percentuais, RSD (%) e LOQ_m do café fortificado nas concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, análises realizadas por GC-MS (NCI-SIM).....	73
Tabela 12 -	Efeito matriz percentual para os pesticidas determinados nas soluções de concentração 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 20 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, por GC-MS(NCI-SIM).....	79
Tabela 13 -	Pesticidas que apresentaram recuperações médias percentuais entre 70-120%, $\text{RSD} \leq 20\%$ e coeficiente de correlação (r) > 0,90..	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fotografia de um cafeeiro da espécie <i>Coffea arabica</i>	08
Figura 2 -	Amostras utilizadas de café. À esquerda, o café da marca <i>Douwe Egberts</i> , e à direita, o café da marca <i>Starbucks</i> ®	42
Figura 3 -	Esquema do procedimento de extração, QuEChERS modificado (A), mostrando os adsorventes e misturas de adsorventes testados para purificação do extrato de café (B).....	50
Figura 4 -	Sequência de injeções para avaliação da linearidade, onde: BS: “branco” do solvente (acetonitrila), BM: “branco” da matriz (café), PS: padrão em solvente (acetonitrila) – concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$ e PM: padrão em matriz (extrato “branco” de café) – concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$	52
Figura 5 -	Sequência de injeções das recuperações onde: BS: “branco” do solvente, BM: “branco” da matriz, PS: padrão em solvente – concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$, PM: padrão em matriz – concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$ e F: fortificação – concentração em $\mu\text{g kg}^{-1}$	57
Figura 6 -	Número de pesticidas não detectados e número de pesticidas com recuperações entre 70-120% de acordo com cada adsorvente testado para a fortificação de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$, análise realizada por GC-MS/MS (EI ⁺).....	60
Figura 7 -	Cromatograma total obtido pela análise de acetonitrila contendo o P.I.E., por GC-MS (NCI-SIM).....	71
Figura 8 -	Cromatogramas totais obtidos pela análise por GC-MS (NCI-SIM) de (A) extrato “branco” de café, (B) amostra de café fortificada na concentração de 10 e (C) $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, com a solução mistura de pesticidas.....	75
Figura 9 -	Cromatogramas dos pesticidas quintozeno, cialotrina-lambda, hexaclorobenzeno, clorpirifós-metílico, heptacloro e aletrina I-II: (A) extrato “branco” de café; (B) solução analítica em matriz de concentração $1 \mu\text{g L}^{-1}$, (C) amostra de café fortificado na concentração de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($2,5 \mu\text{g L}^{-1}$), obtidos por GC-MS (NCI-SIM).....	76
Figura 10 -	Cromatogramas dos pesticidas tequinazeno, permetrina-cis, mirex, bifentrina, endrim e endossulfam-alfa: (A) solução analítica em solvente orgânico de concentração $10 \mu\text{g L}^{-1}$; (B) solução analítica em matriz de concentração $10 \mu\text{g L}^{-1}$, (C) amostra de café fortificado na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($12,5 \mu\text{g L}^{-1}$), obtidos por GC-MS (NCI-SIM).....	77
Figura 11 -	Cromatogramas totais obtidos pela análise das soluções de concentração $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em solvente orgânico (A), em matriz (B), por GC-MS (NCI-SIM), mostrando o efeito matriz positivo do extrato de café.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- a – Coeficiente angular;
ABIQUIM – Associação Brasileira da Indústria Química;
ANDEF – Associação Nacional de Defesa Vegetal;
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
b – Coeficiente linear;
CECAFÉ – Conselho dos Exportadores de Café do Brasil;
BHC - Hexacloroeto de benzeno;
BM – Branco da matriz;
BS – Branco do solvente;
C18 – Sílica modificada com hidrocarboneto linear octadecilsilano;
CI – Ionização química, do inglês *chemical ionization*;
CID – Dissociação induzida por colisão, do inglês *collision-induced dissociation*;
CV – Coeficiente de variação;
d.i. – Diâmetro interno da coluna cromatográfica;
DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano, do inglês *dichlorodiphenyltrichloroethane*;
dSPE – Extração em fase sólida dispersiva, do inglês *dispersive solid phase extraction*;
ECD – Detector por captura de elétrons, do inglês *electron capture detector*;
ECNCI – Ionização química negativa por captura de elétrons, do inglês *electron capture negative chemical ionization*;
EI – Ionização por impacto de elétrons, do inglês *electron ionization*;
EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês *United States Environmental Protection Agency*;
EU – União Européia, do inglês *European Union*;
EUA – Estados Unidos da América;
F – Fortificação;
FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*;
FPD – Detector fotométrico de chama, do inglês *flame photometric detector*;
GC – Cromatografia gasosa, do inglês *gas chromatography*;
GPC – Cromatografia de permeação em gel, do inglês *gel permeation chromatography*;
HAc – Acetato de sódio;
HCH – Hexaclorociclohexano;
IA – Ingrediente ativo;
IBC – Instituto Brasileiro de Café;
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;
ICO – Organização Internacional do Café, do inglês *International Coffee Organization*;
IDA – Ingestão diária aceitável;
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial;
ITD – Detector por aprisionamento de íons, do inglês *ion trap detector*;
IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*;
JMPR – Do ingles *Joint Meeting on Pesticide Residues*;
LC – Cromatografia líquida, do inglês *liquid chromatography*;
LMR – Limite máximo de resíduos;
LOD – Limite de detecção, do inglês *limit of detection*;

LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *limit of quantification*;
m/m – Razão massa/massa;
m/z – Razão massa/carga;
MRM – Monitoramento de múltiplas reações, do inglês *multiple-reaction monitoring*;
MS – Espectrometria de massas, do inglês *mass spectrometry*;
MS/MS – Espectrometria de massas *tandem*, do inglês *tandem mass spectrometry*;
n – Número de repetições;
NCI – Ionização química negativa, do inglês *negative chemical ionization*;
n.d. – Não detectado;
NFA – Do inglês *Swedish National Food Administration*;
NPD – Detector de nitrogênio e fósforo, do inglês *nitrogen-phosphorus detector*;
n.p.r.v – Não preencheu os requisitos necessários para validação;
n.q. – Não quantificável;
NVWA – Do inglês *The Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority*;
OIT – Organização Internacional do Trabalho;
OMS – Organização Mundial da Saúde;
P.I. – Padrão interno;
P.I.E. – Padrão interno do equipamento;
P.I.P. – Padrão interno do procedimento;
PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos;
PCI – Ionização química positiva, do inglês *positive chemical ionization*;
pH – Potencial hidrogeniônico;
PM – Padrão em matriz;
PS – Padrão em solvente;
PSA – Amina primária e secundária, do inglês *primary and secondary amine*;
PTFE – Politetrafluoretileno;
PTV – Vaporização com temperatura programada, do inglês *programmed temperature vaporizing*;
QuEChERS – Método rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*;
r.p.m. – Rotações por minuto;
r – Coeficiente de correlação;
 r^2 – Coeficiente de determinação;
RP – Fase Reversa, do inglês *reverse phase*;
RS – Rio Grande do Sul;
RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*;
s – Estimativa do desvio padrão absoluto;
S – Sinal;
SD – Desvio padrão, do inglês *standard deviation*;
SIM – Monitoramento seletivo de íons, do inglês *selective ion monitoring*;
SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas;
SEM – Monitoramento seletivo de reações, do inglês *selected-reaction monitoring*;
TDCPP – Tris(1,3-dicloroisopropil)fosfato, do inglês *tris(1,3-dichloroisopropyl) phosphate*;
 t_R – Tempo de retenção de um analito, do inglês *retention time*;
UFMS – Universidade Federal de Santa Maria;
w/w – Razão massa/massa, do inglês *weight/weight*;
WHO – Organização Mundial de Saúde, do inglês *World Health Organization*;

x – Concentração do composto em estudo;
y – Resposta do detector (área do pico ou valor de absorvância).

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1 - Determinação da linearidade das curvas analíticas.....	94
Apêndice 2 - Avaliação da exatidão do método analítico.....	95

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1 O café.....	03
2.1.1 A origem do cafeeiro e sua expansão pelo mundo.....	03
2.1.2 A chegada do cafeeiro ao Brasil.....	05
2.1.3 O café na atualidade.....	06
2.1.4 Aspectos botânicos e ecologia.....	07
2.1.5 Composição dos grãos de café.....	09
2.1.6 O café como bebida.....	09
2.1.7 Pragas e doenças do café.....	11
2.2 Pesticidas.....	13
2.3 Principais grupos de praguicidas.....	14
2.3.1 Piretróides.....	14
2.3.2 Organofosforados.....	15
2.3.3 Carbamatos.....	15
2.3.4 Organoclorados.....	16
2.4 Pesticidas no Brasil.....	16
2.5 Contaminação ambiental por agrotóxicos.....	18
2.6 Exposição humana aos pesticidas.....	20
2.7 Limites máximos de resíduos.....	21
2.8 Preparo de amostras para análise de resíduos de pesticidas.....	22
2.8.1 Método QuEChERS.....	22
2.8.2 Método de Luke.....	23
2.8.3 Extração com acetato de etila.....	24
2.9 Métodos cromatográficos para análise de resíduos de pesticidas.....	24
2.9.1 Cromatografia gasosa.....	25
2.9.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.....	26
2.9.2.1 Modos de ionização.....	27
2.9.2.2 Espectrômetros de massa do tipo triplo quadrupolo.....	30
2.9.2.3 Modos de aquisição do espectro de massas.....	30
2.9.2.4 A utilização da GC-MS na análise de resíduos de pesticidas.....	31
2.10 Monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos.....	32
2.11 Validação de métodos analíticos.....	33
2.11.1 Linearidade e curva analítica.....	34
2.11.2 Exatidão.....	35
2.11.3 Precisão.....	35
2.11.4 Limite de detecção.....	37
2.11.5 Limite de quantificação.....	37
2.11.6 Seletividade.....	37
2.11.7 Especificidade.....	38
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	39
3.1 Instrumentação.....	39

3.2	Gases	40
3.3	Materiais	40
3.4	Reagentes e solventes	41
3.5	Preparo e otimização do <i>slurry</i>	41
3.6	Pesticidas selecionados	43
3.7	Seleção dos padrões internos	46
3.8	Preparo das soluções analíticas dos padrões internos	46
3.9	Preparo das soluções analíticas (soluções estoque e solução mistura de pesticidas)	47
3.10	Preparo do solvente extrator	47
3.11	Método de extração (QuEChERS modificado)	48
3.12	Otimização do procedimento de purificação do extrato de café	49
3.13	Validação do método QuEChERS modificado	51
3.13.1	Preparo das soluções analíticas para a avaliação da linearidade das curvas analíticas.....	51
3.13.2	Determinação da linearidade das curvas analíticas.....	51
3.13.3	Determinação da estimativa do LOD e LOQ do instrumento e método.....	52
3.13.4	Avaliação do efeito matriz do café.....	53
3.13.5	Análise do solvente extrator (acetonitrila).....	54
3.13.6	Ensaio de fortificação e extração para a avaliação da recuperação.....	54
3.13.7	Procedimento de fortificação antes da etapa de extração.....	55
3.14	Análises cromatográficas	55
3.14.1	Condições de análise por GC-MS (NCI-SIM).....	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	59
4.1	<i>Slurry</i> otimizado	59
4.2	Método otimizado de extração (QuEChERS modificado)	59
4.3	Validação do método QuEChERS modificado	60
4.3.1	Determinação da estimativa do LOD e LOQ do instrumento e do método...	60
4.3.2	Determinação da linearidade das curvas analíticas.....	68
4.3.3	Análise do solvente extrator (acetonitrila).....	71
4.3.4	Ensaio de recuperação.....	71
4.3.5	Efeito matriz do extrato de café.....	78
5	CONCLUSÕES	83
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	85
	REFERÊNCIAS	86
	APÊNDICES	94

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o café é um dos produtos primários de maior valor no comércio internacional. Seu cultivo, processamento, comércio, transporte e *marketing* criam emprego para milhões de pessoas no mundo todo (ICO, 2011a). O Brasil, que possui uma extensão territorial de 8.547.403,5 km² é também um dos maiores produtores e exportadores mundiais de café. Segundo dados do Conselho dos Exportadores de Café do Brasil (CECAFÉ) as exportações brasileiras bateram recordes em receita e volumes no ano de 2011 (CECAFÉ, 2011). Desde 2008, o Brasil é também o maior consumidor mundial de agrotóxicos e dependendo do volume de vendas estimado para 2010, pela Associação Brasileira da Indústria Química (ABIQUIM), o uso de agrotóxicos nas lavouras brasileiras deve bater um novo recorde em 2011. Dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) mostram que em torno de 15% dos alimentos consumidos pelos brasileiros contem resíduos de pesticidas em concentrações que podem ser prejudiciais a saúde (AMÉRICO, 2011).

Considerando o decréscimo dos limites máximos de resíduos (LMR) permitidos em alimentos, e também a proibição da presença de muitos pesticidas, em países da União Européia e da América, o desenvolvimento de métodos multirresiduais sensíveis e seletivos é um pré-requisito para a implantação de programas de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos (WALORCZYK, 2008; HERCEGOVÁ; DÖMÖTÖROVÁ; MATISOVÁ, 2007; LESUEUR et al., 2008).

Atualmente, para que um método analítico possa ser aplicado em análises de rotina é necessário que ele possua algumas características básicas, como a utilização de pequenas quantidades de amostra, de reagentes e de solventes, o uso de reagentes e solventes pouco nocivos aos analistas e ao meio ambiente (proposta de química verde), ter uma boa relação custo/benefício, ser pouco trabalhoso e ser rápido.

O desenvolvimento de métodos multirresiduais baseados em extrações com acetona (LUKE; FROBERG; MASUMOTO, 1975), acetonitrila (MILLS; ONLEY; GUITHER, 1963) ou acetato de etila (ROOS et al., 1987) melhorou substancialmente

o controle da presença de resíduos de pesticidas em muitas culturas de alimentos. Esses métodos tem sido continuamente modificados e otimizados para melhorar seu desempenho (PIZZUTTI et al.2009).

Devido ao aumento da utilização de pesticidas na agricultura, é necessário um controle mais rigoroso dos resíduos de pesticidas em todas as culturas alimentares, inclusive no café. Geralmente, refere-se ao café como sendo uma amostra de grande complexidade, especialmente para ser analisada por cromatografia gasosa. Portanto, não é de se estranhar que a literatura seja pobre de estudos sobre essa amostra e também de métodos para sua análise.

Dentro desse contexto, o objetivo deste estudo foi o desenvolvimento e a validação de um método adequado para o preparo de amostra (método QuEChERS modificado) e de um método de GC-MS (NCI-SIM) sensível e seletivo para análise de 51 pesticidas que podem estar presentes em grãos de café.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O café

2.1.1 A origem do cafeeiro e sua expansão pelo mundo

O primeiro documento sobre o café (*Coffea arabica*) de que se tem notícia foi um manuscrito árabe escrito por Abd Alkader por volta de 1558. O café desceu da Abissínia, após o século XIII, para o Iêmen e para o resto da Arábia, expandindo-se a seguir, pelo mundo, como artigo de consumo, primeiro no Oriente e, mais tarde, no Ocidente. Como produto de lavoura apareceu, sucessivamente, na Ásia, na Indonésia, nas Américas e na África Tropical. Embora a pátria do café seja a Abissínia, quem pressentiu sua importância e o cultivou foi a Arábia Feliz (Iêmen). Da Etiópia (ex-Abissínia), em meados do século XV o café espalhou-se pelo mundo. Da Abissínia, região de Kaffa, onde cresce nativo, foi levado para a Arábia Feliz, na Aldeia de Moka. No Iêmen o café se aclimatou facilmente, dado que as condições climáticas são semelhantes as da Abissínia. O Iêmen foi o primeiro a realizar o cultivo do cafeeiro, que cedo passou a exportá-lo aos países vizinhos.

Levado à Meca e, provavelmente, à Medina, por volta de 1455, ganhou o mundo. O café, em princípio, teve dois pontos de irradiação: o Iêmen, principalmente a região de Moka, e posteriormente Meca (e Medina). Os primeiros grandes consumidores de café foram os maometanos distribuídos principalmente pela Ásia, mas também em outras regiões. A Grécia teria conhecido a bebida em 1555.

O Egito manteve por longo tempo o monopólio de comércio de café; montou uma extraordinária estrutura para distribuí-lo para o Oriente e para o Ocidente, inclusive Europa. O Cairo foi historicamente a primeira capital do café; existiam ali 600 comerciantes do produto. O Cairo importou do Iêmen em 1660, 5.134.500 kg de café, para atender seu comércio internacional. Os primeiros concorrentes dos egípcios, no comércio internacional foram os portugueses, depois suplantados pelos

holandeses, franceses e ingleses. Em 1690, o cafeeiro foi levado pelos holandeses para a Indonésia (Ásia), a ilha de Java, o Ceilão e as Filipinas.

Na Europa, o café entrou pela Itália, Gênova, ou Veneza, por volta de 1615. No Velho Mundo praticamente não se cultivava o cafeeiro, entretanto os europeus são grandes consumidores e comerciantes de café. Em 1720 a Europa já consumia 20.000 toneladas de café e em 1750 o consumo passou para 32.340 toneladas. Só a França, em 1895, consumiu 180.000 toneladas do produto. Os holandeses, sobretudo, a Companhia Holandesa das Índias, foram os primeiros comerciantes de café da Europa.

Em 1710, Amsterdam recebia uma muda de cafeeiro que foi plantada no Jardim Botânico da cidade. Ali um pequeno cafeeiro abrigado em estufa especial desenvolveu-se, floresceu e frutificou, proporcionando a formação de novas mudas distribuídas aos principais hortos oficiais da Europa Ocidental. Do jardim botânico de Amsterdam, Holanda, em 1714, o cafeeiro foi levado para o Suriname (Guiana Holandesa) inaugurando o plantio da rubiácea nas Américas. Do Suriname o cafeeiro foi levado para a Guiana Francesa (Caiena) em 1720. De Caiena o cafeeiro foi trazido para o Brasil, em 1727, por Mello Palheta. Nos Estados Unidos o café entrou por volta de 1624.

Os europeus tinham domínio do comércio, que foi no início dos egípcios e dos turcos, depois dos portugueses e, por fim, de franceses, ingleses e holandeses, e não da produção, da qual ficava na dependência. Primeiro levaram o cafeeiro para suas colônias no Oriente (Java, Ceilão, Celebes, Timor, Sumatra, entre outros). Depois, dados os problemas com os povos daquela região, de natureza religiosa e política, empreenderam esforços para implantá-lo nas suas colônias das Américas Central, Sul e Norte.

Conforme Basílio Magalhães, o Sargento-mor Francisco Mello Palheta comprou e trouxe para o Brasil cinco mudas e mais de mil sementes, violando a determinação régia de 1720, do governador da Guiana Francesa, proibindo a venda de “sementes de café capazes de nascer”, que haveria de se tornar, na belíssima expressão de Affonso de Taunay, a *Brasiliae fulcrum* (GALETI, 2004).

2.1.2 A chegada do cafeeiro ao Brasil

Em 1727, o cafeeiro chega ao Brasil, trazido de Caiena, Guiana Francesa. Sabendo do bom desenvolvimento do cafeeiro no Pará, o governo português, em julho de 1731, isentou de todos e quaisquer impostos, por doze anos, a canela o café que se cultivassem ali.

No início de 1732 o Pará fez sua primeira remessa de café para Lisboa, sete libras de café como amostra. Em 1740, o Capitão general João de Abreu Castelo Branco, governador do Pará, em carta à corte registra: “E quanto à quantidade que a terra produz de café, acho que por estimativa dos práticos que serão neste ano de 400 a 500 arrobas”.

Nos anos de 1750 a 1880 as exportações pelo porto de Belém, giraram em torno de 3 mil arrobas, com exceção das décadas de 1860 e 1870. Em 1890 a exportação de café, por Belém, reduziu-se a 400 arrobas e em 1900 a 24 arrobas. Na segunda metade do século XIX, a exportação alcançou níveis animadores, mas sobreveio a extração da borracha, e a cultura do café praticamente desapareceu da terra paraense.

Do Pará saíram sementes e mudas para várias regiões; o Pará foi por assim dizer, o viveiro de café do Brasil. No Amazonas o café se estabeleceu em meados do século XVIII, principalmente nas regiões do Rio Negro e Madeira. Em 1819, o Amazonas exportou para Belém 5.725 arrobas e em 1830, 6.200 arrobas. Em 1864 a exportação foi de 212 arrobas.

Segundo alguns registros a cultura do cafeeiro iniciou-se no Maranhão em 1767. Entretanto, segundo informa Virgílio N. Pinto, em 1745, o Maranhão exportou para Lisboa, 400 arrobas de café. As exportações segundo o autor iniciaram-se em 1741, Manuel Nunes Dias informa que foram exportadas para Lisboa, pelo porto de São Luiz, em 1762, 1766 e 1772, respectivamente, 45, 07 e 38 arrobas de café.

Os piauienses nunca se interessaram pela cafeicultura, o Piauí sempre se dedicou à pecuária. Também na Paraíba e no Rio Grande do Norte a cafeicultura não se instalou. No Ceará, o cafeeiro entrou em 1747, com duas mudas trazidas de Paris, das quais só vingou uma. O ceará participou da campanha de renovação cafeeira, promovida pelo Instituto Brasileiro do Café (IBC), plantando entre 1971 e 1977, mais de seis milhões de cafeeiros. Tem hoje, aproximadamente, 8.590

hectares de plantados com café, produzindo cerca de quatro mil toneladas do produto.

Em Alagoas a produção de café foi sempre muito pequena ou mesmo insignificante. Pernambuco sempre produziu café, segundo a “Balança Geral do Comércio do Reino de Portugal”, o estado exportou para Lisboa, em 1796, seis arrobas de café; em 1800, 137 arrobas; em 1815, 1.300 e em 1840, 46.500. A partir de 1841, quando foram exportadas 6.680 arrobas do produto, caíram as exportações, reduzindo-se, em 1846, a 80 arrobas. Voltaram a crescer a partir de 1847 (804 arrobas). Foram superiores a 70 mil sacas de 60 quilos, a partir de 1921 e durante a década de 1920.

O café passou a ter expressão econômica no Brasil a partir de 1822 quando exportou 186.000 sacas do produto. Exportou em 1850/51 cerca de 2,5 milhões de sacas e em 1900 as exportações alcançaram 9 milhões de sacas. Foram 11,25 milhões em 1920; 15 milhões em 1930; 17 milhões em 1938. Em 1949 o Brasil exportou 19.368.993 (cerca de 1.000.000 toneladas). Em 1963 foram exportadas pelo Brasil 19.513.068 sacas de 60 kg de café em grão, no valor de US\$ 748.285.000. (GALETI, 2004).

2.1.3 O café na atualidade

O café é atualmente um produto de extrema importância para a economia mundial. No comércio internacional, ele é um dos produtos básicos mais valiosos, em muitos anos só superado em valor pelo petróleo como fonte de divisas para os países em desenvolvimento. Seu cultivo, processamento, comércio, transporte e *marketing* criam emprego para milhões de pessoas no mundo todo. Sua importância é crucial para a economia e política de muitos países em desenvolvimento. Em muitos países em desenvolvimento, como por exemplo, o Brasil e o México, as exportações de café respondem por uma proporção significativa das receitas em divisas. O café é negociado nas principais bolsas de futuros e mercadorias do mundo – nas bolsas de Londres e Nova Iorque em primeiro lugar (ICO, 2011a).

Atualmente as espécies mais importantes de café são a *Coffea arabica* (café arábica), a *Coffea canephora* (café robusta) e a *Coffea liberica* (café libérica). No Brasil existe a predominância da *Coffea arabica*.

O café produzido pela variedade *Coffea canephora* é comercialmente denominada café robusta. No Brasil, mais especificamente no Espírito Santo é cultivada a variedade de *Coffea canephora*, denominada conilon, cujo produto recebe no mercado o nome de café conilon (LIMA, 2010).

2.1.4 Aspectos botânicos e ecologia

O cafeeiro pertence à família *Rubiaceae*, gênero *Coffea* e é uma planta dicotiledônea, perene, arbustiva, ou arbórea, lenhosa e de folhas persistentes. Suas sementes levam em torno de 40 a 60 dias para germinarem (LIMA, 2010).

A família *Rubiaceae*, tem cerca de 500 gêneros e mais de 6.000 espécies. A maior parte são árvores e arbustos tropicais, que crescem nas áreas mais baixas das matas. Outros membros da família são as gardêneas e as plantas produtoras de quinino e de outras substâncias úteis, mas o gênero *Coffea* é o membro mais importante, em termos econômicos.

Tabela 1- Classificação botânica do café.

Família	Gênero	Espécies	Variedades
<i>Rubiaceae</i>	<i>Coffea</i>	<i>arabica</i>	<i>Typica</i>
		<i>canephora</i>	<i>Robusta</i>
		<i>liberica</i>	

Fonte: GALETI, 2004.

Há pelo menos 25 espécies importantes, todas nativas da África tropical e de algumas ilhas do Oceano Índico, de Madagáscar em particular. A dificuldade em classificar e até mesmo designar uma planta como membro verdadeiro do gênero

Coffea deve-se à grande variação de suas plantas e sementes. Todas as espécies do gênero são lenhosas, mas em apresentação elas podem variar de pequenos arbustos a grandes árvores com mais de 10 metros de altura, com folhas amareladas, verde-escuro, cor de bronze ou com toques de púrpura (ICO, 2011b).

Economicamente, as duas espécies mais importantes são a *Coffea arabica*, que responde por mais de 70% da produção mundial, e a *Coffea canephora*. Duas outras espécies cultivadas em menor escala são o *Coffea liberica* e o *Coffea dewevrei* (café excelsa) (FAO, 2011a).

Para o cultivo da *Coffea arabica* as temperaturas ideais variam de 15 a 24 °C e para a *coffea robusta* de 24 a 30 °C, o qual suporta condições mais quentes e mais secas, mas não tolera temperaturas muito abaixo de 15 °C, como a *Coffea arabica*. Em geral, a cultura do café precisa de 1500 a 3000 mm de chuva por ano e a geada danifica todos os tipos de café e representa um perigo tanto no sul do Brasil como mais perto do Equador, em altitudes em torno de 2000 metros.

Enquanto a *Coffea robusta* pode ser cultivada entre o nível do mar e uma altitude de cerca de 800 metros, a *Coffea arabica* se dá melhor em terrenos mais altos, sendo frequentemente cultivado em áreas montanhosas (ICO, 2011b).



Figura 1 – Fotografia de um cafeeiro da espécie *Coffea arabica*.

2.1.5 Composição dos grãos de café

Os frutos do café são constituídos de casca, polpa, pergaminho, película prateada e duas sementes plano-convexas (LIMA, 2010).

A composição química dos grãos é influenciada por fatores genéticos, ambientais e culturais, pelos métodos de colheita, processamento, armazenamento, torração e moagem, o que podem afetar diretamente a qualidade da bebida do café. A origem genética dos grãos é tão decisiva quanto todos os outros cuidados que permeiam a produção, do pé de café à xícara do consumidor.

Entre os açúcares presentes nos grãos de café, a sacarose destaca-se como sendo encontrada em maior quantidade e sua quantificação pode variar entre espécies, origem e tipo de processamento. Os óleos têm importante papel na retenção do flavor do café torrado, e devido aos altos teores em que são encontrados nos grãos, são objetos de vários estudos. Os compostos fenólicos estão presentes no grão de café em grandes proporções. Sua função tem sido associada à inibição de insetos e pragas, e quando encontrados em grandes proporções, são associados à perda de qualidade do café. Estudos mostraram que os teores de polifenóis e do ácido clorogênico no café robusta foram superiores aos do café arábica (MENDONÇA et al.,2007).

A matéria prima industrial é constituída das sementes separadas pelo descascamento dos frutos secos. As sementes secas tem cor verde-acinzentada característica e umidade ao redor de 11%. A tabela 2 mostra a composição dos grãos de café (LIMA, 2010).

2.1.6 O café como bebida

Como bebida, o café é a infusão obtida pela escalda do pó resultante da moagem dos grãos torrados. A composição da infusão de café varia de acordo com a quantidade de pó e de água usados no preparo. Varia também com a espécie de café e com a granulometria do pó e seu sabor e aroma decorrem da presença de substâncias voláteis de não voláteis.

Tabela 2. Composição dos grãos de café.

Componentes	% sobre a matéria úmida	
	Mínimo	Máximo
Umidade	4,06	9,54
Matérias nitrogenadas	0,75	11,57
Cafeína livre	0,12	0,68
Cafeína combinada	0,85	1,41
Matéria graxa	10,42	14,22
Extrativos não nitrogenados	43,99	52,24
Celulose	12,00	17,44
Cinzas	2,84	3,81
Extrato aquoso	23,89	27,10
Extratos precipitados com acetato de chumbo	6,66	9,10
Sacarose	4,36	7,30

Fonte: LIMA, 2010.

A classificação da qualidade é essencial para o comércio de café, a partir dela são estabelecidas as misturas (*blends*) para os lotes de grãos. A classificação pela degustação é considerada o melhor critério. Após a avaliação, o café é enquadrado na classificação oficial que representa sete escalas de bebidas, tendo como referência básica o café classificado como *mole*. As sete escalas são:

Estritamente mole: apresenta todos os requisitos de aroma e sabor da bebida mole, mas de forma mais acentuada;

Mole: tem sabor agradável, suave e adocicado;

Apenas mole: tem sabor suave, mas a qualidade é inferior à dos anteriores, com leve adstringência ou aspereza no paladar;

Dura: apresenta gosto acre, adstringente e áspero;

Riada: tem leve sabor de iodofórmio;

Rio: tem cheiro e gosto acentuados de iodofórmio;

Rio zona, macaco: são denominações regionais para qualificar bebidas com características desagradáveis, bem mais acentuadas que as da bebida *rio* (LIMA, 2010).

2.1.7 Pragas e doenças do café

Dentro do conceito de cafeicultura racional o controle às pragas do cafeeiro ocupa lugar de destaque. O cafeeiro pode ser atacado por muitas pragas, que se não combatidas devidamente, ocasionam grandes prejuízos e em muitos casos limitando a produção. Dentre as pragas que atacam os cafeeiros pode-se citar:

- A “broca do café” (*Hypothenemus hampei*): é prejudicial em todos estágios de desenvolvimento do fruto. O controle químico pode ser feito com endossulfam;
- O “bicho mineiro” (*Perileucoptera coffeella*): é a praga mais prejudicial depois da “broca do café”. Causa queda das folhas em viveiros de mudas e nas lavouras. O controle é realizado com inseticidas fosforados e piretróides;
- As cochonilhas: Cochonilha verde (*Coccus viridis*), Cochonilha Branca (*Planococcus citri*), Cochonilha da raiz (*Dysmicoccus cryptos*), Cochonilha de placa (*Orthezia praelonga*). As cochonilhas atacam os ramos, as folhas, os botões florais e frutos das plantas. Controle é feito com inseticidas fosforados;
- Os nematóides (*Meloidogyne incógnita*, *M. exigua* e *M. coffeicola*): causam ataque, normalmente, em reboleiras (áreas atacadas por nematóides) com redução da produção e morte de plantas. São de difícil erradicação, deve-se utilizar medidas preventivas utilizando mudas de boa procedência e evitar plantios em locais infestados onde anteriormente haviam plantações de café (AGROBYTE, 2011; SANTOS, 2011);
- As cigarras (*Quesada gigas*, *Q. sodalis*, *Carineta fasciculata*, *Fidiccina pullata*, *F. drewseni*, *F. mannifera*): provocam desfolhamento das plantas e podendo levar a morte. Controle é feito com inseticidas como forato e dissulfoton;
- Os cupins (*Cornitermes spp.*): causam o amarelamento das folhas do cafeeiro, podendo levar à morte. O controle é feito com aldrim e heptacloro;
- As lagartas: alimentam-se das folhas, das pontas dos ramos, das frutas e da casca de plantas novas. O controle químico é feito com cloropirifós, carbaril, endossulfam, entre outros;
- Os ácaros: destacam-se o “ácaro vermelho” (*Oligonychus ilicis*) e o “ácaro branco” (*Polyphagotarsonemus latus*), eles atacam as folhas das plantas.

Essas pragas podem ser controladas pelo uso de endossulfan, clorobenzilato e ometoato (THOMAZIELLO; TOLEDO; OLIVEIRA, 1979).

Muitas doenças incidem sobre o cafeeiro nas fases de viveiro e de campo.

Entre as doenças que atingem o cafeeiro pode-se citar:

- A “ferrugem”, causada pela *Hemileia vastatrix*, é a mais grave. O controle químico dessa praga pode ser feito com aplicação de fungicidas cúpricos;
- A *Cercosporiose*, também conhecida por “mancha de olho pardo”, causa desfolhamento em plantações e viveiros. O controle preventivo é feito evitando viveiros em locais úmidos e utilizando substratos ricos na formação das mudas. O controle químico se faz com fungicidas cúpricos;
- *Rizoctoniose*, conhecida por doença do “tombamento” é comum em viveiros. O controle preventivo se faz evitando a formação de viveiros em locais com alta umidade e muito sombreados. Controle químico com fungicidas cúpricos (SANTOS, 2011; LIMA, 2010);
- “Mancha aureolada” (*Pseudomonas garçae*): aparece com preferência nas plantas jovens, atrasando seu desenvolvimento. Caracteriza-se pelo aparecimento de manchas de cor parda circundadas por um grande halo amarelo. O controle químico é feito com o uso de fungicidas a base de oxicloreto de cobre;
- “Seca de ponteiros” ou “seca de ramos” é causada pelo *Colletotrichum coffeanum*, *Pseudomonas garceae*, *Phoma spp.* e deficiências nutricionais. Os ramos atacados secam da extremidade para a base, não há desenvolvimento vegetativo e os frutos escurecem tendendo a chochar. O controle é feito pela pulverização de fungicidas como o captafol;
- “Canela seca” (*Ascochyta coffeae*): forma uma depressão seca, de cor marrom, na casca das mudas. O controle preventivo é feito pelo uso de fungicidas cúpricos e a base de captafol (THOMAZIELLO; TOLEDO; OLIVEIRA, 1979).

2.2 Pesticidas

Os agrotóxicos, também denominados de pesticidas ou praguicidas, são atualmente responsáveis pelo comércio de bilhões de dólares em todo o mundo (STOPPELLI & MAGALHÃES, 2005). São substâncias que, apesar de serem cada vez mais utilizadas na agricultura, podem oferecer perigo para o homem, dependendo da toxicidade, do grau de contaminação e do tempo de exposição durante sua aplicação (CASTRO & CONFALONIERI, 2005).

No meio ambiente, o uso abusivo de agrotóxicos têm trazido comprometimentos relativos à contaminação do ar, solo, água e dos seres vivos, determinando a extinção de espécies de menor amplitude ecológica (STOPPELLI & MAGALHÃES, 2005).

Os praguicidas, segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), são produtos químicos ou quaisquer substâncias ou misturas de substâncias destinadas à prevenção, à destruição ou ao controle de qualquer praga, incluindo os vetores de doenças humanas ou de animais, que causam prejuízo ou interferem de qualquer forma na produção, elaboração ou armazenagem, transporte ou comercialização de alimentos, produtos agrícolas, madeira e produtos da madeira.

Esse termo inclui também as substâncias destinadas a serem usadas como reguladoras do crescimento das plantas, desfolhantes, dessecantes, agentes para reduzir a densidade ou evitar a queda prematura dos frutos, e as substâncias aplicadas nas culturas, antes ou após a colheita para proteger o produto durante o depósito ou transporte. São usados, sobretudo, na agricultura para combater pragas, ervas daninhas ou doenças nas plantas e também como agentes de controle de vetores nos programas de saúde pública e, em menor quantidade, na pecuária e na silvicultura.

Definição semelhante à da FAO é usada na legislação brasileira, para agrotóxico, que substitui o termo defensivo agrícola, para denominar os venenos agrícolas, colocando em evidência a toxicidade desses produtos para o meio ambiente e à saúde humana. Essa definição exclui os fertilizantes e os produtos químicos (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) os pesticidas podem ser classificados em função do tipo de praga que controlam e em função da classe química a que pertencem. Outras categorias incluem biopesticidas, antimicrobianos e dispositivos de controle de pragas. Os principais pesticidas químicos são os organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretróides (EPA, 2010).

2.3 Principais grupos de praguicidas

2.3.1 Piretróides

Os piretróides são compostos sintéticos desenvolvidos a partir da piretrina natural. Entre seus ingredientes ativos (IAs) largamente utilizados como inseticidas domésticos, podem ser citados: aletrina, cipermetrina, deltametrina, resmetrina e bioresmetrina. Os estudos sobre o mecanismo de ação tóxica desse grupo não são conclusivos (LARINI, 1997), mas entre os efeitos lesivos descritos estão reações alérgicas e manifestações sistêmicas e neurológicas (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

A alta atividade inseticida dos piretróides possibilita o seu emprego em pequenas dosagens, associada à seletividade que apresentam, tem possibilitado o aparecimento no mercado de novos produtos de origem sintética (LARINI, 1997). Esses compostos tem como vantagem serem solúveis na maioria dos solventes, destacando uma solubilidade maior de 50% dos princípios ativos em acetona, álcool, éter, entre outros. São instáveis em meio alcalino, sendo necessário ajustar o pH das águas que são utilizadas para a preparação das caldas. São fotoestáveis, porém, sofrem transformações metabólicas, principalmente por oxidação. Dentre os piretróides comumente utilizados na cultura do café estão a cipermetrina, a decametrina, o fenvalerato e a permetrina (CAVERO, 1985).

2.3.2 Organofosforados

Os inseticidas organofosforados são ésteres amido ou tiol derivados dos ácidos fosfórico, fosfônico, fosforotióico e fosfonotióico. São rapidamente hidrolisados, tanto no meio ambiente, como nos meios biológicos, e altamente lipossolúveis, com alto coeficiente de partição óleo/água (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

De acordo com a estrutura química, estes inseticidas podem ser classificados como: fosforados (paraoxon etílico), tiofosforados (parationa-etílica e parationa-metílica, sumition, fentiona, diazinona, dimetoato, formotion, malationa, disiston, gusation), clorofosforados (dipterex, trition, bromofós-etílico, fenclorfós), fluor e cianofosforados (sarin, soman, tabun) (LARINI, 1997).

Os compostos organofosforados são agentes colinérgicos indiretos. Isto é inibem a colinesterase (enzima que degrada acetilcolina), impedindo a inativação da acetilcolina (neurotransmissor). Consequentemente, esta atua de modo mais intenso e prolongado nas sinapses colinérgicas. Entre os sintomas das intoxicações por organofosforados pode-se citar: miose, vômitos, diarreia, salivação, convulsões e coma, entre outras (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Os pesticidas desta classe mais utilizados em culturas de café são: diazinona, etiom, fenitroton, fention, isoxation, malationa, parationa-etílica, parationa-metílico, triazofós, afidam, dicrotofós, dimetoato, dimetoato etílico, disulfotom, fenolssulfotion e forato (CAVERO, 1985).

2.3.3 Carbamatos

O grupo dos carbamatos é formado por derivados do ácido n-metil-carbâmico e dos ácidos tiocarbamato e ditiocarbamato. Estes últimos não são inibidores das colinesterases e tem usos e toxicidades diferentes.

Compostos deste grupo tem baixa pressão de vapor e pouca solubilidade em água, são moderadamente solúveis em benzeno e tolueno, e altamente solúveis em metanol e acetona.

Assim como os fosforados, os carbamatos são inibidores da colinesterase. A inibição que produzem não costuma ser irreversível e é de duração relativamente curta. A sintomatologia tóxica é semelhante a provocada pelos fosforados, mas geralmente são menos intensos os distúrbios do sistema nervoso central (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Dentre os carbamatos mais frequentemente utilizados em culturas de café podemos citar o aldicarbe, o carbufuram, o cloetocarbe e o metomil (CAVERO, 1985).

2.3.4 Organoclorados

Os inseticidas organoclorados são estruturas cíclicas, com peso molecular entre 300 e 500, tem limitada volatilidade e são estimulantes do sistema nervoso central. Foram amplamente utilizados na agricultura, na silvicultura, na saúde pública e no domicílio. A partir da década de 1970, a maioria deles foi proibida e restringida em muitos países por apresentarem bioacumulação, biomagnificação e persistência por várias décadas e consequentes danos aos seres vivos e ao meio ambiente.

Os principais compostos podem ser agrupados nas seguintes categorias: a) diclorodifeniltricloroetano (DDT) e análogos; b) hexaclorociclohexano (lindano); c) ciclodienos (aldrin, dieldrin, endrin, endosulfan, clordano, heptacloro e mirex); d) toxafeno e compostos relacionados (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Principais compostos organoclorados utilizados na cultura do café: hexacloroeto de benzeno (BHC), endossulfan, endrin e lindano.

2.4 Pesticidas no Brasil

No Brasil, de acordo com o Decreto nº 4.074 de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7802/1989, agrotóxicos e afins são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas

pastagens, na proteção de florestas nativas ou plantadas e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989).

A extensiva utilização de pesticidas representa um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, especialmente naqueles com economias baseadas no agronegócio, caso do Brasil. Somente nos Estados Unidos, segundo a EPA, existem mais de 18 mil produtos licenciados para uso, e a cada ano cerca de 1 bilhão de litros de pesticidas são aplicados na produção agrícola, residências, escolas, parques e florestas (EPA, 2002).

Nos últimos anos houve grande crescimento na utilização de agrotóxicos no Brasil, o que tem sido associado ao aumento vertiginoso dos riscos de contaminação prejudiciais à saúde. O descuido com os agrotóxicos pode ser fatal e causar agravos à saúde, tais como: irritações na pele e nos olhos, problemas respiratórios, câncer em vários órgãos e distúrbios sexuais, como a impotência e a esterilidade.

Em 2001, a ANVISA desenvolveu o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), com o objetivo de monitorar o cumprimento da legislação sobre o grau permitido de resíduos de agrotóxicos nos alimentos, quais produtos podem ser utilizados em cada colheita e garantir que produtos como frutas, verduras e legumes cheguem com qualidade e segurança à mesa dos brasileiros (ANVISA, 2011).

A contaminação de alimentos na mesa do brasileiro é uma realidade, segundo dados do PARA. Destaca-se, para os 26 estados brasileiros, os níveis de contágio nas culturas de pimentão (80%), uva (56,4%), pepino (54,8%) e morango (50,8%), acompanhados ainda da couve (44,2%), abacaxi (44,1%), mamão (38,8%) e alface (38,4%), além outras 12 culturas analisadas e registradas com resíduos de agrotóxicos.

O fato é ainda mais preocupante, pois das 819 amostras que apresentaram IAs não autorizados, 206 amostras (25,1%) apresentaram resíduos que se encontram em processo de reavaliação toxicológica no Brasil. Desse universo, 32 amostras contem IAs banidos ou nunca sequer registrados no Brasil, como o

heptacloro, clortiofós, dieldrin, mirex, parationa-etílica, monocrotofós e azinfós-metílico (CARNEIRO, 2010).

O Brasil, segundo estudo da consultoria alemã Kleffmann Group, é o maior mercado de agrotóxicos do mundo. O levantamento foi encomendado pela Associação Nacional de Defesa de Vegetal (ANDEF), que representa os fabricantes, e mostra que essa indústria movimentou no ano de 2009 US\$ 7,1 bilhões, ante US\$ 6,6 bilhões do segundo colocado, os Estados Unidos. Em 2007, a indústria nacional girou US\$ 5,4 bilhões, segundo Lars Schobinger, presidente da Kleffmann Group no Brasil. O consumo cresceu no país, apesar de a área plantada ter encolhido 2% no ano passado.

Apesar do grande volume de recursos movimentados pela indústria no mercado brasileiro, o consumo por hectare ainda é pequeno em relação a outros países. De acordo com o levantamento, o gasto do produtor brasileiro com agrotóxico ainda é pequeno, se comparado a outros países. Em 2007, gastou-se US\$ 87,83 por hectare. Na França, os produtores desembolsaram US\$ 196,79 por hectare, enquanto no Japão a despesa foi de US\$ 851,04. Por esse motivo, o presidente da consultoria Kleffmann Group acredita que a tendência nos próximos anos é que o Brasil se estabilize na primeira colocação no consumo de agrotóxico (PACHECO, 2009).

2.5 Contaminação ambiental por agrotóxicos

A partir da Segunda Guerra Mundial, visando aumentar a provisão de alimentos para atender a explosão demográfica mundial, houve a necessidade de se buscar produtos mais eficientes. Após um lento desenvolvimento tecnológico, houve a introdução dos primeiros agrotóxicos, destacando-se a ação inseticida do DDT. Este episódio deu uma nova importância aos agrotóxicos à base de compostos orgânicos no que se referia à saúde pública, tanto no aumento da produtividade agrícola quanto no controle de vetores de doenças.

Da mesma forma que algumas características químicas, como a persistência, eram acrescidas à função biocida dos agrotóxicos organoclorados, resultando num fator positivo para a agricultura (o mesmo agrotóxico eliminaria mais pragas por um

período maior de tempo) também representavam maiores riscos à saúde humana e ao meio ambiente (VEIGA; SILVA; VEIGA, 2005).

No Brasil, os agrotóxicos apareceram na década de 1960-1970, como solução para o controle das pragas que atingiam lavouras e rebanhos. Tal visão, reforçada pela forte e crescente atuação da indústria química no país, passou a legitimar o uso indiscriminado de agrotóxicos no meio rural (PERES et al., 2005).

A contaminação ambiental por pesticidas caracteriza-se pela dispersão desses ao longo dos diversos componentes do meio ambiente: a contaminação das águas, com a migração de resíduos de agrotóxicos para lençóis freáticos, leitos de rios, córregos, lagos e lagunas próximos; a contaminação atmosférica, resultante da dispersão de partículas durante o processo de pulverização ou de manipulação de produtos finamente granulados (durante o processo de formulação) e evaporação de produtos mal-estocados; e a contaminação dos solos. A contribuição da via ambiental é de fundamental importância para o entendimento da contaminação humana por agrotóxicos. Acredita-se que um maior número de pessoas esteja exposto por essa via, em relação à via ocupacional. Entretanto, o impacto resultante da contaminação ambiental é, em geral, consideravelmente menor que o impacto resultante da via ocupacional (MOREIRA, 2002).

Agrotóxicos aplicados abusivamente contaminam o solo e o sistema hídrico, podendo gerar danos à saúde e provocando alterações significativas nos ecossistemas. Por isso, pode-se inferir que existe uma forte relação entre o aumento de produtividade, o aumento do uso de agrotóxicos, a degradação ambiental e os danos à saúde humana.

Existe uma grande dificuldade de avaliar os riscos associados à contaminação do meio ambiente. Os pesticidas podem ser persistentes, móveis e tóxicos no solo, na água e no ar. Tendem a se acumular no solo e na biota e seus resíduos podem chegar aos sistemas superficiais por deflúvio superficial e aos sistemas subterrâneos por lixiviação. A contaminação por agrotóxicos ainda pode afetar o meio ambiente indiretamente, aumentando a virulência das pragas ou por eliminação indesejável dos predadores naturais de certos microorganismos (VEIGA; SILVA; VEIGA, 2005).

2.6 Exposição humana aos pesticidas

O impacto do uso de pesticidas sobre a saúde humana é um problema que tem merecido atenção da comunidade científica em todo o mundo, sobretudo nos países em desenvolvimento (PERES et al., 2005).

Os agrotóxicos são desenvolvidos para terem ação biocida, e por isso são potencialmente danosos para todos os organismos vivos, porém, sua toxicidade e comportamento no ambiente podem variar muito. Esses efeitos podem ser crônicos quando interferem na expectativa de vida, crescimento, fisiologia, e reprodução dos organismos e/ou podem ser ecológicos quando interferem na disponibilidade de alimentos, de habitat e na biodiversidade, incluindo os efeitos sobre os inimigos naturais das pragas e a resistência induzida aos próprios agrotóxicos (VEIGA; SILVA; VEIGA, 2005).

O monitoramento da exposição humana a agentes tóxicos contribui significativamente para a redução do número de pessoas a serem avaliadas clinicamente, impede o estabelecimento de quadros individuais de intoxicação – a partir do afastamento do trabalhador da fonte de contaminação – e atenua a gravidade deste quadro, nos casos em que os indivíduos já se encontram intoxicados. Adicionalmente, facilita o processo de tratamento dos indivíduos intoxicados, pela indicação terapêutica mais adequada ao agente (químico ou biológico) encontrado (PERES et al., 2005).

Segundo o Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas (SINITOX), foram registrados no ano de 2009, no Brasil, 11.484 casos de intoxicação por agrotóxicos. Sendo que a maioria dos casos foram registrados na região sudoeste (44,8%) e no na região sul (23,5%) do país (SINITOX, 2009).

As publicações mais recentes da Organização Internacional do Trabalho/Organização Mundial da Saúde (OIT/OMS) estimam que, entre trabalhadores de países em desenvolvimento, os agrotóxicos causam anualmente 70 mil intoxicações agudas e crônicas que evoluem para óbito. E pelo menos 7 milhões de doenças agudas e crônicas não-fatais, devido aos pesticidas. Estudos brasileiros e em outros países têm destacado os elevados custos para a saúde humana, ambiental e mesmo perdas econômicas na agricultura, devido ao uso de pesticidas.

Embora a pesquisa brasileira sobre o impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana também tenha crescido nos últimos anos, ainda é insuficiente para conhecer a extensão da carga química de exposição ocupacional e a dimensão dos danos à saúde, decorrentes do uso intensivo de agrotóxicos. Um dos problemas apontados é a falta de informações sobre o consumo de agrotóxicos e a insuficiência dos dados sobre intoxicações por estes produtos. A relevância do tema é destacada ao se considerar a dimensão e a diversidade dos grupos expostos: os trabalhadores da agropecuária, saúde pública (controle de vetores), empresas desinsetizadoras, indústrias de pesticidas e do transporte e comércio de produtos agropecuários (FARIA; FASSA; FACCHINI, 2007).

2.7 Limites máximos de resíduos

O LMR é a concentração máxima de resíduos de um praguicida (em mg kg^{-1}) recomendada pela comissão do *Codex Alimentarius*, para que seu uso seja legalmente permitido na superfície e na parte interna dos alimentos para consumo humano e de animais. Os LMR se baseiam em dados das boas práticas agrícolas para o uso de pesticidas e tem por objetivo garantir que os alimentos derivados de produtos básicos que se ajustam aos LMR sejam toxicologicamente aceitáveis.

Os LMR do *Codex Alimentarius*, que se destinam principalmente a ser aplicados a produtos que circulam no comércio internacional, são obtidos baseando-se nas estimativas feitas pela *Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues* (JMPR) depois da avaliação toxicológica do praguicida, seus resíduos e a revisão dos dados de resíduos obtidos em ensaios e usos supervisionados, em particular usos que se ajustam as boas práticas agrícolas nacionais. No exame se incluem dados de análises supervisionadas a concentração de uso mais elevada recomendada, autorizada no país.

Para atender às variações das necessidades nacionais de controle de pragas nos LMR do *Codex Alimentarius* são considerados os maiores níveis observados em ensaios controlados, que servem de base para representar as práticas eficazes para o controle de pragas (FAO, 2011b).

2.8. Preparo de amostras para análise de resíduos de pesticidas

Uma das etapas fundamentais no desenvolvimento de métodos multirresiduais é a seleção do solvente extrator. Um solvente ideal para determinação de múltiplas classes de pesticidas deve ser compatível com os analitos com o preparo da amostra e com a análise cromatográfica. Os fatores que devem ser levados em consideração na escolha do solvente extrator são: compatibilidade com os analitos (eficiência na extração para o intervalo desejado de polaridades e estabilidade dos analitos durante o preparo da amostra e estocagem do extrato final), seletividade (habilidade de evitar potenciais interferentes da matriz no extrato final), habilidade de particionamento com água (imiscibilidade com água ou possibilidade de induzir particionamento usando aditivos), compatibilidade com técnicas usadas para purificação do extrato e/ou determinação dos pesticidas, volatilidade caso a evaporação do solvente seja desejada, segurança para os analistas e para o meio ambiente, além de baixo custo (MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004).

2.8.1 Método QuEChERS

Em 2003 Anastassiades et al. relataram um atraente método para preparo de amostras denominado QuEChERS (rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro do inglês, *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*). Este método cobre um grande escopo de analitos, incluindo analitos polares, semi-polares, e não polares em várias matrizes. O procedimento envolve uma etapa única de extração da amostra com acetonitrila, seguido de um particionamento líquido-líquido pela adição de sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio. A remoção de água e a purificação (*clean-up*) são realizadas simultaneamente com extração em fase sólida dispersiva, usando sulfato de magnésio e adsorvente de amina primária e secundária (PSA), (ANASTASSIADES et al., 2003).

O método QuEChERS e várias versões modificadas tem sido utilizados com sucesso para a extração de pesticidas de uma variedade de alimentos, acima de

tudo em frutas e vegetais (HÚŠKOVÁ et al., 2009; LESUEUR et al., 2008; NGUYEN et al., 2008). Anastassiades et al. (2003) e Lehotay et al. (2005) modificaram o QuEChERS original, não tamponado, passando a utilizar um tampão acetato e citrato respectivamente, para evitar a degradação de certos pesticidas sob condições alcalinas (LEHOTAY, 2007).

2.8.2 Método de Luke

Em 1975, Luke et al. desenvolveram um método de extração denominado método de Luke. Esse método tinha por objetivo possibilitar a extração de um grande número de pesticidas, desde polares e apolares além de hidrocarbonetos como bifenilas e ortofenilas. Originalmente o método de Luke consistia em uma etapa de extração de 100 g de amostra utilizando acetona (200 mL), seguida de uma partição líquido-líquido com solventes apolares (éter de petróleo e diclorometano), sendo utilizados 100 mL de cada (LUKE; FROBERG; MASUMOTO, 1975).

Na década de 1980, o *The Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority* (NVWA) da Holanda desenvolveu o método de extração mini-Luke, o qual é uma miniaturização do método de Luke original, omitindo-se a etapa de particionamento com cloreto de sódio. O método consiste na extração de 15 g de frutas ou vegetais já processados, adicionando-se acetona (30 mL) seguida de homogeneização em Ultra-Turrax por cerca de 30 segundos, sendo posteriormente adicionados éter de petróleo (30 mL) e diclorometano (30 mL), agitando-se novamente por cerca de 30 segundos. A miniaturização deste método possibilitou a redução da quantidade de amostra, bem como de solventes utilizados. Entretanto, valores baixos de recuperação (< 70%) foram obtidos para pesticidas polares, como metamidofós, ometoato, monocrotofós entre outros. Como um método de extração alternativo, desenvolveu-se no NVWA uma modificação do método de extração mini-Luke nos anos 90, onde foi adicionado sulfato de sódio anidro na etapa de extração levando, assim, a uma melhor extração dos pesticidas polares (HIEMSTRA & DE KOK, 2007).

2.8.2 Extração com acetato de etila

Acetato de etila, juntamente com acetona e acetonitrila estão entre os solventes orgânicos mais usados em métodos multirresiduais de pesticidas (MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004). Até 1981 o método de Luke, era o método analítico mais utilizado nas análises multirresiduais. Contudo, as baixas recuperações obtidas para pesticidas com caráter polar levaram a pesquisa de outros solventes para extração. Como resultado a extração com acetato de etila juntamente com purificação por cromatografia de permeação em gel (GPC) e análise por GC com detectores seletivos passou a ser usada desde 1989 em programas de monitoramento de resíduos de pesticidas na Suécia. Acetato de etila forneceu maiores valores de recuperação para pesticidas polares, além disso, mostrou-se mais rápido, mais fácil e mais barato que o método de Luke.

Acetato de etila tem demonstrado ser um solvente com características universais, uma vez que possui capacidade para extrair pesticidas de diferentes classes em diversos tipos de amostras, porém os percentuais de recuperação de pesticidas com caráter básico ($pK_a > 4$) são baixos devido a problemas de degradação, sendo necessária a adição de hidróxido de sódio para um aumento destes percentuais.

Desde 1989 o método baseado em extração com acetato de etila tem sido usado na Suécia pelo *Swedish National Food Administration* (NFA), para monitorar resíduos de pesticidas em frutas e vegetais. Na metodologia utilizada no NFA é feito o ajuste de pH com bicarbonato de sódio, no intuito de obter melhores recuperações para os pesticidas básicos e também para melhorar sua estabilidade em acetato de etila (PIHLSTRÖM et al., 2007).

2.9 Métodos cromatográficos para a análise de resíduos de pesticidas

Com os valores dos LMR dos pesticidas em alimentos em queda, aumenta-se a demanda por alimentos de melhor qualidade por parte do governo e consumidores, direcionando as análises de pesticidas para metodologias mais

sensíveis e adequadas. Os métodos de análises devem ser sensíveis o suficiente para cobrir não somente os limites permitidos pela legislação, mas também a detecção de substâncias já proibidas, especialmente para compostos potencialmente genotóxicos e carcinogênicos.

A praticidade tem grande importância na seleção de métodos analíticos em monitorização biológica de exposição aos pesticidas, pois a dificuldade da preservação e transporte das amostras, a complexidade técnica e o alto custo das medidas laboratoriais frequentemente limitam a aplicação de biomarcadores disponíveis. Neste contexto, as separações cromatográficas tornaram-se um instrumento fundamental para análises de amostras ambientais e biológicas contendo pesticidas.

A partir do desenvolvimento de colunas capilares e detectores mais seletivos e mais sensíveis, aumentou-se o número de pesticidas detectados em uma única análise. Devido a estas características a GC é a técnica mais amplamente empregada para análises de resíduos de pesticidas (VARELI, 2008).

2.9.1 Cromatografia gasosa

A GC é uma técnica de separação na qual os componentes de uma mistura são separados por interação diferencial de seus componentes entre uma fase estacionária (líquida ou sólida). A fase móvel é um gás inerte que tem a função de arrastar a amostra através da coluna onde ocorrerá a separação.

O estado físico da fase estacionária pode ser líquido ou sólido. O líquido pode estar simplesmente espalhado sobre um suporte sólido ou imobilizado sobre este. A imobilização pode envolver ligações químicas entre o líquido e o suporte ou somente entre as cadeias do próprio líquido. Devido às vantagens de volatilidade e solubilidade reduzidas atribuídas as fases estacionárias quimicamente imobilizadas sobre o suporte, é comum considerar-se esta uma categoria distinta, ou seja, a cromatografia com fase ligada (COLLINS, et al., 1997).

Na década de 60, a GC utilizando colunas empacotadas foi adotada devido a sua capacidade de análise multirresidual de pesticidas. Os primeiros analistas utilizavam detectores como o detector por captura de elétrons (ECD), que possibilita

a determinação simultânea de vários pesticidas halogenados. O sucesso do ECD levou ao desenvolvimento de outros detectores seletivos como o detector de nitrogênio e fósforo (NPD), seletivo para compostos contendo esses elementos em sua estrutura, e o detector fotométrico de chama (FPD), seletivo para compostos contendo enxofre e fósforo em sua estrutura. Esses detectores possuem alta sensibilidade, porém não permitem a obtenção de informações estruturais dos analitos, assim as informações para a confirmação da identidade dos analitos são escassas.

A alta vazão do gás de arraste utilizado com as colunas empacotadas é incompatível com o vácuo necessário na câmara de ionização dos espectrômetros de massas (VAN DER HOFF & VAN ZONEN, 1999). Porém, o advento das colunas capilares permitiu a redução da vazão do gás de arraste e tornou possível o acoplamento de espectrômetros de massa como detectores para GC (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005). Na década de 1980 surgiram os primeiros sistemas GC-MS baseados em analisadores de massa do tipo quadrupolo. Porém, esses sistemas eram muito caros e pouco sensíveis. Assim, a aplicação da GC-MS na análise de resíduos de pesticidas somente se tornou viável na década de 1990 com a introdução do detector por aprisionamento de íons (ITD) (VAN DER HOFF & VAN ZONEN, 1999).

2.9.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (VÉKEY, 2001). Para que o acoplamento seja possível, idealmente, é necessário que as características de cada instrumento não sejam afetadas pela sua conexão, assim como não devem ocorrer modificações químicas não controladas do analito e perda de amostra durante a sua passagem do cromatógrafo para o espectrômetro de massas.

A combinação da cromatografia gasosa com a espectrometria de massas é relativamente simples, uma vez que as características de funcionamento do

cromatógrafo a gás são suficientemente compatíveis com a necessidade de alto vácuo do espectrômetro de massas (ARDREY, 2003).

2.9.2.1 Modos de ionização

Os métodos de ionização mais empregados em CG-MS são ionização por impacto de elétrons (do inglês, *electron ionization*) - EI e a ionização química (do inglês, *chemical ionization*) – CI (VÉKEY, 2001; KITSON, 1996).

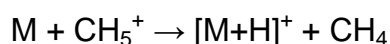
Na EI o analito de interesse, em fase gasosa, é bombardeado com elétrons de alta energia (geralmente 70 eV). As moléculas do analito absorvem esta energia desencadeando vários processos, dentre os quais o mais simples é aquele em que o analito é ionizado pela remoção de um único elétron (M^+). Este processo requer tipicamente 10 eV e o restante da energia gera fragmentação dos analitos (VÉKEY, 2001; KITSON, 1996). Isto consiste em um dos maiores problemas encontrados na aplicação de EI, pois a fragmentação rápida pode conduzir a não observação do íon molecular no espectro, perdendo-se, portanto, uma das mais importantes informações analíticas oferecidas pela MS (ARDREY, 2003).

A CI é a técnica que foi desenvolvida especialmente para aumentar a produção do íon molecular e reduzir as fragmentações associadas à ionização por elétrons. Nesta técnica, as moléculas do analito, em fase gasosa, são introduzidas na câmara de ionização do espectrômetro de massas, que contém um gás reagente como, por exemplo, metano ou amônia. Esta mistura (moléculas do analito e gás reagente) é bombardeada com elétrons, assim como na EI. Como o gás reagente está em excesso em relação ao analito (geralmente em proporção maior que 1000:1), ele é ionizado quase que exclusivamente e passam a ocorrer reações entre os íons em fase gasosa do gás reagente e as moléculas neutras do analito, dando origem aos íons pseudo moleculares do analito $[M+H]^+$. Por este processo ser relativamente de baixa energia, quase não é observada fragmentação (VÉKEY, 2001; ARDREY, 2003).

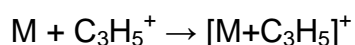
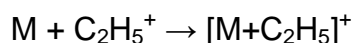
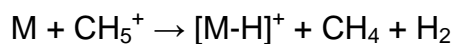
A CI é tão sensível quanto a EI e em alguns casos pode fornecer uma sensibilidade de 10 a 100 vezes maior que a EI. Além disso, é possível controlar o tipo e a quantidade da informação gerada no espectro de massas obtido por CI, pela

modificação tanto da energia como a natureza do íon-molécula e reação empregada para ionizar a amostra. Informação estrutural diferenciada pode ser obtida pela utilização de diferentes gases e pela variação do processo de CI, dessa forma a CI pode ser operada no modo de ionização positivo (PCI) e negativo (NCI) (HUNT; McEWEN; HARVEY, 1975).

Na PCI o metano é frequentemente utilizado como gás reagente, pois quase todos os compostos orgânicos são ionizados por esse gás. Sob pressões de aproximadamente 1 Torr, mais de 90% da população de íons consiste de CH_5^+ , C_2H_5^+ e C_3H_5^+ com razões massa/carga iguais a 17, 29 e 41, respectivamente. CH_5^+ reage exotermicamente com quase todas as moléculas orgânicas comportando-se como um ácido de Brønsted para produzir um íon molecular protonado pela seguinte reação:



Outras reações observadas são:

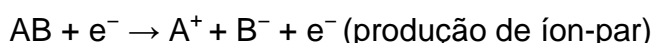
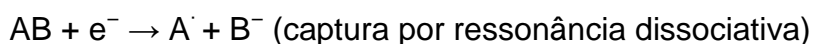


As duas últimas equações são reações de associação bimolecular, as quais são classificadas como processos de solvatação molecular em fase gasosa.

Outros gases utilizados para PCI são o isobutano e a amônia, que são chamados de reagentes mais “brandos”, pois não ionizam todas as moléculas orgânicas e induzem menos fragmentação.

Quando a CI ocorre pela transferência de próton de um “íon-ácido” para o analito, a exotermicidade da reação determina a energia interna do íon molecular protonado e conseqüentemente determina a extensão da fragmentação. A exotermicidade da reação de transferência de próton é diretamente relacionada a afinidade do próton. Por exemplo, espera-se que um íon molecular protonado formado pela ionização com isobutano possua menor energia interna que um íon formado por ionização com metano.

Na NCI um gás auxiliar (frequentemente CH₄) é usado para desacelerar os elétrons do feixe de alta energia, para que os esses tenham energia adequada para serem capturados pelas moléculas do analito. Os elétrons de baixa energia produzidos podem interagir com uma molécula da amostra (AB) por 3 diferentes mecanismos, como representado nas reações a seguir:



Elétrons de baixa energia podem sofrer captura por ressonância, caso a molécula AB possua afinidade positiva por elétrons. Dessa forma, o espectro de íons negativos pode exibir maior sensibilidade quando comparado a espectros obtidos por outras técnicas de ionização. Porém, elevada sensibilidade somente pode ser alcançada sob as condições favoráveis, tendo em vista a estrutura química do analito.

NCI por captura de elétrons (ECNCI) gera íons moleculares radicalares negativamente carregados com pequena energia interna, mas com a inerente instabilidade de um elétron adicional. Portanto a abundância do íon molecular depende da capacidade que a molécula possui de estabilizar o elétron adicional por ressonância. Frequentemente, um ânion abundante e estável constitui o espectro de massas completo. Em contraste com a ECNCI, CI negativa pode ser realizada com a utilização de gases reagentes especiais. Bases de Brønsted podem desempenham um papel análogo ao desempenhado por ácidos de Brønsted na produção de íons positivos.

Por exemplo, CH₃O⁻ pode agir como uma base de Brønsted, gerando [M-H]⁻ pela retirada de um próton da molécula da amostra. Essa técnica produz íons moleculares com pequena energia interna com baixa tendência a fragmentação. Portanto, o íon pseudo-molecular [M-H]⁻ muitas vezes se constitui no pico base do espectro.

Tendo em vista o fato que os gases reagentes são mais difíceis de manipular que os gases da PCI e ECNCI, esse método não é tão popular ainda, mas possui méritos óbvios e muitas aplicações (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

2.9.2.2 Espectrômetros de massa do tipo triplo quadrupolo

É constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons de mesma razão massa/carga (m/z), mas como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo, geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (do inglês, *collision-induced dissociation* – CID). Também é empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo.

Na CID, o íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo é acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo. Nesta cela, sofre repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia (geralmente Ar, He ou N_2), o que leva a um aumento na energia potencial do íon até ocasionar sua fragmentação, conduzindo à formação dos íons produto. Quando a CID é realizada em baixa energia, as reações de fragmentação levam geralmente à perda de fragmentos neutros (H_2O , MeOH, CO, CO_2 , entre outros), dependendo da natureza do íon precursor. Esta perda de fragmentos neutros é muito importante na determinação estrutural da molécula do analito, uma vez que fornece informações acerca de grupos funcionais presentes na molécula. Quando a CID é realizada sob elevada energia, as reações de fragmentação geram informações estruturais mais significativas, uma vez que pode levar à quebra das moléculas em posições características. Porém, quando a energia é muito elevada pode levar a uma fragmentação descontrolada (GATES, 2005).

Todos os quadrupolos são controlados para transmitir íons de uma única razão m/z ou de um intervalo de razões m/z para gerar informação analítica mais exata (ARDREY, 2003; HAGER, 2003).

2.9.2.3 Modos de aquisição do espectro de massas

Os espectrômetros de massas podem ser operados de diferentes maneiras no intuito de se obter espectros de massa dos analitos. Os modos de aquisição de dados mais comuns são o modo *full-scan* e o modo SIM.

No modo *full-scan* os dados são adquiridos pelo contínuo e repetitivo monitoramento dos analitos eluídos da coluna durante todo tempo de análise, iniciando logo após a eluição do solvente.

Com o modo SIM um número limitado de íons (com razão m/z específica) são monitorados durante um intervalo de tempo selecionado. O modo SIM frequentemente fornece uma maior sensibilidade do que o modo *full-scan* (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

Quando se utiliza a espectrometria de massas *tandem* (MS/MS) existem outras possibilidades nos modos de aquisição de dados. Na MS/MS modos de monitoramento frequentemente utilizados são o monitoramento seletivo de reações (SRM) e monitoramento de múltiplas reações (MRM).

No modo SEM um íon específico (íon precursor) é selecionado no primeiro quadrupolo, entre os vários íons gerados na fonte de ionização. Este íon é fragmentado na célula de colisão e um íon específico é detectado no terceiro quadrupolo. Quando se monitora a fragmentação de vários íons precursores simultaneamente, este modo de varredura é denominado MRM (CHIARADIA et al., 2008).

2.9.2.4 A utilização da GC-MS na análise de resíduos de pesticidas

A cromatografia gasosa utilizando colunas capilares é a técnica analítica com maior poder de separação, já a espectrometria de massas é o mais sensível método de análise molecular, com o potencial de fornecer informações sobre o peso molecular e a estrutura do analito. Quando essas duas ferramentas estão combinadas em um sistema GC-MS a capacidade desse sistema de fornecer informação analítica aumenta exponencialmente (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005). O benefício do uso cromatografia capilar na análise de pesticidas, é obtido em função redução da largura dos picos, que se traduz em um ganho em sensibilidade.

Atualmente a GC-MS é a técnica mais utilizada para determinação multirresidual de pesticidas em alimentos por permitir que a identificação e quantificação de um grande número de pesticidas seja feita simultaneamente (VAN DER HOFF & VAN ZONNEN, 1999). A facilidade de acoplamento GC-MS, além da

disponibilidade de um banco de espectros de massas padrão, obtidos no modo de ionização por impacto de elétrons ajudaram na disseminação da técnica GC-MS. (LEANDRO; FUSSELL; KEELY, 2005; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Os baixos limites de detecção obtidos são consequência da alta seletividade promovida pelo uso de diferentes modos de monitoramento de íons como, por exemplo, o modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), que fornece grande sensibilidade e seletividade nas análises (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005; WALORCZYK, 2007).

2.10 Monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos

Atualmente, é frequente a identificação de resíduos de pesticidas nos alimentos e, em muitos casos, se detectam concentrações acima dos LMR permitidos, além dos não autorizados. De acordo com a ANVISA, esta realidade se repete também no Brasil. Diversos países como Estados Unidos, Holanda, Suécia e Inglaterra já estabeleceram programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos com análises contínuas (VARELI, 2008).

O monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos é realizado com o auxílio de métodos analíticos, os quais identificam e quantificam os resíduos de pesticidas em um alimento. A tolerância com relação à presença de resíduos de pesticidas em um determinado alimento é dada pelos LMRs, que incluem metabólitos e produtos de degradação.

Métodos confiáveis de análise de resíduos são indispensáveis para quantificar os resíduos de agrotóxicos em uma *commodity* e para impor limites legais para a presença desses contaminantes nos alimentos (EPA, 2011).

No Brasil o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos foi iniciado em 2001 pela ANVISA com o objetivo de avaliar continuamente as concentrações de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor.

O PARA é coordenado pela ANVISA em conjunto com as Coordenações de Vigilância Sanitária dos envolvidos no programa, os quais vêm realizando os procedimentos de coleta dos alimentos nos supermercados para posterior envio aos

laboratórios. No final de 2008, foram tomadas ações para ampliação do PARA, sendo que, atualmente, fazem parte dele os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rondônia, Roraima, Santa Catarina, Sergipe e Tocantins.

Em 2008 foram monitoradas, pelo programa, 17 culturas (abacaxi, alface, arroz, banana, batata, cebola, cenoura, feijão, laranja, maçã, mamão, manga, morango, pimentão, repolho, tomate e uva), a partir dos dados obtidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), com base na cesta básica utilizada para cálculo da Ingestão Diária Aceitável (IDA), nos sistemas de cultivo e de manejo de pragas das diferentes culturas, além da disponibilidade destes alimentos no comércio dos diferentes estados (ANVISA, 2010).

2.11 Validação de métodos analíticos

Dentro de um laboratório a validação de um método deve ser feita para evidenciar que o método é adequado ao fim proposto. Validação de métodos é um requisito dos organismos de acreditação e deve ser assistido pela verificação de desempenho do método durante análises de rotina (controle de qualidade analítico e constante validação de método). Todos os procedimentos que fazem parte de um método devem ser validados.

Tanto para métodos multirresiduais como para métodos seletivos, matrizes representativas podem ser usadas. No mínimo uma *commodity* representativa de cada grupo deve ser validada dependendo do escopo pretendido pelo método (SANCO, 2009).

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez (RIBANI et al., 2004). São necessárias no mínimo 5 replicatas (para verificar a precisão) em ambos limites de reportagem (para verificar a sensibilidade) e pelo menos um concentração mais alta como, por exemplo, o LMR (SANCO, 2009).

2.11.1 Linearidade e curva analítica

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie, gerando uma curva analítica. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta, $y = ax + b$, que relaciona as variáveis x e y e gera os coeficientes de regressão **a** (inclinação da curva) e **b** (interceção da curva com o eixo y , quando $x = 0$).

Além dos coeficientes de regressão “a” e “b”, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (r), que é dado pela raiz quadrada do coeficiente de determinação (r^2). O coeficiente de correlação permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1 menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa podem ser efetuados os testes de ajuste do modelo linear, validade da regressão, sua eficiência e sua eficiência máxima. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual ou superior a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90. Em qualquer técnica instrumental, a relação linear simples, descrita pela equação $y = ax + b$, só é válida em um determinado intervalo de massa ou concentração da espécie medida. Este intervalo de massas ou concentrações, no qual se pode construir uma curva analítica linear, é a faixa linear dinâmica (RIBANI et al., 2004).

Embora somente dois pontos definam uma reta, na prática as linhas devem ser definidas por, no mínimo, cinco pontos que não incluam o ponto zero da curva, devido aos possíveis erros associados.

2.11.2 Exatidão

É a concordância entre o resultado obtido pela análise de uma amostra e um resultado verdadeiro ou aceito como valor de referência. Quando aplicado a uma tomada de testes, envolve uma combinação de erros randômicos (estimados como precisão) e erros sistemáticos (veracidade ou *bias*) (SANCO, 2009). Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência certificados, comparação de métodos, ensaios de recuperação, adição padrão (RIBANI et al., 2004).

A recuperação é a porção do analito remanescente na determinação final de uma amostra, após a sua adição, comumente a uma amostra “branco” antes do procedimento de extração. Usualmente é expresso em percentagem (SANCO, 2009).

$$\text{Exatidão (\% de erro)} = \frac{\text{valor obtido} - \text{valor real}}{\text{valor real}} \times 100$$

2.11.3 Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão pode ser avaliada a partir da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV).

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

Onde:

s = estimativa de 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.

Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos valores de RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra. A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária, reprodutibilidade (RIBANI et al., 2004).

- **Repetitividade (RSD_r):** Precisão (desvio padrão) da medida de um analito (normalmente obtida da recuperação ou análise de materiais de referência certificados), usando o mesmo método nas mesmas amostras e no mesmo laboratório em um curto período de tempo, durante o qual não ocorrem diferenças nos materiais, equipamentos utilizados e/ou analistas envolvidos. A medida da precisão usualmente é expressa em termos da imprecisão e computada como desvio padrão do resultado do teste (SANCO, 2009).

- **Precisão intermediária (RSD_{pi}):** Indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias, diferentes analistas, diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que, no mesmo laboratório, o método fornecerá os mesmos resultados. A precisão intermediária pode ser expressa como estimativa do desvio padrão relativo (RIBANI et al., 2004).

- **Reprodutibilidade (RSD_R):** Precisão (desvio padrão) da medida de um analito, normalmente obtida pela recuperação ou análise de um material de referência certificado, usando o mesmo método em mais de um laboratório, por diferentes analistas, ou durante um período no qual diferenças nos materiais e equipamentos possam ocorrer. A medida da precisão normalmente é expressa em termos de imprecisão e computada como desvio padrão do resultado do teste. (SANCO, 2009).

2.11.4 Limite de detecção

O limite de detecção (LOD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O LOD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica. O procedimento adotado neste estudo para o cálculo do LOD está descrito no item 3.13.3 (RIBANI et al., 2004).

2.11.5 Limite de quantificação

É a mínima concentração ou massa de um analito que pode ser quantificada com aceitável exatidão e precisão e deve ser um valor maior que o LOD. O limite de quantificação (LOQ) do método é definido como a mais baixa concentração de fortificação validada que teve critérios de desempenho aceitáveis (recuperações médias entre 70-120% e $RSD \leq 20\%$). Outras abordagens para demonstrar que o método analítico está de acordo com os critérios de desempenho podem ser usadas, provando que eles alcançam o mesmo nível e qualidade de informação. Se a definição de resíduo incorpora dois ou mais analitos, o método, se possível, deve ser validado para todos os analitos incluídos na definição de resíduos (SANCO, 2009). O procedimento adotado neste estudo para o cálculo do LOQ está descrito no item 3.13.3.

2.11.6 Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro

ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI et al., 2004).

2.11.7 Especificidade

É a habilidade do detector (suportado pela seletividade da extração, da purificação, derivatização ou separação, se necessário) de fornecer sinais que efetivamente identificam o analito (SANCO, 2009).

Portanto, um método instrumental de separação que produz resposta para uma única substância de interesse, normalmente um dado elemento, pode ser chamado de específico e um método que produz resposta para vários compostos químicos, com uma característica em comum, pode ser chamado de seletivo. Como existem poucos métodos cromatográficos que respondem a apenas uma substância, segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), o termo seletividade é mais apropriado. (RIBANI et al., 2004).

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Este trabalho foi desenvolvido como parte de um projeto de parceria científica entre o Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes (CEPARC), laboratório do Departamento de Química da UFSM e o NVWA, laboratório holandês que disponibilizou suas instalações para a realização do projeto.

No desenvolvimento deste trabalho foram avaliadas modificações no método QuEChERS, onde se estudou a utilização de diferentes adsorventes e quantidades desses para a purificação do extrato de café. A seguir, as amostras foram submetidas à análise por GC-MS.

3.1 Instrumentação

Os seguintes equipamentos foram empregados no estudo:

- Sistema de purificação de água Milli-Q[®] - resistividade 18,2 MΩcm (Millipore[®], EUA);
- Moinho de café, 160 UPZ (Alpine, Alemanha);
- Balança analítica com precisão de 3 casas decimais (Mettler, Suíça);
- Homogeneizador Ultra-Turrax PT 6000 (Polytron, Suíça);
- Centrífuga Sanyo Harrier 18/80, refrigerada (MSE, Inglaterra);
- Mesa agitadora Janke Kunkel HS 501 digital (IKA-Labortechnik, Alemanha);
- Pipetador automático (Brand, Alemanha);
- Sistema GC-MS: Cromatógrafo a gás CP 3800 (Varian, EUA), equipado com:
 - Amostrador automático CP 8400 (Varian, EUA);
 - Seringa de vidro de 10 µL (Hamilton);
 - Injetor 1079, com insersor de vidro silanizado d.i. de 3,4 mm e comprimento de 54 mm, contendo cerca de 0,5 cm de carbofrita;

- Coluna capilar FactorFour VF-5ms (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, Holanda);
- Detector 300 MS Triplo Quadrupolo, atuando no modo de ionização química negativa e monitoramento seletivo de íons (Varian, EUA);
- Sistema de aquisição de dados com o *software MS Workstation 6.9.2* (Varian, EUA).

3.2 Gases

- Hélio 99,999% de pureza (Air Products, Holanda) (gás de arraste do cromatógrafo a gás);
- Ar sintético 99,9% de pureza (Air Products, Holanda) (para resfriamento do injetor);
- Metano 99,9995% de pureza (Hoek Loos, Holanda) (para a ionização química no GC-MS).

3.3 Materiais

- Tubos cônicos de teflon com tampa rosqueável, com capacidade para 15 e 50 mL (VWR, Estados Unidos);
- Frascos de vidro âmbar, com capacidades para 20, 50 e 100 mL, com tampa rosqueável e batoque de teflon e silicone (Bester, Holanda);
- *Vials* de vidro com capacidade para 1,5 mL (Alltech Associates, Holanda);
- Vidrarias comuns de laboratório.

3.4 Reagentes e solventes

Os seguintes reagentes e solventes foram empregados no estudo:

- Acetonitrila, grau LC 99,9% (Merck, Alemanha) e acetonitrila grau ULC/MS 99,97% (Biosolve, Holanda);
- Isooctano (2,2,4-trimetilpentano), grau pesticida 99,5% (Lab-scan Analytical Science, Irlanda);
- Tolueno, grau pesticida 99,5% (Mallinckrodt, EUA)
- Acido acético glacial p.a. 99,8% (Merck, Alemanha);
- Sulfato de magnésio anidro 98,0% (Merck, Alemanha);
- Acetato de sódio anidro p.a. 99,0% (Merck, Alemanha);
- C18 - Bondesil - 40 μm (Varian, Holanda);
- PSA - Bondesil - 40 μm (Varian, Holanda);
- Padrões sólidos de pesticidas (Dr. Ehrenstorfer, Alemanha; Riedel-de Haën, Suíça; Bayer, Alemanha; Zeneca, Suíça).

3.5 Preparo e otimização do *slurry*

Pelo fato da amostra apresentar-se na forma de grãos, foi necessária uma prévia moagem dos grãos. Foram utilizados pacotes de grãos verdes de café, de 3 e 5 kg, respectivamente, das marcas *Douwe Egberts*[®] e *Starbucks*[®] (figura 2), provenientes de diversos países (Brasil, Vietnã, Quênia, Uganda, Honduras, Laos e México), os quais, supostamente, não estavam contaminados com resíduos de pesticidas (“brancos”).

Inicialmente, o café verde em grãos foi moído, até sua completa trituração. Em seguida para a obtenção de uma amostra completamente homogênea, preparou-se um *slurry* de café e água. Para isso o café moído foi homogeneizado com água em Ultra-Turrax por aproximadamente 10 minutos. Optou-se pela utilização de *slurry* da amostra, em detrimento do café moído em pó, porque a água tem a função de aumentar a disponibilidade dos pesticidas da matriz no momento da extração, além disso, o *slurry* facilita a obtenção de amostras mais homogêneas.

Para a otimização do *slurry*, preparou-se amostras nas proporções 1:3; 1:3,5 e 1:4 (café/água) para verificar a proporção mais adequada. Para a obtenção das três proporções de *slurry* pesou-se, com o auxílio de uma balança analítica, em 3 diferentes béqueres de plástico, 100 g de café moído. A cada um dos béqueres foi adicionado, em separado, respectivamente, 200, 250 e 300 g de água de torneira, e os mesmos foram levados para homogeneização em Ultra-Turrax, por aproximadamente 10 minutos. Por último, fez-se a verificação visual da proporção de *slurry* mais adequada, tendo em vista o fato de que amostras muito densas oferecem dificuldade de manipulação, como por exemplo, na pesagem.

A utilização de água de torneira no preparo de *slurry* de amostras é uma prática já estabelecida no NVWA. Frequentemente, as quantidades de amostras utilizadas são muito grandes (> 10 kg) e inviabilizam a utilização de água ultra pura nesse procedimento, pois o volume de água requerido seria muito grande. Portanto, neste trabalho seguiu-se a metodologia já estabelecida no NVWA.



Figura 2 – Amostras utilizadas de café. À esquerda, o café da marca *Douwe Egberts*[®], e à direita, o café da marca *Starbucks*[®].

3.6 Pesticidas selecionados

Os pesticidas selecionados para o estudo estão listados na tabela 3, respectivamente, com pureza, classe, fornecedor, grupo químico, classificação toxicológica, fórmula molecular e LMR. Foram estudados dos 51 pesticidas, incluindo alguns de seus isômeros e 3 produtos de degradação. As análises foram realizadas por GC-MS (NCI-SIM), em uma única corrida cromatográfica.

O modo CI gera menos fragmentação e maior produção de íon molecular do que o modo EI. Porém, o modo NCI só produz boa resposta para analitos que possuem grupos funcionais eletronegativos em sua estrutura (SHEN et al., 2011). Dessa forma, para este estudo foram selecionados pesticidas pertencentes a classes químicas que possuem grupos funcionais eletronegativos em sua estrutura, e também alguns pesticidas para os quais sabidamente não se obtém boa resposta no modo EI.

Tabela 3 - Pesticidas estudados, com informações de pureza, classe, fornecedor, grupo químico, classificação toxicológica, fórmula molecular e LMR.

Composto	Pureza (%)	Classe	Fornecedor	Grupo químico	C*	Fórmula molecular	LMR (mg kg ⁻¹)		
							Codex Alimentarius	União Européia	ANVISA
Acrinatrina	99,9	A	Dr. Ehrenstorfer	Piretróide	II	C ₂₆ H ₂₁ F ₆ NO	-	0,05	-
Aldrim	96,0	I	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado ciclodieno	II	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	-	0,02**	proibido
Aletrina	95,5	I	Dr. Ehrenstorfer	Piretróide	-	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	-	-	proibido
Bifentrina	98,0	A/I	Dr. Ehrenstorfer	Piretróide	II	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂	-	0,05	0,05
Bromofós etílico	99,4	I	Dr. Ehrenstorfer	Organofosforado	II	C ₈ H ₈ BrCl ₂ O ₃ PS	-	0,1	proibido
Captafol	99,1	Fg	Dr. Ehrenstorfer	Ftalimida	IV	C ₁₀ H ₉ Cl ₄ NO ₂ S	-	0,1	proibido
Captana	99,0	Fg	Riedel-de Haën	Carboximida	IV	C ₉ H ₈ Cl ₃ NO ₂ S	-	-	NPC
Cifenotrina	93,5	I	Dr. Ehrenstorfer	Piretróide	III	C ₂₄ H ₂₅ NO ₃	-	-	proibido
Ciflutrina	98,0	I	Riedel-de Haën	Piretróide	II	C ₂₂ H ₁₈ Cl ₂ FNO ₃	-	0,1**	0,01
Cialotrina-lambda	99,0	I	Riedel-de Haën	Piretróide	II	C ₂₃ H ₁₉ ClF ₃ NO ₃	-	0,1**	-
Cipermetrina-alfa	91,5	I/F	Dr. Ehrenstorfer	Piretróide	II	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	0,05**	0,1**	0,05**
Clorotalonil	99,1	Fg	Dr. Ehrenstorfer	Ftalonitrila	III	C ₈ Cl ₄ N ₂	-	0,1	0,2
Cloropirifós etílico	99,0	A/I	Dr. Ehrenstorfer	Organofosforado	II	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	0,05	0,2	0,05
Cloropirifós metílico	97,0	A/I	Dr. Ehrenstorfer	Organofosforado	II	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	0,05	0,1	proibido
DDD-2,4	99,5	I	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado	I	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	-	1**	proibido
DDE-2,4	97,5	I	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado	I	C ₁₄ H ₈ Cl ₁₄	-	1**	proibido
DDE-p,p	99,6	I	Riedel-de Haën	Organoclorado	I	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	-	1**	proibido
DDT-p,p	99,3	I	Riedel-de Haën	Organoclorado	II	C ₁₄ H ₉ Cl ₅ O	-	1**	proibido
Deltametrina	98,5	I/F	Dr. Ehrenstorfer	Piretróide	III	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	-	2	1,0
Diclorana	98,3	Fg	Dr. Ehrenstorfer	Cloroaromático	III	C ₆ H ₄ Cl ₂ N ₂ O ₂	-	0,01	NPC
Dicofol	98,0	A	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado	II	C ₁₄ H ₉ Cl ₅ O	-	0,05**	NPC
Dieldrin	97,0	I	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado ciclodieno	II	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	-	0,02**	proibido
Endossulfam-alfa	99,3	I/F/A	Dr. Ehrenstorfer	Clorociclodieno	I	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	0,2	-	0,05**
Endossulfam-beta	97,5	I/F/A	Dr. Ehrenstorfer	Clorociclodieno	I	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	0,2	-	0,05**
Endossulfam-sulfato	99,4	I/F/A	Dr. Ehrenstorfer	Clorociclodieno	I	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₄ S	0,2	-	0,05**
Endrim	99,0	I	Riedel-de Haën	Organoclorado ciclodieno	I	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	-	0,01	proibido
Fenitroiona	97,0	F/I	Dr. Ehrenstorfer	Organofosforado	II	C ₉ H ₁₂ NO ₃ PS	-	0,02	NPC
Fenotrina	94,0	I	Riedel-de Haën	Piretróide	IV	C ₂₃ H ₂₆ O ₃	-	-	-
Fenpropatrina	99,0	A/I	Dr. Ehrenstorfer	Piretróide	II	C ₂₂ H ₂₃ NO ₃	-	0,02	0,5
Fenvalerato	99,9	I	Riedel-de Haën	Piretróide	II	C ₂₅ H ₂₂ CINO ₃	-	0,05**	proibido
Flucitrinato	99,0	I	Dr. Ehrenstorfer	Piretróide	I	C ₂₆ H ₂₃ F ₂ NO ₄	-	0,1**	-
Fluvalinato	99,0	I	Dr. Ehrenstorfer	Peretróide	I	C ₂₆ H ₂₂ ClF ₃ N ₂ O ₃	-	-	-

Tabela 3 – Continuação.

Folpete	99,0	Fg	Dr.Ehrenstorfer	Dicarboximida	IV	C ₉ H ₄ Cl ₃ NO ₂ S	-	0,05	NPC
HCH-alfa	98,7	I	Riedel-de Haën	Organoclorado	II	C ₆ H ₆ Cl ₆	-	0,02**	proibido
HCH-beta	98,1	I	Riedel-de Haën	Organoclorado	II	C ₆ H ₆ Cl ₆	-	0,02**	proibido
HCH-delta	99,0	A	Dr.Ehrenstorfer	Organoclorado	II	C ₆ H ₆ Cl ₆	-	0,02**	proibido
HCH-gama (Lindano)	99,4	I	Dr.Ehrenstorfer	Organoclorado	II	C ₆ H ₆ Cl ₆	-	0,1	proibido
Heptacloro	98,5	I	Dr.Ehrenstorfer	Organoclorado ciclodieno	II	C ₁₀ H ₅ Cl ₇	-	0,02**	proibido
Heptacloroepóxido	99,7	I	Riedel-de Haën	Organoclorado ciclodieno	II	C ₁₀ H ₅ Cl ₇ O	-	0,02**	proibido
Hexaclorobenzeno	99,5	Fg	Dr.Ehrenstorfer	Hidrocarboneto clorado	IV	C ₆ Cl ₆	-	0,02	proibido
Mirex	98,5	I	Dr.Ehrenstorfer	Sulfluramida	II	C ₁₀ Cl ₁₂	-	-	proibido
Parationa-etílica	99,2	I/A	Dr.Ehrenstorfer	Organofosforado	I	C ₁₀ H ₁₄ NO ₅ PS	-	0,1	proibido
Parationa-metílica	99,6	A/I	Riedel-de Haën	Organofosforado	I	C ₈ H ₁₀ NO ₅ PS	-	0,05**	NPC
Permetrina-cis	99,4	F/I	Zeneca	Piretróide	III	C ₂₁ H ₂₀ ClO ₃	0,05	0,1**	0,01
Permetrina-trans	99,4	F/I	Zeneca	Piretróide	III	C ₂₁ H ₂₀ ClO ₃	0,05	0,1**	0,01
Protiofós	93,5	I	Zeneca	Organofosforado	I	C ₁₁ H ₁₅ Cl ₂ O ₂ PS	-	-	NPC
Quintozeno	99,9	Fg	Dr.Ehrenstorfer	Cloroaromático	III	C ₆ Cl ₅ NO ₂	-	0,05**	NPC
Tris(1,3-dicloroisopropil)fosfato (TDCPP)	99,0	-	Dr.Ehrenstorfer	Organofosforado	-	C ₉ H ₁₅ Cl ₆ O ₄ P	-	-	-
Tequinazeno	99,8	Fg	Riedel-de Haën	Cloronitrofenil	II	C ₆ HCl ₄ NO ₂	-	0,1	-
Teflutrina	98,1	I	Zeneca	Piretróide	I	C ₁₇ H ₁₄ ClF ₇ O ₂	-	0,05	-
Tetradifona	99,9	A	Dr.Ehrenstorfer	Clorodefeniilsulfona	IV	C ₁₂ H ₆ Cl ₄ O ₂ S	-	-	NPC
Tetrametrina	99,2	I	Dr.Ehrenstorfer	Piretróide	III	C ₁₉ H ₂₅ NO ₄	-	-	-
Transflutrina	95,0	I	Bayer	Piretróide	IV	C ₁₅ H ₁₂ Cl ₂ F ₄ O ₂	-	-	-

*classificação toxicológica segundo o Ministério da Saúde; **valor refere-se à soma dos análogos; NPC: não permitido para a cultura; proibido: produto com uso proibido no Brasil; A: acaricida; F: formicida; Fg: fungicida; I: inseticida.

3.7 Seleção dos padrões internos

Para ser utilizado como padrão interno (P.I.), o analito deve ser, preferencialmente, um composto que tenha seu uso proibido pela legislação. Além disso, o composto deve apresentar uma boa resposta, resolução e tempo de retenção no sistema cromatográfico utilizado. Neste trabalho foram utilizados dois padrões internos, o padrão interno para o procedimento (P.I.P.) e o padrão interno para o equipamento (P.I.E.). O pesticida selecionado para ser utilizado como P.I.P. foi o tris(1,3-dicloroisopropil)fosfato (TDCPP) e o pesticida selecionado para utilização com P.I.E. foi o bromofós etílico.

3.8 Preparo das soluções analíticas dos padrões internos

Foram preparadas soluções analíticas de concentração 1000 mg L^{-1} . Para isso, o sólido foi pesado diretamente dentro de frascos de vidro âmbar (tampa com batoque de PTFE), com capacidade para 20 mL, dissolvidos com os respectivos solventes (acetonitrila para o tris(1,3-dicloroisopropil)fosfato e tolueno para o bromofós etílico) e homogeneizados durante 5 minutos em banho de ultra-som. A partir da solução de bromofós etílico de concentração 1000 mg L^{-1} preparou-se uma solução de concentração de $5000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ por diluição com acetonitrila.

O P.I.P. foi adicionado (volume de $200 \text{ } \mu\text{L}$) ao solvente extrator (acetonitrila contendo 1% de ácido acético), fornecendo uma concentração de $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, e o P.I.E. foi adicionado (volume de $10 \text{ } \mu\text{L}$) diretamente aos *vials* antes da injeção das amostras no GC-MS (NCI-SIM), obtendo-se uma concentração final nos *vials* de $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

3.9 Preparo das soluções analíticas (soluções estoque e solução mistura de pesticidas)

Foram preparadas soluções analíticas de concentração de 1000 mg L^{-1} . Os padrões de pesticidas foram pesados individual e diretamente dentro de frascos de vidro âmbar (tampa com batoque de PTFE), com capacidade de 20 mL, dissolvidos com tolueno e homogeneizados por 5 minutos em banho de ultra-som. Estas soluções estoques foram armazenadas em *freezer*, a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Em seguida, preparou-se 200 mL de uma solução mistura de concentração $1000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, contendo os 51 pesticidas a serem determinados por GC-MS. Para isto, transferiu-se 200 μL de cada solução estoque para um balão volumétrico de 200 mL, já contendo um pequeno volume de isooctano/tolueno (90:10), sendo o volume, posteriormente, completado com o mesmo solvente. A mistura de soluções intermediárias com concentração de $1000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ foi armazenada em frascos de vidro âmbar (tampa com batoque de PTFE).

A solução mistura foi utilizada para os ensaios de recuperação, nas análises de amostras de café fortificado, e também para preparar as soluções analíticas em solvente orgânico (acetonitrila) e em matriz (extrato “branco” de café), nas concentrações 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 20 e $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, para o estudo de linearidade e confecção da curva analítica de cada pesticida.

As soluções analíticas foram armazenadas em *freezer* a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes do uso, foram retiradas do *freezer* e deixadas à temperatura ambiente por aproximadamente uma hora.

3.10 Preparo do solvente extrator

Para o preparo do solvente acetonitrila contendo 1% de ácido acético e $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de P.I.P., transferiu-se cerca de 500 mL de acetonitrila para um balão volumétrico com capacidade para 1 litro. Com o auxílio de um pipetador automático, foram adicionados 10 mL de ácido acético concentrado e 200 μL de solução de

TDCPP. Completou-se o volume do balão com acetonitrila que foi tampado e homogeneizado por inversão.

Essa solução de acetonitrila contendo 1% de ácido acético e $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de TDCPP foi utilizada para o procedimento de extração QuEChERS modificado, conforme descrito a seguir.

3.11 Método de extração (QuEChERS modificado)

Conforme descrito em 2.8.1, o método QuEChERS originalmente desenvolvido por Anastassiades et al. em 2003, envolve uma etapa única de extração com acetonitrila não acidificada, seguido de um particionamento líquido-líquido com MgSO_4 e NaCl . A remoção de água e a purificação são feitas em uma etapa de dSPE usando MgSO_4 e PSA (ANASTASSIADES et al., 2003). No procedimento utilizado neste trabalho utiliza-se acetonitrila acidificada (1% ácido acético), seguido de uma etapa de tamponamento com acetato de sódio. A remoção de água e purificação também são feitas em uma etapa, porém avaliou-se a utilização de adsorventes em diferentes quantidades para a purificação do extrato de café, conforme descrito a seguir.

Em tubos de centrífuga de 45 mL pesou-se $10,0 \pm 0,05$ g de *slurry* (1:4), correspondendo a 2,5 g de café. Às amostras, foram adicionados 10 mL de acetonitrila contendo 1% ácido acético e TDCPP ($200 \mu\text{g L}^{-1}$) e agitou-se em mesa agitadora durante 1 min. Acrescentou-se 3 g de sulfato de magnésio anidro e agitou-se em mesa agitadora por mais 1 min. Em seguida, acrescentou-se 1,7 g de acetato de sódio e agitou-se em mesa agitadora por 1 min. Após a agitação, os tubos foram centrifugados a 4000 rpm durante 4 min. Transferiu-se 4 mL de sobrenadante para tubos de centrífuga de 15 mL, já contendo 600 mg de sulfato de magnésio anidro e adsorvente(s) conforme descrito em 3.12 e na figura 3, agitando-se em mesa agitadora por 1 min.

Após a agitação, os tubos foram novamente levados à centrífuga por 4 min e centrifugados a 4000 rpm. Finalmente, foram pipetados 990 μL do sobrenadante para *vials* com capacidade para 1,5 mL e a esses adicionou-se 10 μL da solução padrão de P.I.E., fornecendo uma concentração final de $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Os *vials* foram

tampados e levados ao GC-MS para análise (DE KROOM et al., 2007). O esquema do procedimento de extração pode ser visualizado na figura 3.

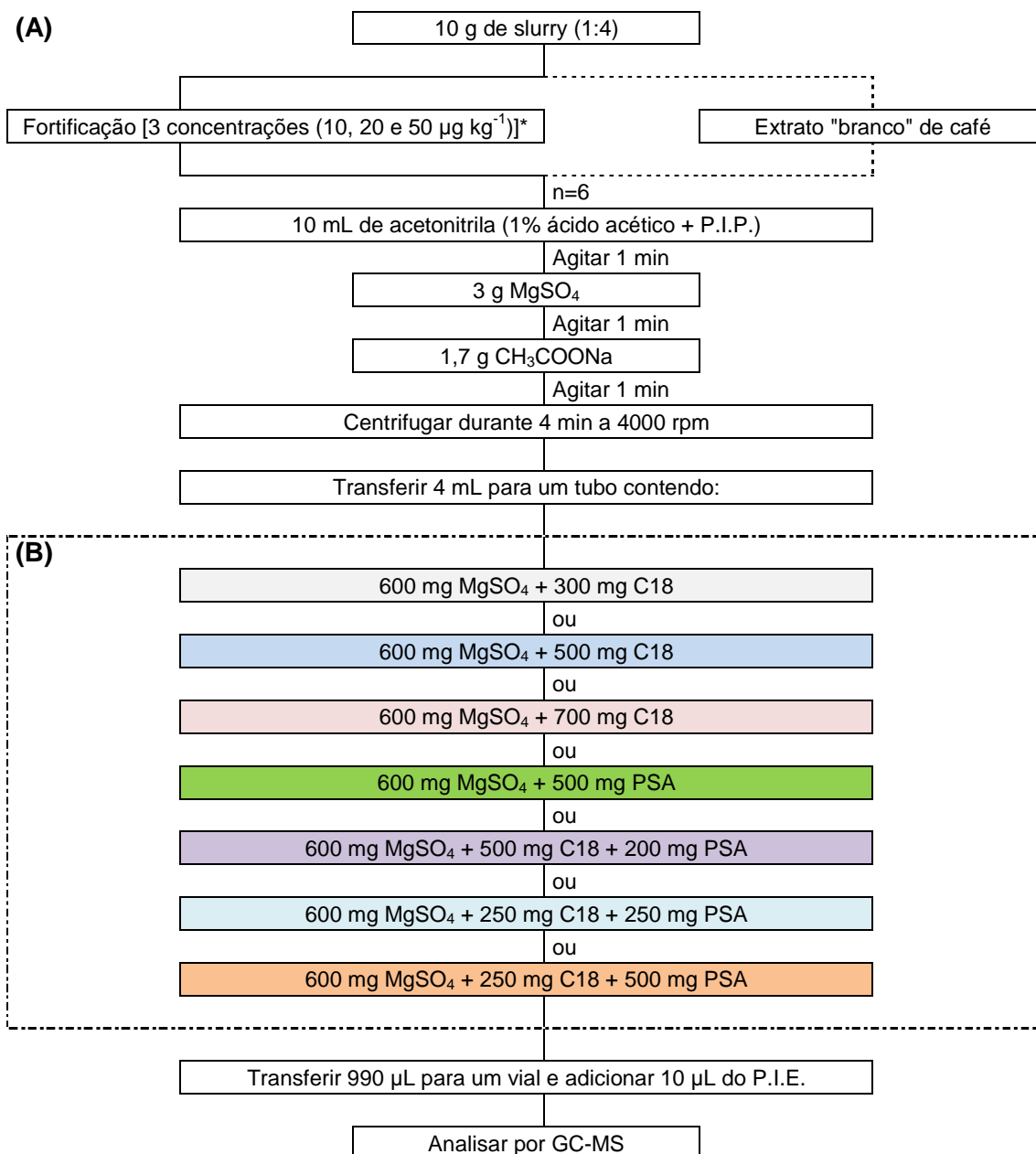
3.12 Otimização do procedimento de purificação do extrato de café

Considerando o fato de que os grãos de café contêm muitos compostos que interferem na análise cromatográfica como, por exemplo, a cafeína e que podem danificar o GC-MS, bem como interferir no resultado da análise, uma etapa de purificação do extrato de café foi indispensável. Assim, os adsorventes testados para o procedimento de *clean-up* foram o octadecilsilano ligado à sílica (C18) e a amina primária secundária (PSA). O primeiro é conhecido por sua eficiência na remoção de compostos apolares da matriz, como ácidos graxos de cadeia longa e esteróis (GILLESPIE & WALTERS, 1990) e o segundo é mais utilizado para remoção de ácidos graxos livres e outros compostos mais polares como açúcares, ácidos orgânicos e pigmentos (SHIMELIS et al., 2007).

Para a otimização do procedimento de *clean-up* do extrato de café, utilizou-se os seguintes adsorventes e misturas de adsorventes: 300 mg de C18, 500 mg de C18, 700 mg de C18, 500 mg de C18 + 200 mg de PSA, 250 mg de C18 + 250 mg de PSA, 250 mg de C18 + 500 mg de PSA, 500 mg de PSA, conforme esquematizado na figura 3, juntamente com 600 mg de MgSO₄.

Após a extração, as amostras fortificadas na concentração de 40 µg kg⁻¹ foram levadas para análise por GC-MS/MS no modo de ionização por impacto de elétrons (EI⁺). Dessa maneira, pode-se avaliar qual o adsorvente foi o mais adequado para purificação do extrato de café.

A análise dessas amostras foi feita por GC-MS/MS (EI⁺) em virtude da indisponibilidade, naquele momento, do equipamento de GC-MS que operava no modo NCI-SIM. Seguramente esse fato não comprometeu a otimização do procedimento de *clean-up*, pois o modo EI⁺ normalmente oferece uma menor sensibilidade e seletividade do que o modo NCI-SIM. Portanto, certamente o adsorvente que fornecesse os melhores resultados nas análises feitas por GC-MS/MS (EI⁺) ofereceria os mesmos resultados, ou resultados ainda melhores, nas análises realizadas por GC-MS (NCI-SIM).



P.I.P. = TDCPP;

P.I.E. = Bromofós etílico;

*somente para a validação do método QuEChERS modificado;

Figura 3 - Esquema do procedimento de extração, QuEChERS modificado (A), mostrando os adsorventes e misturas de adsorventes testados para purificação do extrato de café (B).

3.13 Validação do método QuEChERS modificado

3.13.1 Preparo das soluções analíticas para avaliação da linearidade das curvas analíticas

As soluções analíticas de concentrações 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 20 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizadas para o estudo de linearidade, foram preparadas em solvente orgânico e em matriz. Essas soluções foram obtidas pela diluição da solução mistura de pesticidas, de concentração 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, com acetonitrila e com extrato “branco” de café, respectivamente, conforme a tabela 1 do apêndice 1. O extrato “branco” de café foi obtido conforme o procedimento descrito em 3.11 utilizando 500 mg de C18 para a purificação do extrato.

3.13.2 Determinação da linearidade das curvas analíticas

Avaliou-se a linearidade das curvas analíticas a partir das soluções preparadas em solvente orgânico e em matriz, nas concentrações 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 20 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. A sequência das injeções no GC-MS (NCI-SIM) está descrita na figura 4.

1	BS	17	BS	33	BS	49	BS	65	BS	81	BS
2	BM	18	BM	34	BM	50	BM	66	BM	82	BM
3	PS-0,2	19	PS-0,2	34	PS-0,2	51	PS-0,2	67	PS-0,2	83	PS-0,2
4	PM-0,2	20	PM-0,2	36	PM-0,2	52	PM-0,2	68	PM-0,2	84	PM-0,2
5	PS-0,5	21	PS-0,5	37	PS-0,5	53	PS-0,5	69	PS-0,5	85	PS-0,5
6	PM-0,5	22	PM-0,5	38	PM-0,5	54	PM-0,5	70	PM-0,5	86	PM-0,5
7	PS-1	23	PS-1	39	PS-1	55	PS-1	71	PS-1	87	PS-1
8	PM-1	24	PM-1	40	PM-1	56	PM-1	72	PM-1	88	PM-1
9	PS-2	25	PS-2	41	PS-2	57	PS-2	73	PS-2	89	PS-2
10	PM-2	26	PM-2	42	PM-2	58	PM-2	74	PM-2	90	PM-2
11	PS-5	27	PS-5	43	PS-5	59	PS-5	75	PS-5	91	PS-5
12	PM-5	28	PM-5	44	PM-5	60	PM-5	76	PM-5	92	PM-5
13	PS-20	29	PS-20	45	PS-20	61	PS-20	77	PS-20	93	PS-20
14	PM-20	30	PM-20	46	PM-20	62	PM-20	78	PM-20	94	PM-20
15	PS-100	31	PS-100	47	PS-100	63	PS-100	79	PS-100	95	PS-100
16	PM-100	32	PM-100	48	PM-100	64	PM-100	80	PM-00	96	PM-100

Figura 4 - Sequência de injeções para avaliação da linearidade, onde: BS: “branco” do solvente (acetonitrila), BM: “branco” da matriz (café), PS: padrão em solvente (acetonitrila) – concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$ e PM: padrão em matriz (extrato “branco” de café) – concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.13.3 Determinação da estimativa do LOD e LOQ do instrumento e do método

A partir dos dados de linearidade da curva analítica, de cada um dos 51 pesticidas, procedeu-se à determinação da estimativa do limite de detecção do instrumento (LOD_i) e do método (LOD_m), bem como do limite de quantificação do instrumento (LOQ_i) e do método (LOQ_m).

A partir das áreas e do RSD (%), ($n=6$), de cada composto, presente nas sete soluções analíticas estudadas, aplicando-se a equação 1, obteve-se a estimativa do LOD_i , em $\mu\text{g L}^{-1}$.

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

Onde:

RSD: Desvio padrão relativo das áreas obtidas;

C: Concentração da solução analítica.

Multiplicando-se o valor estimado do LOD_i pelo fator de diluição obtido para o método de extração (fator 4), obteve-se a estimativa do LOD_m , em $\mu\text{g kg}^{-1}$.

A partir do LOD_i aplicando-se a equação 2, obteve-se o LOQ_i .

$$LOQ_i (\mu\text{g L}^{-1}) = 10 \times RSD \times C \quad \text{Equação 2}$$

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

O LOQ_m estimado foi obtido multiplicando-se o LOQ_i pelo fator de diluição do método de extração (fator 4). Porém, 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%.

3.13.4 Avaliação do efeito matriz do café

O efeito matriz é resultante da influência de componentes coextraídos da matriz, que podem aumentar (efeito matriz positivo) ou diminuir (efeito matriz negativo) o sinal dos analitos, quando comparado a resposta dos analitos em solvente orgânico (FRENICH et al., 2009). Na GC, o efeito matriz positivo ocorre quando compostos da matriz coextraídos, competem com os pesticidas pelo acesso a sítios ativos do sistema (injetor e coluna) e os protegem da degradação e adsorção nos sítios ativos, dessa forma a quantidade de analito que entra na coluna é maior em amostras contendo matriz (ZROSTLÍKOVÁ et al., 2001). Já o efeito matriz negativo ocorre quando compostos não voláteis coextraídos da matriz se acumulam no sistema e geram novos sítios ativos (FRENICH et al., 2009).

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

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \cdot 100 \quad \text{Equação 3}$$

onde:

X_1 = Média das áreas de cada pesticida da solução analítica, preparada em matriz, numa dada concentração;

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

Assim, verifica-se se a matriz exerce efeito positivo ou negativo sobre o resultado da análise (PIZZUTTI et al., 2009). Em análises quantitativas a presença de efeito matriz pode levar a quantificações errôneas do analito, se as soluções analíticas de calibração forem preparadas somente em solvente orgânico. Há diversas maneiras de se eliminar/compensar efeito matriz, uma delas é pela utilização das soluções analíticas de calibração preparadas no extrato da matriz (*matrix-matched standards*), com a mesma composição das amostras analisadas (ZROSTLÍKOVÁ et al., 2001).

3.13.5 Análise do solvente extrator (acetonitrila)

A análise do solvente tem por objetivo avaliar se o mesmo está livre da contaminação por substâncias que possam interferir na análise como, por exemplo, os próprios pesticidas em estudo.

Para análise do solvente transferiu-se para um *vial*, 990 mL da acetonitrila, utilizada como solvente de extração e adicionou-se 10 μL da solução do P.I.E., obtendo-se uma concentração de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Esse *vial* foi levado para análise por GC-MS (NCI-SIM).

3.13.6 Ensaios de fortificação e extração para a avaliação da recuperação

Os ensaios de fortificação e recuperação tem por objetivo a avaliação da exatidão do método. A avaliação da exatidão consiste no cálculo da concentração real medida, no final do procedimento, em comparação com a concentração

conhecida inicialmente, adicionada à matriz. Com o cálculo dos valores de RSD (%) pode-se obter informações acerca da repetitividade (precisão) dos dados obtidos.

O procedimento foi realizado 6 vezes (n=6), para cada concentração de fortificação (3 concentrações), e também para o café “branco” (sem adição dos pesticidas), para a verificação da ausência desses compostos na matriz. O extrato da matriz é chamado de “branco” da matriz e também foi utilizado para o preparo das soluções analíticas.

3.13.7 Procedimento de fortificação antes da etapa de extração

Em tubos de centrífuga de tampa rosqueável, com capacidade de 45 mL, pesou-se $10,0 \pm 0,05$ g de *slurry* (1:4), correspondendo a 2,5 g de café. Efetuou-se a fortificação, em 3 concentrações, com auxílio de um pipetador automático. Para fortificar nas concentrações de 10, 20 e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, adicionou-se, respectivamente, 25, 50 e $125 \mu\text{L}$ da solução mistura de concentração $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, contendo os 51 pesticidas. Após a fortificação das amostras, prosseguiu-se com a extração conforme descrito em 3.11, utilizando na etapa de *clean-up*, 500 mg de C18. As análises foram realizadas por GC-MS (NCI-SIM).

3.14 Análises cromatográficas

Os extratos obtidos de acordo com o procedimento descrito anteriormente foram analisados em um GC-MS que operava no modo de ionização química negativa (NCI) e no modo de monitoramento seletivo de íons (SIM). As condições cromatográficas utilizadas foram desenvolvidas por de Kok, Van Bodegraven e Hiemstra, no NVWA, laboratório holandês, e estão descritas no procedimento operacional padrão CHE01-WV624 (NVWA, 2005).

3.14.1 Condições de análise por GC-MS (NCI-SIM)

As condições instrumentais empregadas para as análises realizadas foram, para o cromatógrafo a gás:

- Programação de temperatura do injetor PTV (do inglês, *Programmed Temperature Vaporizing*): temperatura inicial do injetor 80 °C (0,1 min) com aumento de temperatura de 200 °C min⁻¹ até 300 °C (32 min).
- Programação da válvula do *split* do injetor: inicialmente aberta (razão 1:10), sendo fechada após 0,1 min e aberta novamente após 1,75 min (razão 1:80);
- O volume de injeção foi de 5 µL;
- A injeção efetuada com o auxílio de amostrador automático consistiu na aspiração de 1,0 µL de ar, 3,0 µL de extrato ou de solução analítica e de 1,0 µL de ar, com velocidade de injeção de 50 µL s⁻¹.
- Programação de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 80 °C, com (1,0 min), com incremento de temperatura de 25 °C min⁻¹ até 180°C; posteriormente 5 °C min⁻¹ até 280°C, e de 10 °C min⁻¹ até 300 °C;
- Vazão do gás de arraste (hélio) constante em 1,0 mL min⁻¹;
- Tempo total de corrida de 35 min.

Para o espectrômetro de massas:

- Temperatura do *transferline*: 275 °C;
- Temperatura da fonte de ionização: 200°C;
- Modo de aquisição SIM;
- Corrente de 50 µA aplicada ao filamento, gerando 70 eV de energia para impacto de elétrons;
- Modo de ionização CI negativo, com metano a uma pressão de 12 mbar;
- *Scan time* constante de 0,252 segundos.

A sequência de injeções das soluções, no GC-MS (NCI-SIM) está descrita na figura 5.

1	BS
2	PM-1
3	PM-2
4	PM-5
5	PM-10
6	PM-20
7	BS
8	PS-10
9	BM
10	F-10
11	F-20
12	F-50
13	F-50
14	F-20

15	F-10
16	BM
17	PM-1
18	PM-2
19	PM-5
20	PM-10
21	PM-20
22	BS
23	PS-10
24	BM
25	F-10
26	F-20
27	F-50
28	F-50

29	F-20
30	F-10
31	BM
32	PM-1
33	PM-2
34	PM-5
35	PM-10
36	PM-20
37	BS
38	PS-10
39	BM
40	F-10
41	F-20
42	F-50

43	F-50
44	F-20
45	F-10
46	BM
47	PM-1
48	PM-2
49	PM-5
50	PM-10
51	PM-20
52	BS
53	PS-10

Figura 5 - Sequência de injeções das recuperações onde: BS: “branco” do solvente, BM: “branco” da matriz, PS: padrão em solvente – concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$, PM: padrão em matriz – concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$ e F: fortificação – concentração em $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Os íons monitorados de cada pesticida estão listados na tabela 4, com seus tempos de retenção, segmento e *time window*.

Tabela 4 – Pesticidas determinados por GC-MS (NCI-SIM), valores de t_R, íons monitorados, segmento e *time window*.

Pesticida	Massa molecular (g)	t _R (min)	Íons monitorados (m/z)	Segmento	Time window (min)
Ftalimida**	147,1	5,77	147 ^a	1	5,00 - 7,50
Tetrahidroftalimida**	151,1	5,92	149 ^a		
Tequinazeno	260,8	6,67	213 ^a , 215 ^a , 231 ^a		
HCH-alfa	290,8	7,69	71 ^a , 253 ^a , 255 ^a	2	7,50 - 8,55
Hexaclorobenzeno	284,7	7,77	250, 284 ^a , 286 ^a		
Diclorana	207,0	7,94	190 ^a , 206 ^a , 208 ^a		
HCH-beta	290,8	8,20	71 ^a , 253 ^a , 255 ^a		
Quintozeno	295,3	8,25	249, 251 ^a , 265 ^a		
HCH-gama (Lindano)	290,8	8,36	71 ^a , 253 ^a , 255 ^a		
Teflutrina	418,7	8,66	205, 241 ^a , 243 ^a	3	8,55 - 9,20
Clortalonil	265,9	8,71	230 ^a , 264 ^a , 266 ^a		
HCH-delta	290,8	8,98	71 ^a , 253 ^a , 255 ^a		
Clorpirifós metílico	322,5	9,63	141 ^a , 214 ^a , 285 ^a	4	9,20 - 10,25
Parationa-metílica	263,2	9,81	141 ^a , 154 ^a , 263 ^a		
Transflutrina	371,1	9,82	207 ^a , 209 ^a		
Heptacloro	373,3	10,05	266 ^a , 298 ^a , 300 ^a		
Fenitrotiona	277,2	10,50	141 ^a , 168 ^a , 169 ^a , 277 ^a	5	10,25 - 11,35
Clorpirifós etílico	350,6	10,92	169 ^a , 214 ^a , 313 ^a , 315 ^a		
Aldrim	364,9	11,03	235 ^a , 237 ^a , 330		
Parationa-etílica	291,2	11,22	154 ^a , 169 ^a , 291 ^a		
Diclorobenzofenona-4,4**	251,1	11,47	250 ^a , 252 ^a	6	11,35 - 12,00
Aletrina I - II*	302,4	12,18	134 ^a , 167 ^a	7	12,00 - 12,45
Heptacloroepóxido	389,3	12,24	237 ^a , 354 ^a , 388 ^a		
Captana	300,5	12,28	150 ^a , 182 ^a		
Folpete	296,5	12,50	146 ^a	8	12,45 - 13,10
Bromofós etílico (P.I.E.)	394,0	12,73	79, 146, 169 ^a , 257 ^a		
DDE-2,4	318,0	12,89	246 ^a , 248 ^a , 318		
Endosulfam-alfa	406,9	13,22	237 ^a , 242 ^a , 372 ^a , 406 ^a	9	13,10 - 14,30
Protiofós	345,2	13,59	269 ^a , 237 ^a , 281 ^a , 301 ^a		
DDE-p,p	326,0	13,88	281, 316 ^a , 318 ^a		
Dieldrin	380,9	14,05	237 ^a , 346 ^a , 380 ^a		
DDD-2,4	320,0	14,11	246 ^a , 248 ^a		
Endrin	380,9	14,71	346 ^a , 380 ^a	10	14,30 - 15,30
Endosulfam-beta	406,9	15,09	242, 372 ^a , 406 ^a		
TDCPP (P.I.P.)	430,9	15,99	317 ^a , 318 ^a , 319 ^a	11	15,30 - 17,50
Endosulfam-sulfato	422,9	16,32	97 ^a , 386 ^a , 388 ^a		
DDT-4,4	354,4	16,40	71 ^a , 73 ^a , 281 ^a		
Captafol	349,0	17,11	150 ^a , 217 ^a		
Bifentrina	422,8	18,01	205 ^a , 241 ^a , 386 ^a	12	17,50 - 19,30
Tetrametrina	331,4	18,21	165 ^a , 167 ^a , 331 ^a		
Fenpropatrina	349,4	18,41	141 ^a		
Dicofol	370,4	18,61	250 ^a , 262 ^a		
Tetradifom	356,0	19,07	245 ^a , 320 ^a , 356 ^a		
Fenotrina	350,4	19,10	167 ^a		
Mirex	545,5	19,86	368 ^a , 402 ^a , 439 ^a	13	19,30 - 22,00
Cialotrina-lambda	449,8	19,87	205 ^a , 241 ^a , 243 ^a		
Acrinatrina	541,4	20,20	167 ^a , 305, 333 ^a		
Cifenotrina I - II*	375,4	20,87	167 ^a , 198 ^a		
Permetrina-cis	391,2	21,36	171 ^a , 207 ^a , 209 ^a		
Permetrina-trans	391,2	21,62	171 ^a , 207 ^a , 209 ^a		
Ciflutrina I - IV*	434,3	22,60	171 ^a , 207 ^a , 209 ^a		
Alfa-Cipermetrina	416,3	23,01	171 ^a , 207 ^a , 209 ^a	14	22,00 - 24,00
Flucitrinato I - II*	451,4	23,32	199 ^a , 243 ^a , 244 ^a		
Fenvalerato I - II*	419,9	24,80	211 ^a , 213 ^a	15	24,00 - 2,30
Fluvalinato I - II*	502,9	25,00	294 ^a , 296 ^a		
Deltametrina	505,2	26,20	79 ^a , 81 ^a , 297 ^a	16	25,30 - 28,00

*isômeros; **produtos de degradação de pesticidas, por isso não incluídos na solução mistura; ^aíon(s) de quantificação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 *Slurry* otimizado

O *slurry* considerado mais adequado foi o de proporção 1:4 (café e água), pois os *slurries* de proporção 1:3 e 1:3,5 mostraram-se muito densos oferecendo dificuldades de manipulação.

4.2 Método otimizado de extração (QuEChERS modificado)

A escolha do adsorvente e da quantidade desse, para a purificação do extrato de café, foi feita tendo em vista o adsorvente, com menor número de pesticidas não detectados e com grande número de pesticidas com recuperações entre 70-120%. Conforme pode ser visto na figura 6, os melhores resultados foram obtidos com a utilização de 500 mg de C18. Além disso, utilizando-se 500 mg C18, foram obtidas recuperações entre 70-120% para maioria dos pesticidas que possuem LMRs estabelecidos, ou que são proibidos para o café, pelas legislações brasileira e/ou européia e/ou pelo *Codex Alimentarius*. Dos 51 pesticidas estudados, 47 tem LMRs estabelecidos, ou são proibidos, pelos órgãos anteriormente citados. Desses, 24 mostraram recuperações entre 70-120%, 9 não foram detectados sob as condições de análise e 14 apresentaram valores de recuperações fora da faixa de 70-120%.

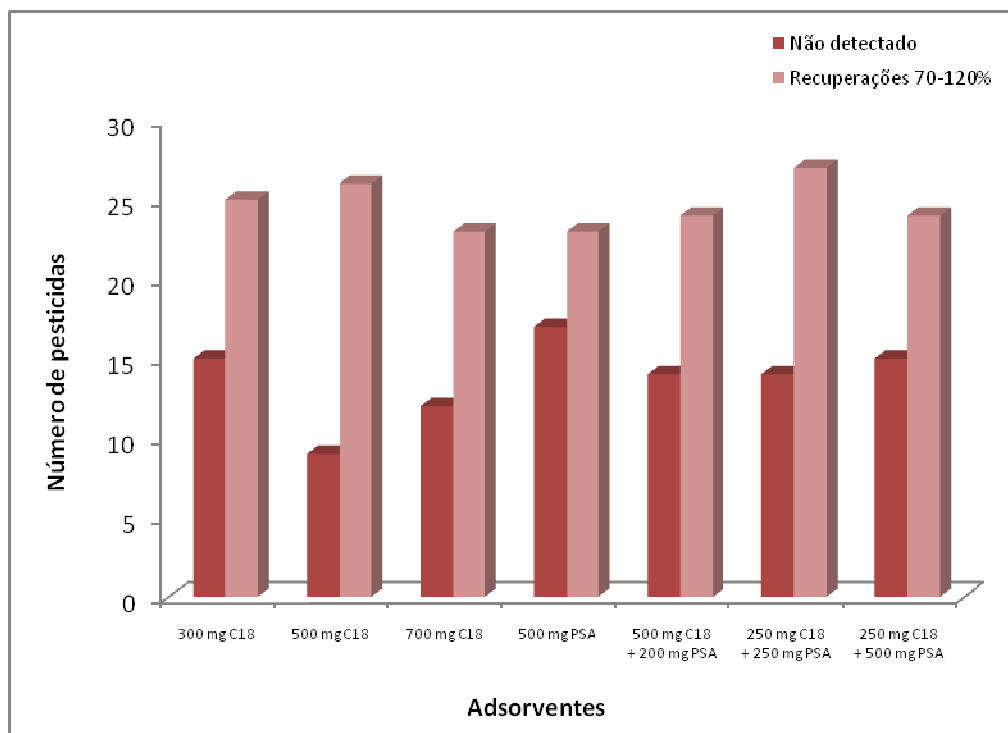


Figura 6 – Número de pesticidas não detectados e número de pesticidas com recuperações entre 70-120%, de acordo com cada adsorvente testado, para a fortificação $40 \mu\text{g kg}^{-1}$, análise realizada por GC-MS/MS (EI^+).

4.3 Validação do método QuEChERS modificado

4.3.1 Determinação da estimativa do LOD e LOQ do instrumento e do método

Para a determinação do LOD e LOQ estimados do instrumento e do método (LOD_i , LOQ_i , LOD_m e LOQ_m , respectivamente), da linearidade das curvas analíticas e do efeito matriz, preparou-se soluções analíticas em acetonitrila e em extrato “branco” de café, obtido pelo procedimento QuEChERS modificado.

A partir das médias das áreas das 6 injeções, das soluções analíticas de concentração 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 20 e $100 \mu\text{g L}^{-1}$, preparadas em extrato “branco” de café (tabela 5) e em acetonitrila (tabela 6), pode-se fazer a estimativa do LOD e LOQ do instrumento e do método para cada pesticida determinado. Para a realização do cálculo das médias das áreas e a utilização de cada resultado nas tabelas das

áreas, considerou-se a detecção de todas as 6 áreas, das 6 injeções realizadas, em cada concentração, para cada pesticida. Se uma das 6 áreas não foi detectada, observou-se as 6 injeções da próxima concentração menor, sendo que, se nessa concentração menor todas as 6 áreas estavam presentes, então a área faltante na concentração maior era apenas considerada um *outlier*. O cálculo da média, então, foi realizado com as 5 áreas obtidas. Porém, se na solução de concentração menor, duas ou mais áreas daquele pesticida estavam ausentes, não se efetuou o cálculo da média das áreas, tanto para a concentração menor quanto para a maior, pois a detecção do pesticida não estava ocorrendo de modo reprodutível. Isto significa que naquela determinada concentração, o pesticida não foi detectado com confiança, não sendo, portanto, calculada a média das áreas que seria posteriormente utilizada para cálculo dos LODs e LOQs. Esse critério foi baseado nos critérios adotados por Pizzutti (2006) e pelo NWWA (PIZZUTTI, 2006).

Tabela 5 - Médias das áreas das 6 injeções e RSD (%) para cada pesticida, nas soluções de concentração 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 20 e 100 µg L⁻¹ em matriz, dos pesticidas determinados por GC-MS (NCI-SIM).

Pesticida	Concentração das soluções (µg L ⁻¹)													
	0,2		0,5		1		2		5		20		100	
	Área média	RSD (%)	Área média	RSD (%)	Área média	RSD (%)	Área média	RSD (%)	Área média	RSD (%)	Área média	RSD (%)	Área média	RSD (%)
Acrinatrina	1517	14	3622	34	7589	31	14862	26	36112	24	141122	22	777407	19
Aldrim					4715	44	15553	17	42861	13	181899	19	540145	56
Aletrina I - II*	46274	10	75873	18	120158	17	234719	11	525481	10	1909500	20	11961833	14
Bifentrina	5870	18	14596	12	28167	10	57752	7	137401	7	763374	28	3024000	15
Captafol ¹														
Captana ¹														
Cialotrina-lambda	6807	30	16141	31	31204	30	62690	24	149864	23	684669	10	3543167	13
Cifenotrina I - II*	2813	23	6924	39	13304	18	26179	19	62793	17	349830	19	1254167	12
Ciflutrina I - IV*	8904	19	20478	26	40198	26	79757	24	196817	21	929453	15	3738333	19
Cipermetrina-alfa	3875	33	8571	35	15819	31	32909	25	79344	20	397531	15	1521670	17
Cloropirifós-etílico	33726	27	75322	18	138996	15	287362	9	682932	10	3369864	18	13746864	11
Cloropirifós-metilico	5947	27	14824	27	30638	24	62690	21	153457	19	748892	13	3538500	14
Clorotalonil	3253	49	5969	56	11358	35	20929	36	61931	27	198270	49	1072543	56
DDD-2,4									7438	27	38732	35	140871	11
DDE-2,4							2994	40	5981	23	41034	37	145874	14
DDE-p,p			3086	55	5563	32	11564	28	28282	28	163747	49	692346	42
DDT-p,p													4045	36
Deltametrina					3899	36	6583	32	17606	28	84700	15	362369	20
Diclorana	8805	17	20602	26	51197	19	94673	19	232067	17	1425500	25	5827667	11
Diclorobenzeno-4,4**	6404	105	14594	48	27416	61	94392	123	130630	64	2082134	102	5702368	111
Dicofol ¹														
Dieldrím			1937	9	3630	8	7667	8	18851	6	122282	38	519742	23
Endosulfam-alfa	3444	13	7849	12	15233	8	31260	6	76291	6	421844	27	1963393	18
Endosulfam-beta	4834	15	11414	11	22617	9	46709	5	115097	6	487613	8	2888933	13
Endosulfam-sulfato	1484	20	2909	24	6183	23	12450	21	33235	14	112749	21	763256	16
Endrim	1067	18	2354	6	4457	7	9088	8	23053	10	114462	26	616698	25
Fempropatrina	2220	18	5349	18	10544	15	22180	12	53197	10	292166	26	1138552	14
Fenitrotiona	6906	19	16959	27	32177	29	64852	26	157508	21	693053	12	3272667	17
Fenotrina									1213	28	5530	14	20174	13
Fenvalerato I - II*	16331	35	36257	35	68409	32	138521	26	334589	23	1680500	16	6507667	16
Flucitrinato I - II*	13052	29	30670	30	59273	27	119473	22	288618	21	1447000	16	5987333	16
Fluvalinato I - II*	12432	35	25566	38	48043	33	94769	28	231612	23	1001398	14	4597500	23
Folpete ¹														
Ftalimida**	48195	33	52106	28	56589	24	73527	18	117083	15	497536	29	1623667	15
HCH-alfa	1518	12	3828	11	7370	15	15471	11	38071	10	216313	27	1012157	15
HCH-beta	702	23	803	17	1143	13	1981	7	3771	29	21143	21	108551	17
HCH-delta			1824	29	3477	22	7231	19	18202	15	80999	10	436742	19
HCH-gama (Lindano)	1191	17	2549	10	4967	11	10365	12	25717	14	131473	32	728905	24
Heptaclorepóxido			15516	22	17932	14	28308	9	52175	8	248076	22	1131291	18
Heptacloro	1281	57	2533	38	5013	33	10711	30	27359	33	129490	42	777480	32
Hexaclorobenzeno	30302	15	73727	15	141467	14	295586	9	714225	10	4322686	30	18347019	14
Mirex			1313	13	2676	21	5954	14	15419	19	66094	33	405865	28
Parationa-etílica	4471	51	14481	50	24676	43	51173	49	120612	46	701346	44	2642333	51
Parationa-metilica			4496	30	7306	37	26388	33	63835	21	292856	13	1505333	18
Permetrina-cis	1184	23	3092	19	5709	10	11518	13	26827	9	141485	24	521651	13
Permetrina-trans			2101	21	4065	15	8508	9	20039	10	108353	24	405221	13
Protiofós	11106	18	24817	19	48606	16	98134	12	238373	12	1319867	21	5863500	10
Quintozeno	6915	22	16279	19	31101	20	63621	15	153503	15	887898	24	3953500	13
Tequinazeno	49698	18	119495	15	228008	16	473311	11	1131094	11	6942833	30	28691667	14
Teflutrina	38248	16	91602	15	174442	14	360726	10	860136	11	5054623	29	21187623	14
Tetradifom	15725	21	36776	19	70189	17	142266	12	343379	13	1932614	22	7658167	11
Tetrahidroftalimida**	2607	17	2521	19	2653	13	2383	23	2529	13	3235	20	2279	22
Tetrametrina	1874	31	4108	31	7884	26	16831	23	41394	21	215718	13	939045	11
Transflutrina	30580	17	74635	17	145703	13	296987	13	728275	10	4126000	27	17028333	11

¹não identificado nas condições de análise; *isômeros; **produtos de degradação de pesticidas.

Tabela 6 - Médias das áreas das 6 injeções e RSD (%) para cada pesticida, nas soluções de concentração 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 20 e 100 µg L⁻¹ em solvente orgânico, dos pesticidas determinados por GC-MS (NCI-SIM).

Pesticida	Concentração das soluções (µg L ⁻¹)													
	0,2		0,5		1		2		5		20		100	
	Área média	RSD (%)	Área média	RSD (%)	Área média	RSD (%)	Área média	RSD (%)	Área média	RSD (%)	Áreamédia	RSD (%)	Áreamédia	RSD (%)
Acrinatrina ¹														
Aldrim			1028	11	1616	9	3129	11	7788	7	32598	8	178524	12
Aletrina I - II*			3523	43	4822	44	8316	42	17517	56	84867	26	587722	43
Bifentrina	1563	27	3852	30	6759	28	14144	23	38087	13	168540	14	992396	14
Captafol ¹														
Captana ¹														
Cialotrina-lambda											3635	29	54947	85
Cifenotrina I - II*											4654	22	40805	49
Ciflutrina I - IV*													42391	138
Cipermetrina-alfa													14245	102
Cloropirifós-etílico							1293	38	4363	61	21209	43	205740	87
Cloropirifós-metilico			782	29	1524	23	2921	25	7427	15	33672	15	191697	22
Clorotalonil					860	34	1570	27	3523	24	13626	22	61047	20
DDD-2,4									1044	36	6149	20	45529	22
DDE-2,4					936	13	1750	14	4547	13	19011	11	99507	12
DDE-p,p			1499	10	2894	11	6081	10	16545	7	70267	12	397121	16
DDT-p,p													1055	52
Deltametrina ¹														
Diclorana			3103	41	5297	46	12546	35	39092	25	192556	24	1406000	21
Diclorobenzofenona-4,4**	1023	79	670	20	989	27	3439	110	2276	51	104591	30	256395	28
Dicofol ¹														
Diêdrim	595	8	1263	12	2500	6	5529	6	14710	6	66144	7	388972	10
Endosulfam-alfa	1429	29	3292	22	6536	18	12342	26	32013	37	135426	45	857859	23
Endosulfam-beta	1851	17	4325	13	8120	8	17398	9	51700	13	237636	13	1459333	18
Endosulfam-sulfato											2631	33	46256	89
Endrim							1312	46	4351	50	23425	52	174998	30
Fempropatrina							776	42	2298	38	10898	27	78217	40
Fenitrotrona													6071	197
Fenotrina											1407	23	8331	11
Fenvalerato I - II*											6851	29	74407	102
Flucitrinato I - II*											5460	37	67747	93
Fluvalinato I - II* ¹														
Folpete ¹														
Ftalimida**	1832	142	1267	85	1669	97	1762	76	3588	53	12568	24	73139	26
HCH-alfa							806	15	2273	32	10574	13	72303	45
HCH-beta											1366	74	12474	49
HCH-delta													5788	134
HCH-gama (Lindano)									912	68	4641	52	48704	84
Heptaclorepóxido			1565	15	2909	18	6237	17	17925	20	84497	19	521868	13
Heptacloro									3218	66	14546	69	109569	71
Hexaclorobenzeno	23077	25	54620	22	105341	22	209250	19	537556	16	2338833	9	13201667	9
Mirex							2752	56	9278	48	50326	43	332127	18
Parationa-etílica											3836	33	43792	78
Parationa-metilica ¹														
Permetrina-cis					884	39	1892	38	5474	23	23791	19	130716	20
Permetrina-trans					606	48	1370	41	3526	25	15209	20	86336	20
Protiofós	631	36	1270	35	2097	38	4319	35	12357	35	56579	19	459260	46
Quintozeno			955	36	1625	55	3585	49	12004	37	55538	23	388054	42
Tequinazeno	9373	22	21741	26	37174	27	80295	24	217136	21	992404	15	6567833	26
Teflutrina	28243	21	67402	20	128210	19	256201	16	657890	11	2785667	7	15306667	10
Tetradifom	2475	38	5431	39	10114	40	20510	36	53676	26	220069	19	1287638	28
Tetrahidroftalimida** ¹														
Tetrametrina											2350	32	23927	66
Transflutrina	17172	22	41283	20	77461	20	154842	17	402152	11	1737500	8	9772500	9

¹não identificado nas condições de análise; *isômeros; **produtos de degradação de pesticidas.

Os cálculos da estimativa do LOD_i , para cada pesticida, foram efetuados a partir das soluções preparadas em matriz e em solvente orgânico nas 7 diferentes concentrações e podem ser visualizados nas tabelas 7 e 8, respectivamente. Quando a média das áreas para um determinado pesticida em uma determinada concentração não pode ser calculada o RSD (%) também não pode ser calculado, por isso não se efetuou o cálculo do LOD_i . A solução de menor concentração que apresentou um valor calculado de LOD_i foi considerada como sendo a concentração mínima detectável, para aquele determinado pesticida. Os valores de LOQ_i , LOD_m e LOQ_m foram calculados a partir do LOD_i , conforme descrito no item 3.13.3 e também estão demonstrados nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7 - Valores dos LOD e LOQ, do instrumento e do método, obtidos pela análise das soluções de concentração 0,2; 0,5; 1; 2 ; 5; 20 e 100 µg L⁻¹ em matriz, por GC-MS (NCI-SIM).

Pesticida	Concentração das soluções							LOD _i ² (µg L ⁻¹)	LOD _m (µg kg ⁻¹)	LOQ _i ³ (µg L ⁻¹)	LOQ _m (µg kg ⁻¹)
	0,2	0,5	1	2	5	20	100				
	Estimativa dos LOD _i ² (µg L ⁻¹)										
Acinatrina	0,1	0,5	0,9	1,5	3,6	13,2	57,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Aldrim				1,0	2,0	11,4	168,0	1,0	4,0	3,3	13,3
Aletrina I - II*	0,1	0,3	0,5	0,6	1,5	12,0	42,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Bifentrina	0,1	0,2	0,3	0,4	1,1	16,8	45,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Captafol ¹											
Captana ¹											
Cialotrina-lambda	0,2	0,5	0,9	1,5	3,5	6,0	39,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Cifentrina I - II*	0,1	0,6	0,5	1,1	2,6	11,4	36,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Ciflutrina I - IV*	0,1	0,4	0,8	1,4	3,2	9,0	57,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Cipermetrina-alfa	0,2	0,5	0,9	1,5	3,0	9,0	51,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Clorpirifós-etílico	0,2	0,3	0,4	0,5	1,5	10,8	33,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Clorpirifós-metilico	0,2	0,4	0,7	1,3	2,9	7,8	42,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Clorotalonil	0,3	0,8	1,1	2,2	4,1	29,4	168,0	0,2	0,8	0,7	2,7
DDD-2,4					4,1	21,0	33,0	5,0	20,0	16,7	66,6
DDE-2,4				2,4	3,5	22,2	42,0	2,0	8,0	6,7	26,6
DDE-p,p		0,8	0,9	1,7	4,2	29,4	126,0	0,5	2,0	1,7	6,7
DDT-p,p ¹							108,0	100,0	400,0	333,0	1332,0
Deltametrina			1,1	1,9	4,2	9,0	60,0	1,0	4,0	3,3	13,3
Diclorana	0,1	0,4	0,6	1,1	2,6	15,0	33,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Diclorobenzofenona-4,4**	0,6	0,7	1,8	7,4	10,0	61,2	333,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Dicofol ¹											
Dieldrin		0,1	0,2	0,5	0,9	22,8	69,0	0,5	2,0	1,7	6,7
Endosulfam-alfa	0,1	0,2	0,2	0,4	0,9	16,2	54,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Endosulfam-beta	0,1	0,2	0,3	0,3	0,9	4,8	39,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Endosulfam-sulfato	0,1	0,4	0,7	1,3	2,1	12,6	48,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Endrim	0,1	0,1	0,2	0,5	1,5	15,6	75,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Fempropatrina	0,1	0,3	0,5	0,7	1,5	15,6	42,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Fenitrotiona	0,1	0,4	0,9	1,6	3,2	7,2	51,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Fenotrina					4,2	8,4	39,0	5,0	20,0	16,7	66,6
Fenvalerato I - II*	0,2	0,5	1,0	1,6	3,5	9,6	48,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Flucitrinato I - II*	0,2	0,5	0,8	1,3	3,2	9,6	48,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Fluvalinato I - II*	0,2	0,6	1,0	1,7	3,5	8,4	69,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Folpete ¹											
Ftalimida**	0,2	0,4	0,7	1,1	2,3	17,4	45,0	0,2	0,8	0,7	2,7
HCH-alfa	0,1	0,2	0,4	0,7	1,5	16,2	45,0	0,2	0,8	0,7	2,7
HCH-beta	0,1	0,3	0,4	0,4	4,4	12,6	51,0	0,2	0,8	0,7	2,7
HCH-delta		0,4	0,7	1,1	2,3	6,0	57,0	0,5	2,0	1,7	6,7
HCH-gama (Lindano)	0,1	0,2	0,3	0,7	2,1	19,2	72,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Heptacloropóxido		0,3	0,4	0,5	1,2	13,2	54,0	0,5	2,0	1,7	6,7
Heptacloro	0,3	0,6	1,0	1,8	5,0	25,2	96,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Hexaclorobenzeno	0,1	0,2	0,4	0,6	1,5	18,0	42,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Mirex		0,2	0,6	0,8	2,9	19,8	84,0	0,5	2,0	1,7	6,7
Parationa-etílica	0,3	0,8	1,3	2,9	6,9	26,4	153,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Parationa-metilica		0,5	1,1	2,0	3,2	7,8	54,0	0,5	2,0	1,7	6,7
Permetrina-cis	0,1	0,3	0,3	0,8	1,4	14,4	39,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Permetrina-trans		0,3	0,4	0,5	1,5	14,4	39,0	0,5	2,0	1,7	6,7
Protiofós	0,1	0,3	0,5	0,7	1,8	12,6	30,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Quintozeno	0,1	0,3	0,6	0,9	2,3	14,4	39,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Tequinazeno	0,1	0,2	0,5	0,6	1,7	18,0	42,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Teflutrina	0,1	0,2	0,4	0,6	1,7	17,4	42,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Tetradifom	0,1	0,3	0,5	0,7	2,0	13,2	33,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Tetrahidroftalimida** ¹	0,2	0,5	0,8	1,4	2,0	12,0	66,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Tetrametrina	0,2	0,5	0,8	1,4	3,2	7,8	33,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Transflutrina	0,1	0,3	0,4	0,6	1,5	16,2	33,0	0,2	0,8	0,7	2,7

¹não identificado nas condições de análise; *isômeros; **produtos de degradação de pesticidas.

²LOD_i = 3 x RSD x C

³LOQ_i = 3,33 x LOD_i

Tabela 8- Valores dos LOD e LOQ, do instrumento e do método, obtidos a partir da análise das soluções de concentração 0,2; 0,5; 1; 2 ; 5; 20 e 100 µg L⁻¹ em solvente orgânico, por GC-MS (NCI-SIM).

Pesticida	Concentração das soluções							LOD _i ² (µg L ⁻¹)	LOD _m (µg kg ⁻¹)	LOQ _i ³ (µg L ⁻¹)	LOQ _m (µg kg ⁻¹)
	0,2	0,5	1	2	5	20	100				
	Estimativa dos LOD _i ² (µg L ⁻¹)										
Acrinatrina ¹											
Aldrim		0,2	0,3	0,6	1,1	4,8	36,0	0,5	2,0	1,7	6,7
Aletrina I - II*		0,7	1,3	2,5	8,4	15,6	129,0	0,5	2,0	1,7	6,7
Bifentrina	0,2	0,4	0,8	1,4	2,0	8,4	42,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Captafol ¹											
Captana ¹											
Cialotrina-lambda						17,4	255,0	20,0	80,0	66,6	266,4
Cifenotrina I - II*						13,2	147,0	20,0	80,0	66,6	266,4
Ciflutrina I - IV*							414,0	100,0	400,0	333,0	1332,0
Cipermetrina-alfa							306,0	100,0	400,0	333,0	1332,0
Clorpirifós-etílico				2,3	9,2	25,8	261,0	2,0	8,0	6,7	26,6
Clorpirifós-metilico		0,4	0,7	1,5	2,3	9,0	66,0	0,5	2,0	1,7	6,7
Clorotalonil			1,0	1,6	3,6	13,2	60,0	1,0	4,0	3,3	13,3
DDD-2,4					5,4	12,0	66,0	5,0	20,0	16,7	66,6
DDE-2,4			0,4	0,9	2,0	6,6	36,0	1,0	4,0	3,3	13,3
DDE-p,p		0,2	0,3	0,6	1,1	7,2	48,0	0,5	2,0	1,7	6,7
DDT-p,p							156,0	100,0	400,0	333,0	1332,0
Deltametrina ¹											
Diclorana		0,6	1,4	2,1	3,8	14,4	63,0	0,5	2,0	1,7	6,7
Diclorobenzofenona-4,4**	0,5	0,3	0,8	6,6	7,7	18,0	84,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Dicofol ¹											
Dieldrin	0,0	0,2	0,2	0,4	0,9	4,2	30,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Endosulfam-alfa	0,2	0,3	0,5	1,6	5,6	27,0	69,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Endosulfam-beta	0,1	0,2	0,2	0,6	2,0	7,8	54,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Endosulfam-sulfato						19,8	267,0	20,0	80,0	66,6	266,4
Endrim				2,7	7,5	31,2	90,0	2,0	8,0	6,7	26,6
Fempropatrina				2,5	5,7	16,2	120,0	2,0	8,0	6,7	26,6
Fenitrotiona							591,0	100,0	400,0	333,0	1332,0
Fenotrina						13,8	33,0	20,0	80,0	66,6	266,4
Fenvalerato I - II*						17,4	306,0	20,0	80,0	66,6	266,4
Flucitrinato I - II*						22,2	279,0	20,0	80,0	66,6	266,4
Fluvalinato I - II* ¹											
Folpete ¹											
Ftalimida**	0,9	1,3	2,9	4,6	8,0	14,4	78,0	0,2	0,8	0,7	2,7
HCH-alfa				0,9	4,8	7,8	135,0	2,0	8,0	6,7	26,6
HCH-beta ¹						44,0	147,0	20,0	80,0	66,6	266,4
HCH-delta ¹							402,0	100,0	400,0	333,0	1332,0
HCH-gama (Lindano)					10,2	31,2	252,0	5,0	20,0	16,7	66,6
Heptaclorepóxido		0,2	0,6	1,0	3,0	11,4	39,0	0,5	2,0	1,7	6,7
Heptacoloro					9,9	41,4	213,0	5,0	20,0	16,7	66,6
Hexaclorobenzeno	0,1	0,3	0,7	1,1	2,4	5,4	27,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Mirex				3,4	7,2	25,8	54,0	2,0	8,0	6,7	26,6
Parationa-etílica						19,0	234,0	20,0	80,0	66,6	266,4
Parationa-metilica ¹											
Permetrina-cis			1,2	2,3	3,5	11,4	60,0	1,0	4,0	3,3	13,3
Permetrina-trans			1,4	2,5	3,8	12,0	60,0	1,0	4,0	3,3	13,3
Protiofós	0,2	0,5	1,2	2,1	5,3	11,4	138,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Quintozeno		0,5	1,7	3,0	5,6	13,8	126,0	0,5	2,0	1,7	6,7
Tequinazeno	0,1	0,4	0,8	1,4	3,2	9,0	78,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Teflutrina	0,1	0,3	0,6	0,9	1,7	4,2	30,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Tetradifom	0,2	0,6	1,2	2,1	3,9	11,4	84,0	0,2	0,8	0,7	2,7
Tetrahidroftalimida** ¹											
Tetrametrina						19,2	198,0	20,0	80,0	66,6	266,4
Transflutrina	0,1	0,3	0,6	1,0	1,7	4,8	27,0	0,2	0,8	0,7	2,7

¹não identificado nas condições de análise; *isômeros; **produtos de degradação de pesticidas.

²LOD_i = 3 x RSD x C

³LOQ_i = 3,33 x LOD_i

Conforme a tabela 7, para pesticidas em matriz, o LOD_i (calculado a partir dos valores de RSD (%)) e o correspondente LOD_m foram de 0,2; 0,5; 1; 2; 5 e 100 µg L⁻¹ e 0,8; 2; 4; 8; 20 e 400 µg kg⁻¹, respectivamente para 34, 7, 2, 1, 2 e 1 dos 51 compostos estudados. Quatro pesticidas, dicofol, captana, captafol e folpete, não tiveram seu LOD_i e LOD_m determinados. Esses pesticidas degradam-se no injetor do GC e podem ser determinados indiretamente a partir de seus produtos de degradação, dicofol via diclorobenzofenona-4,4, captana e captafol via tetrahydroftalimida e folpete via ftalimida. Contudo, obteve-se, surpreendentes, baixos valores de LOD_i e LOD_m de 0,2 µg L⁻¹ e 0,8 µg kg⁻¹, para os três produtos de degradação.

Para os pesticidas em solvente orgânico (tabela 8) o LOD_i e o correspondente LOD_m foram de 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 20 e 100 µg L⁻¹ e 0,8; 2; 4; 8; 20; 80 e 400 µg kg⁻¹, respectivamente para 10, 7, 4, 5, 3, 9 e 5 pesticidas. Oito compostos não tiveram seu LOD_i e LOD_m determinados, de acordo com as concentrações estudadas. Esses foram dicofol, captana, captafol e folpete, os piretróides acrinatrina, deltametrina e fluvalinato I-II e o organofosforado parationa metílica. Dicofol e folpete foram determinados, novamente, via seus produtos de degradação, (diclorobenzofenona-4,4 e ftalimida, respectivamente), ambos com LOD_i e LOD_m de 0,2 µg L⁻¹ e 0,8 µg kg⁻¹. Tetrahydroftalimida, produto de degradação de captana e captafol, não teve seu LOD_i e LOD_m determinados, pois não foi detectado em nenhuma das concentrações estudadas.

Observou-se que, para as soluções preparadas em extrato “branco” de café, os limites de detecção foram mais baixos, para um número maior de pesticidas, em comparação com as soluções preparadas em solvente orgânico, nas quais poucos compostos alcançaram LOD_i e LOD_m de 0,2 µg L⁻¹ e 0,8 µg kg⁻¹. Provavelmente esse fato se deve ao efeito positivo exercido pela matriz (FRENICH et al., 2009). Aparentemente a acetonitrila, utilizada para o preparo das soluções analíticas em solvente orgânico, ativa os sítios ativos no interior do GC-MS (injetor e coluna) e dessa forma favorece a perda dos pesticidas nesses sítios ativos.

É importante ter em mente que os valores de LOQ_m reportados acima são os valores estimados. Pois, como descrito em 3.13.3, considera-se o valor verdadeiro do LOQ_m (em µg kg⁻¹), como sendo a menor concentração que, ao ser fortificada na matriz, apresentar recuperações entre 70-120% e RSD ≤ 20%, esses resultados estão descritos no item 4.3.4.

4.3.2 Determinação da linearidade das curvas analíticas

As equações das curvas analíticas, bem como o coeficiente de determinação (r^2), coeficiente de correlação (r) e o intervalo linear, obtidos para os pesticidas estudados encontram-se nas tabelas 9 e 10.

Conforme os resultados da tabela 9 (pesticidas em matriz), pode-se observar que aproximadamente 65% dos compostos apresentaram $r \geq 0,980$, 21% apresentaram r entre 0,980 e 0,900 e 4% demonstraram $r \leq 0,900$. Os restantes 10% dos pesticidas não apresentaram áreas médias de no mínimo 3 diferentes concentrações nessas condições de análise, conseqüentemente, seu coeficiente de correlação também não pode ser calculado. Já para os pesticidas em solvente orgânico (tabela 10) a percentagem de compostos com $r \geq 0,980$; $0,980 > r > 0,900$; $r \leq 0,900$ e pesticidas que não apresentaram áreas médias de no mínimo 3 diferentes concentrações foi de, respectivamente, 20%, 31%, 6% e 43%.

Os melhores resultados obtidos para os pesticidas em matriz podem ser explicados pelo fato de que alguns componentes da matriz, co-extraídos, desativam os sítios ativos presentes no injetor do GC e/ou na interface do GC-MS e, dessa forma, impedem os pesticidas de serem adsorvidos irreversivelmente ou de serem degradados. Assim, o efeito matriz positivo nas análises feitas por GC melhora a detectabilidade dos pesticidas nas soluções preparadas em matriz quando comparadas às soluções preparadas em solvente orgânico (FRENICH et al., 2009).

Tabela 9 - Parâmetros das curvas analíticas, obtidos para os pesticidas determinados a partir das soluções analíticas de concentração 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 20 e 100 µg L⁻¹ em matriz, por GC-MS (NCI-SIM).

Pesticida	Equação	r ²	r	Intervalo linear (µg L ⁻¹)
Acrinatrina	y = 7778x - 2689	0,9610	0,9803	0,2-100
Aldrim	y = 5284x + 21747	0,7090	0,8420	1-100
Aletrina I - II*	y = 119564x - 73439	0,9770	0,9884	0,2-100
Bifentrina	y = 30306x + 18678	0,9680	0,9838	0,2-100
Captafol ¹				
Captana ¹				
Cialotrina-lambda	y = 35502x - 10653	0,9810	0,9904	0,2-100
Cifenotrina I - II*	y = 12555x + 14305	0,9770	0,9884	0,2-100
Ciflutrina I - IV*	y = 37380x + 29021	0,9580	0,9787	0,2-100
Cipermetrina-alfa	y = 15220x + 14422	0,9650	0,9823	0,2-100
Clorpirifós etílico	y = 137543x + 92666	0,9830	0,9914	0,2-100
Clorpirifós metílico	y = 35468x - 1393	0,9780	0,9889	0,2-100
Clorotalonil	y = 15301x - 20114	0,8200	0,9055	0,2-100
DDD-2,4	y = 1413x + 1223	0,9670	0,9833	5-100
DDE-2,4	y = 1458x + 1851	0,9590	0,9792	2-100
DDE-p,p	y = 6942x + 2074	0,8250	0,9082	0,5-100
DDT-p,p ¹				
Deltametrina	y = 3616x + 2440	0,9500	0,9746	1-100
Diclorana	y = 58512x + 18569	0,9800	0,9899	0,2-100
Diclorobenzofenona-4,4**	y = 57615x + 91849	0,4140	0,6434	0,2-100
Dicofol ¹				
Diendrim	y = 5222x + 510,2	0,9370	0,9679	0,5-100
Endosulfam-alfa	y = 19707x - 2430	0,9640	0,9818	0,2-100
Endosulfam-beta	y = 28965x - 21509	0,9820	0,9909	0,2-100
Endosulfam-sulfato	y = 7643x - 7354	0,9710	0,9853	0,2-100
Endrim	y = 6190x - 3646	0,9370	0,9679	0,2-100
Fempropatrina	y = 11409x + 7990	0,9720	0,9859	0,2-100
Fenitrotiona	y = 32745x + 4266	0,9700	0,9848	0,2-100
Fenotrina	y = 202x + 212	0,9720	0,9859	5-100
Fenvalerato I - II*	y = 65097x + 57749	0,9670	0,9833	0,2-100
Flucitrinato I - II*	y = 59939x + 33040	0,9690	0,9843	0,2-100
Fluvalinato I - II*	y = 45965x + 13655	0,9470	0,9731	0,2-100
Folpete ¹				
Ftalimida**	y = 15842x + 61399	0,9610	0,9803	0,2-100
HCH-alfa	y = 10165x - 1923	0,9720	0,9859	0,2-100
HCH-beta	y = 1086x - 252,8	0,9680	0,9838	0,2-100
HCH-delta	y = 4383x - 2467	0,9620	0,9808	0,5-100
HCH-gama (Lindano)	y = 7320x - 5284	0,9400	0,9695	0,2-100
Heptaclorepóxido	y = 11259x + 7743	0,9630	0,9813	0,5-100
Heptacloro	y = 7808x - 7291	0,8970	0,9471	0,2-100
Hexaclorobenzeno	y = 184228x + 30695	0,9730	0,9864	0,2-100
Mirex	y = 4083x - 4556	0,9200	0,9591	0,5-100
Parationa-etílica	y = 26483x + 21529	0,7760	0,8809	0,2-100
Parationa-metílica	y = 15100x - 5577	0,9650	0,9823	0,5-100
Permetrina-cis	y = 5218x + 5700	0,9740	0,9869	0,2-100
Permetrina-trans	y = 4046x + 4720	0,9730	0,9864	0,5-100
Protiofós	y = 58827x + 4760	0,9860	0,9929	0,2-100
Quintozeno	y = 39687x + 722,3	0,9800	0,9899	0,2-100
Tequinazeno	y = 288063x + 80337	0,9730	0,9864	0,2-100
Teflutrina	y = 212620x + 57593	0,9720	0,9859	0,2-100
Tetradifom	y = 76766x + 45620	0,9800	0,9899	0,2-100
Tetrahidroftalimida**	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.
Tetrametrina	y = 9413x + 2185	0,9860	0,9929	0,2-100
Transflutrina	y = 170804x + 63994	0,9800	0,9899	0,2-100

¹não apresentam áreas médias de no mínimo 3 diferentes concentrações das soluções analíticas.

*isômeros; **produtos de degradação de pesticidas; n.q.: não quantificável.

Tabela 10 - Parâmetros das curvas analíticas, obtidos para os pesticidas determinados a partir das soluções analíticas de concentração 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 20 e 100 µg L⁻¹ em solvente orgânico, por GC-MS (NCI-SIM).

Pesticida	Equação	r ²	r	Intervalo linear (µg L ⁻¹)
Acrinatrina ¹				
Aldrim	y = 1789x - 876,7	0,9830	0,9915	0,5-100
Aletrina I - II*	y = 5918x - 8960	0,8310	0,9116	0,5-100
Bifentrina	y = 9958x - 8053	0,9770	0,9884	0,2-100
Captafol ¹				
Captana ¹				
Cialotrina-lambda ¹				
Cifentrina I - II*. ¹				
Ciflutrina I - IV*. ¹				
Cipermetrina-alfa ¹				
Clorpirifós-etílico	y = 2131x - 7404	0,5380	0,7335	2-100
Clorpirifós-metilico	y = 1926x - 1584	0,9500	0,9746	0,5-100
Clorotalonil	y = 606x + 611,3	0,9520	0,9757	1-100
DDD-2,4	y = 465,7x - 1378	0,9470	0,9731	5-100
DDE-2,4	y = 998x - 398,8	0,9840	0,9919	1-100
DDE-p,p	y = 3988x - 3027	0,9720	0,9859	0,5-100
DDT-p,p ¹				
Deltametrina ¹				
Diclorana	y = 14216x - 28037	0,9510	0,9751	0,5-100
Diclorobenzofenona-4,4**	y = 2599x + 4981	0,8720	0,9338	0,2-100
Dicofol ¹				
Dieldrin	y = 3904x - 3261	0,9890	0,9945	0,2-100
Endosulfam-alfa	y = 8606x - 8393	0,9400	0,9695	0,2-100
Endosulfam-beta	y = 14665x - 15283	0,9660	0,9829	0,2-100
Endosulfam-sulfato ¹				
Endrim	y = 1789x - 6122	0,8950	0,9460	2-100
Fempropatrina	y = 796x - 1935	0,8430	0,9181	2-100
Fenitrotiona ¹				
Fenotrina ¹				
Fenvalerato I - II*. ¹				
Flucitrinato I - II*. ¹				
Fluvalinato I - II*. ¹				
Folpete ¹				
Ftalimida**	y = 718,5x + 761,4	0,9280	0,9633	0,2-100
HCH-alfa	y = 734,5x - 1613	0,8130	0,9016	2-100
HCH-beta ¹				
HCH-delta ¹				
HCH-gama (Lindano)	y = 500,3x - 1956	0,5560	0,7456	5-100
Heptaclorepóxido	y = 5259x - 6806	0,9790	0,9894	0,5-100
Heptacloro	y = 1115x - 3179	0,6360	0,7974	5-100
Hexaclorobenzeno	y = 132361x - 80651	0,9900	0,9949	0,2-100
Mirex	y = 3375x - 7611	0,9590	0,9792	2-100
Parationa-etílica ¹				
Parationa-metilica ¹				
Permetrina-cis	y = 1315x - 1135	0,9550	0,9772	1-100
Permetrina-trans	y = 869,3x - 845	0,9540	0,9767	1-100
Protiofós	y = 4621x - 8321	0,8190	0,9049	0,2-100
Quintozeno	y = 3919x - 6986	0,8370	0,9149	0,5-100
Tequinazeno	y = 65997x - 81123	0,9310	0,9649	0,2-100
Teflutrina	y = 153370x - 72643	0,9880	0,9940	0,2-100
Tetradifom	y = 12906x - 8722	0,9240	0,9612	0,2-100
Tetrahidroftalimida**. ¹				
Tetrametrina ¹				
Transflutrina	y = 97973x - 58039	0,9900	0,9949	0,2-100

¹ não apresentam áreas médias de no mínimo 3 diferentes concentrações das soluções analíticas.

*isômeros; **produtos de degradação de pesticidas.

4.3.3 Análise do solvente extrator (acetonitrila)

Conforme observado na figura 7, após a realização do procedimento descrito em 3.13.5, não foi observada contaminação nos solventes e reagentes utilizados para a realização do procedimento de extração. O pico observado aos 12,61 minutos, no cromatograma total, corresponde ao P.I.E.

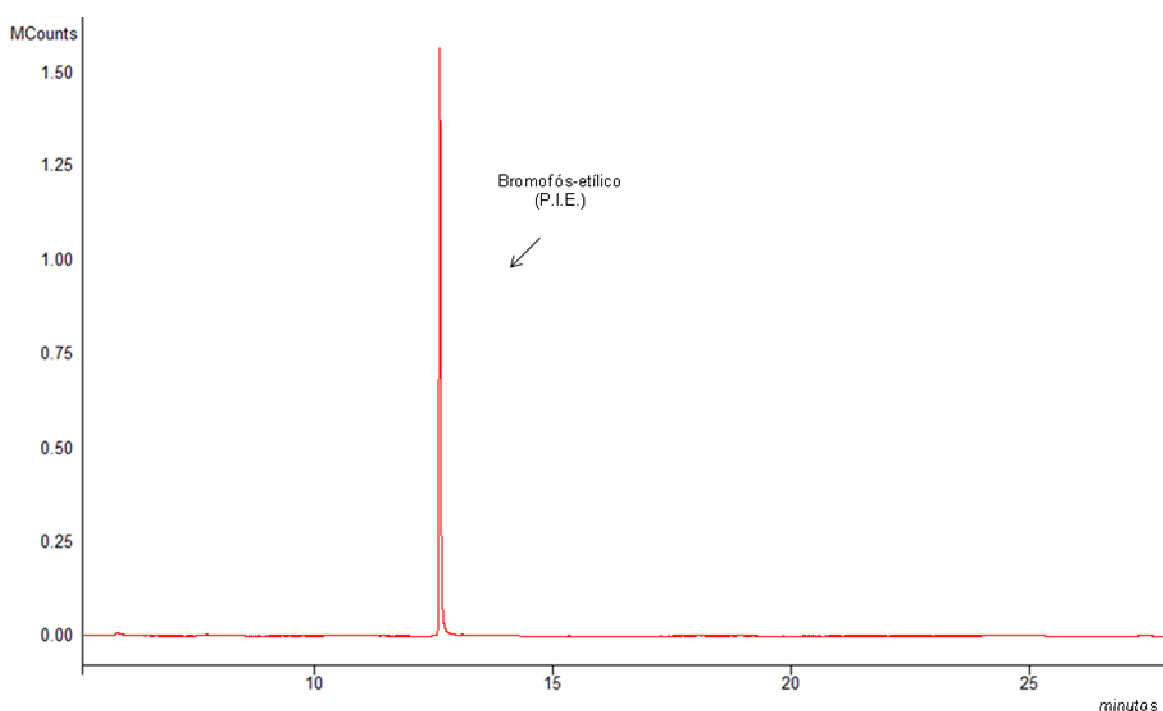


Figura 7 – Cromatograma total, obtido pela análise de acetonitrila contendo o P.I.E., por GC-MS (NCI-SIM).

4.3.4 Ensaios de recuperação

Outro parâmetro a ser avaliado na validação de um método analítico é o percentual de recuperação para os pesticidas adicionados à amostra e, subsequentemente, submetidos aos procedimentos de extração e análise. Este

percentual deve estar entre 70-120%, aliado a um valor de RSD \leq 20%, para o estabelecimento do real LOQ_m.

Os resultados das recuperações médias (n=6) percentuais e RSD (%) para os pesticidas que foram fortificados nas concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ podem ser visualizados na tabela 11. Os valores das recuperações médias percentuais estão relacionados à exatidão do método e foram calculados conforme descrito no item 2.11.2. Já o RSD (%) está relacionado à precisão do método e foi calculado conforme anteriormente descrito no item 2.11.3.

Tendo-se em vista os resultados da tabela 11 pode se verificar que do total de 51 pesticidas estudados, para as fortificações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, em torno de 76% obtiveram recuperações médias de 70–120% e cerca de 75% alcançaram valores de RSD \leq 20% para a fortificação de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para as fortificações de 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 82% dos pesticidas mostraram recuperações satisfatórias (entre 70-120%); já a percentagem de pesticidas com valores de RSD \leq 20% foi de 75% e 86%, respectivamente.

Os pesticidas bromofós etílico e tris(1,3-dicloroisopropil)fosfato, os quais correspondem aos padrões internos do equipamento e do procedimento, respectivamente, foram adicionados às amostras sempre nas concentrações de 50 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (inclusive nos “brancos” de solvente e matriz). Portanto, seus valores de recuperação não foram mostrados na tabela 11.

Tabela 11 - Recuperações médias percentuais, RSD (%) e LOQ_m do café fortificado nas concentrações de 10, 20 e 50 µg kg⁻¹, análises realizadas por GC-MS (NCI-SIM).

Pesticida	Concentração de fortificação (µg kg ⁻¹)						LOQ _m validado (µg kg ⁻¹)
	10		20		50		
	Recuperação média (%)	RSD (%)	Recuperação média (%)	RSD (%)	Recuperação média (%)	RSD (%)	
Acinatrina	100	7,5	104	8,8	106	7,5	10
Aldrim	66	21,4	67	16,9	62	10,4	n.p.r.v.
Aletrina I - II*	88	6,0	93	4,4	97	5,5	10
Bifentrina	72	6,3	79	7,8	79	7,5	10
Captafol ¹							
Captana ¹							
Cialotrina-lambda	93	8,8	97	8,4	99	7,9	10
Cifenotrina I - II*	85	17,1	92	14,8	93	14,2	10
Ciflutrina I - IV*	89	22,1	97	21,7	103	16,4	50
Cipermetrina-alfa	85	24,0	92	23,8	97	18,6	50
Clorpirifós etílico	92	4,9	98	3,5	98	3,9	10
Clorpirifós metílico	92	13,2	96	14,6	102	10,4	10
Clorotalonil	92	31,7	100	44,3	116	41,6	n.p.r.v.
DDD-2,4	52	112,9	75	45,5	82	18,9	50
DDE-2,4	7	80,8	48	44,0	69	17,5	n.p.r.v.
DDE-p,p	67	12,0	70	8,5	71	6,1	20
DDT-p,p	70	17,7	73	14,1	80	27,0	10
Deltametrina	95	24,4	103	24,2	114	18,8	50
Diclorana	93	15,0	94	17,2	95	15,4	10
Diclorobenzofenona-4,4**	84	5,6	86	4,4	84	4,4	10
Dicofol ¹							
Dieldrim	77	5,6	84	5,8	84	3,7	10
Endosulfam-alfa	74	7,2	83	3,8	86	3,5	10
Endosulfam-beta	89	8,0	93	6,8	95	11,4	10
Endosulfam-sulfato	102	10,2	105	13,2	118	24,7	10
Endrim	72	8,3	79	4,6	85	3,7	10
Fempropatrina	85	2,7	91	3,8	93	2,8	10
Fenitrotona	101	22,9	107	26,1	112	17,8	50
Fenotrina	78	1,5	83	4,7	77	4,7	10
Fenvalerato I - II*	88	21,8	93	21,1	97	16,6	50
Flucitrinato I - II*	97	13,7	102	13,5	106	11,0	10
Fluvalinato I - II*	87	17,2	92	18,7	100	13,6	10
Folpete ¹							
Ftalimida**	85	20,9	93	9,9	96	15,9	20
HCH-alfa	82	5,2	90	4,9	95	6,0	10
HCH-beta	89	2,9	94	5,6	97	5,8	10
HCH-delta	88	5,1	95	8,4	102	8,7	10
HCH-gama (Lindano)	79	5,5	86	5,1	89	6,3	10
Heptaclorepóxido	75	4,4	85	2,7	90	2,1	10
Heptaclo	66	8,6	77	2,8	81	3,2	20
Hexaclorobenzeno	53	9,1	57	8,6	58	9,0	n.p.r.v.
Mirex	41	6,4	46	8,0	46	5,7	n.p.r.v.
Parationa-etílica	95	17,6	103	10,4	107	10,9	10
Parationa-metílica	120	16,8	121	22,9	129	15,0	10
Permetrina-cis	74	10,5	80	9,8	81	9,5	10
Permetrina-trans	75	11,0	83	8,0	85	8,6	10
Protiofós	67	2,0	75	3,1	80	2,1	20
Quintozeno	74	10,6	81	9,1	84	8,2	10
Tequinazeno	80	11,3	87	10,4	89	10,4	10
Teflutrina	82	8,5	91	7,7	91	7,7	10
Tetradifom	84	7,7	91	7,3	94	7,0	10
Tetrahidroftalimida**	n.q.	-	n.q.	-	n.q.	-	n.q.
Tetrametrina	92	11,1	97	10,7	102	7,9	10
Transflutrina	85	7,0	92	4,6	95	5,6	10

¹ não identificado nas condições de análise; n.q.: não quantificável; *isômeros; **produtos de degradação de pesticidas; n.p.r.v.: não preencheu os requisitos necessários para validação (recuperações 70-120% e RSD ≤ 20%).

O tempo de retenção dos pesticidas é um critério muito importante para a sua identificação e para seletividade do método analítico. A seletividade do método analítico pode ser vista nas figuras dos cromatogramas totais do modo NCI-SIM para os pesticidas estudados (figura 8). Os cromatogramas foram obtidos da análise de um extrato “branco” de café e de amostras de café fortificadas nas concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

A seletividade pode ser visualizada de forma ainda mais clara nas figuras 9 e 10, que representam os cromatogramas dos pesticidas quintozeno, cialotrina-lambda, hexaclorobenzeno, cloropirifós-metílico, heptacloro, aletrina I-II, tequinazeno, permetrina-cis, mirex, bifentrina, endrim e endossulfam-alfa. Mesmo para uma matriz complexa como o café, os cromatogramas obtidos no modo SIM estão livres interferências. Consequentemente, conseguiu-se validar bons valores de LOQ do método. Do total de 51 pesticidas estudados, o número de compostos que apresentaram LOQ_m de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foi de 33, 3 e 6, respectivamente. Os pesticidas aldrin, clorotalonil, DDE-2,4, hexaclorobenzeno e mirex não tiveram o LOQ_m determinado, pois não demonstraram recuperações entre 70-120% e $\text{RSD} \leq 20\%$ em nenhuma das concentrações de fortificação estudadas.

Aldrin apresentou recuperações muito baixas (62-67%), mas com boa repetibilidade nas fortificações de 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (10,4-16,9%), fato similar ocorreu com DDE-2,4 que apresentou recuperações entre 7-69%, mas com RSD de 17,5% na fortificação de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para o clorotalonil obteve-se boas recuperações nas 3 concentrações de fortificação, porém, a repetibilidade não foi satisfatória (31,7–44,3%). O mirex e o hexaclorobenzeno, que são os dois pesticidas mais apolares dentre os 51 compostos estudados, obtiveram baixos valores de recuperação (< 60%), porém com boa precisão (5,7-9,1%). Esse fato é explicado pela característica do método QuEChERS modificado de fornecer baixas recuperações para pesticidas apolares (ANASTASSIADES et al., 2003).

Captafol, captana, dicofol e folpete, como já dito anteriormente, somente puderam ser detectados a partir de seus respectivos produtos de degradação.

Captana e captafol via tetrahidroftalimida, que só pode ser determinado de forma irreprodutível, dicofol via diclorobenzofenona-4,4 e ftalimida, que é produto da degradação do folpete, apresentaram surpreendentemente bons valores de recuperação (%) e precisão ($\text{RSD}\%$).

Considerando-se o fato que o LMR mais baixo estabelecido por ambas legislações européia e brasileira é de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, pode-se dizer que o método desenvolvido e validado é adequado para o monitoramento de resíduos de pesticidas em café, pois para maioria dos pesticidas o LOQ_m alcançado foi ainda menor ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Com relação aos cromatogramas das figuras 9 e 10 é importante observar que os picos representados para alguns pesticidas, como por exemplo, para o hexaclorobenzeno, apresentam-se menores para soluções de concentração maior. Isso acontece porque os cromatogramas representados por “C” foram obtidos a partir de amostras de café fortificadas para avaliação das recuperações, porém, em alguns casos, como para o hexaclorobenzeno, a recuperação obtida foi inferior a 100%.

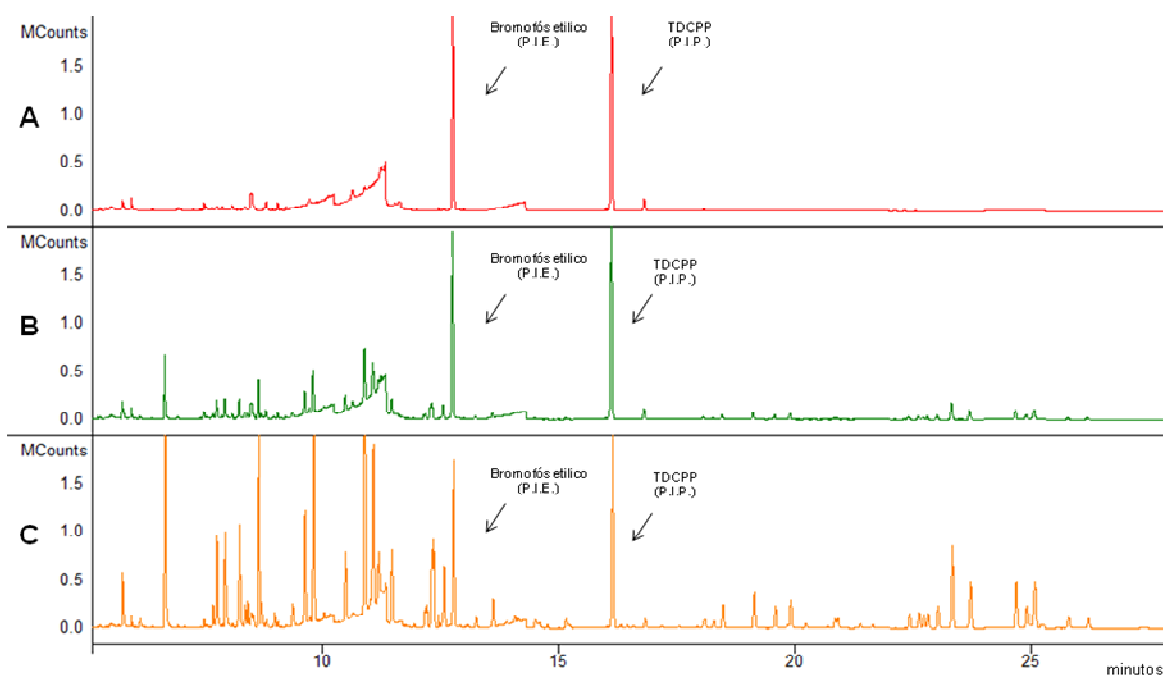


Figura 8 – Cromatogramas totais obtidos pela análise por GC-MS (NCI-SIM) de (A) extrato “branco” de café, (B) amostra de café fortificada na concentração de 10 e (C) $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, com a solução mistura de pesticidas.

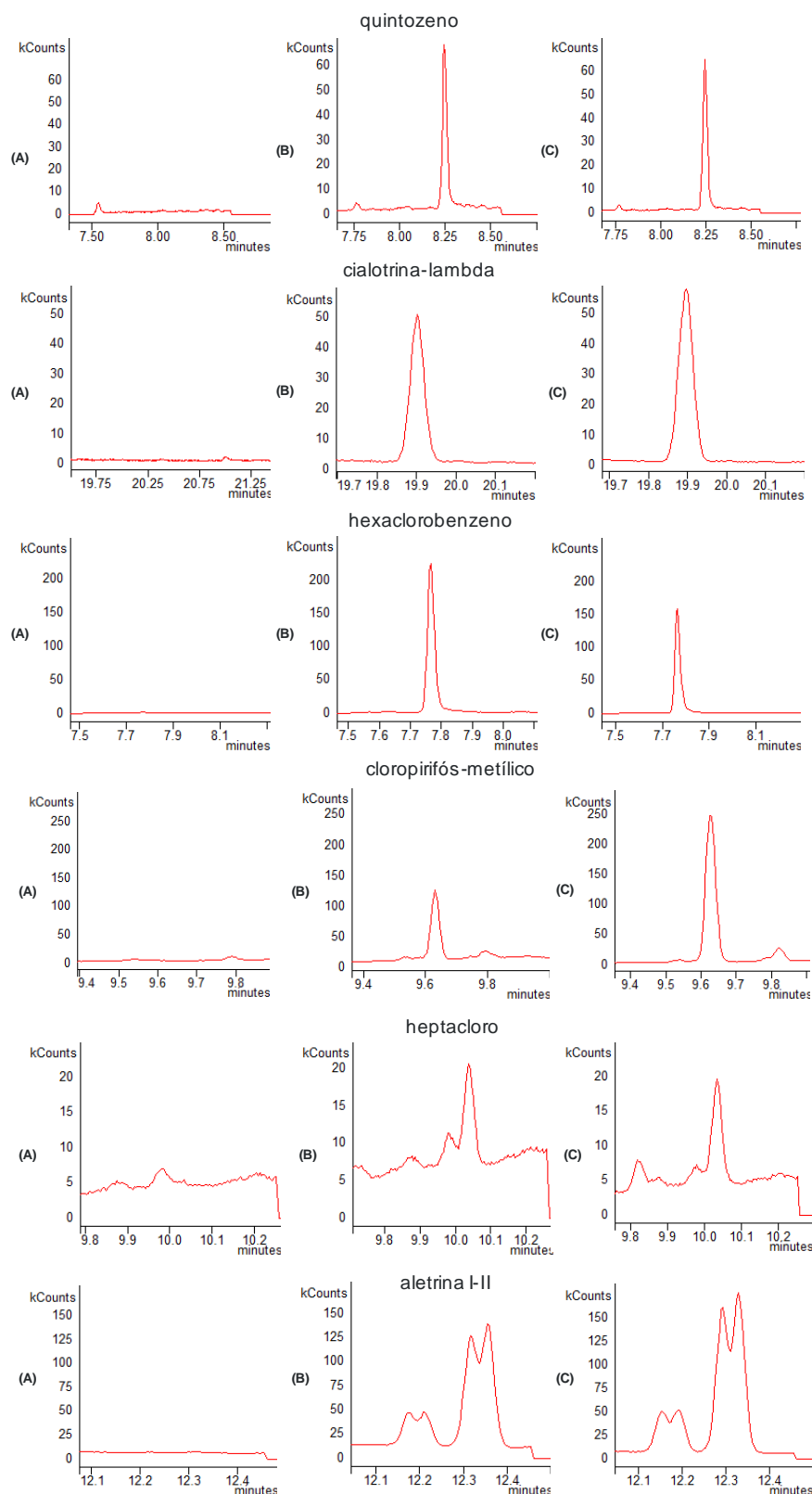


Figura 9 - Cromatogramas dos pesticidas quintozeno, cialotrina-lambda, hexaclorobenzeno, cloropirifós-metilico, heptacloro e aletrina I-II: (A) extrato “branco” de café; (B) solução analítica em matriz de concentração $1 \mu\text{g L}^{-1}$, (C) amostra de café fortificado na concentração de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($2,5 \mu\text{g L}^{-1}$), obtidos por GC-MS (NCI-SIM).

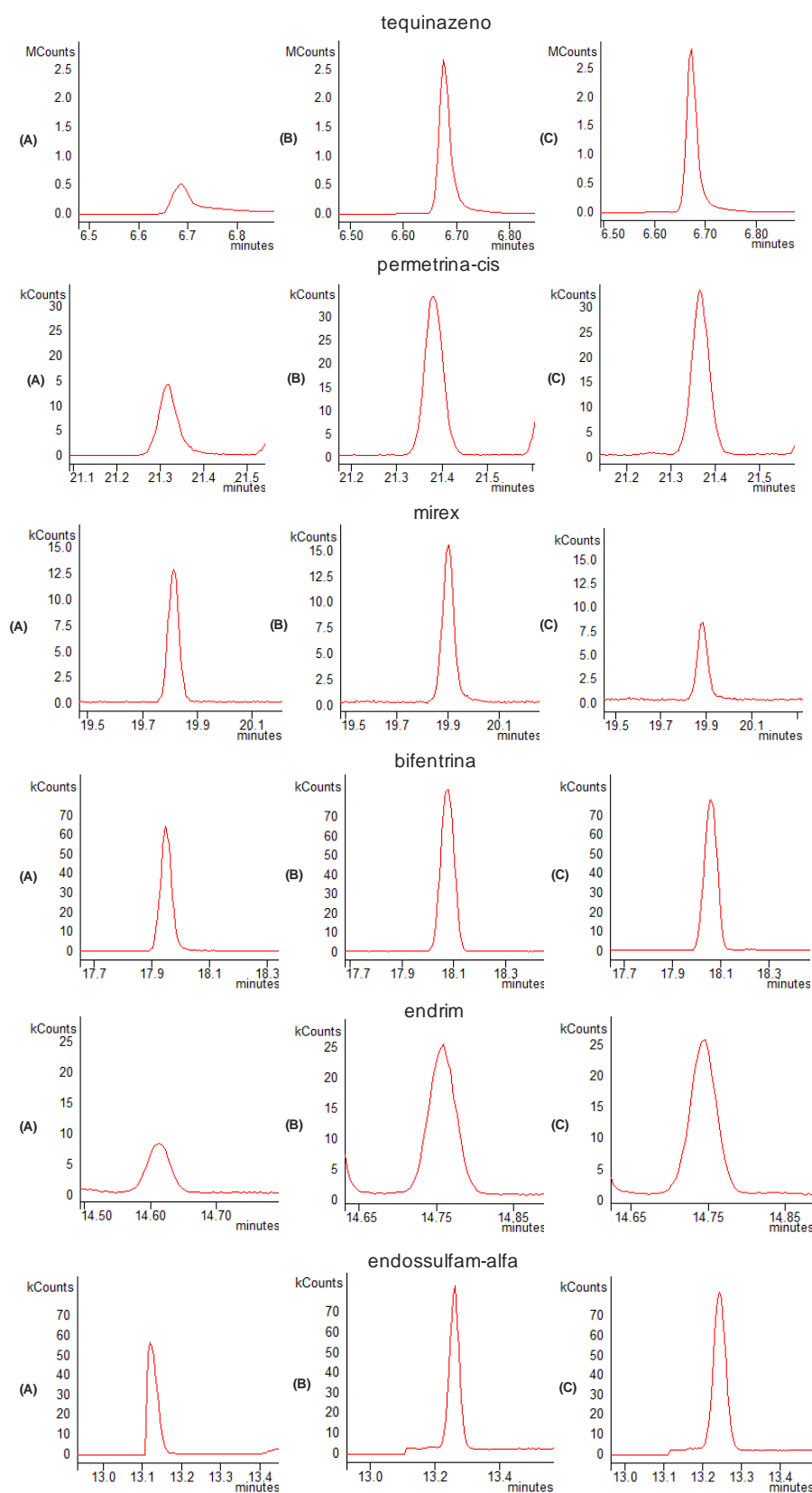


Figura 10 - Cromatogramas dos pesticidas tequinazeno, permetrina-cis, mirex, bifentrina, endrim e endossulfam-alfa: (A) solução analítica em solvente orgânico de concentração $10 \mu\text{g L}^{-1}$; (B) solução analítica em matriz de concentração $10 \mu\text{g L}^{-1}$, (C) amostra de café fortificado na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($12,5 \mu\text{g L}^{-1}$), obtidos por GC-MS (NCI-SIM).

4.3.5 Efeito matriz do extrato de café

O efeito matriz é dependente do equipamento utilizado na análise (principalmente o injetor, no caso do GC), das características físicas e químicas do analito, do tipo e quantidade de matriz e do pré-tratamento da amostra (MOL; VAN DAM; STEIJGER, 2003).

Com o objetivo de diminuir a interferência causada pelos componentes da matriz foi realizada uma etapa de purificação durante o procedimento de extração utilizando 500 mg de C18.

O efeito matriz calculado para os pesticidas em extratos de café pode ser visualizado na tabela 12. Esse parâmetro pode ser definido como o aumento (efeito matriz positivo) ou a diminuição (efeito matriz negativo) da resposta do detector para um determinado analito quando em presença de extrato da matriz.

Quando o método analítico não está livre do efeito matriz a SANCO aconselha que a confecção das curvas analíticas, para quantificação dos pesticidas, seja feita em matriz (*matrix-matched calibration*) (SANCO, 2011).

Tabela 12 - Efeito matriz percentual para os pesticidas determinados nas soluções analíticas de concentração 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 20 e 100 µg L⁻¹, por GC-MS (NCI-SIM).

Pesticida	Efeito matriz (%)						
	Solução de extrato de café (µg L ⁻¹)						
	0,2	0,5	1	2	5	20	100
Acinatrina							27319
Aldrim			192	397	450	458	203
Aletrina I - II*		2054	2392	2723	2900	2150	1935
Bifentrina	276	279	317	308	261	353	205
Captafol ¹							
Captana ¹							
Cialotrina-lambda						18738	6348
Cifenotrina I - II*						7418	2974
Ciflutrina I - IV*						48444	8719
Cipermetrina-alfa					86300	40582	10582
Clorpirifós etílico				22124	15552	15789	6582
Clorpirifós metílico		1795	1911	2046	1966	2124	1898
Clorotalonil			1221	1233	1658	1355	1996
DDD-2,4					612	530	209
DDE-2,4				71	32	116	47
DDE-p,p		106	92	90	71	133	74
DDT-p,p							283
Deltametrina ¹							
Diclorana		564	866	655	494	640	314
Diclorobenzofenona-4,4**	526	2080	2673	2645	5641	1891	2124
Dicofol ¹							
Dieldrim		53	45	39	28	85	34
Endosulfam-alfa	141	138	133	153	138	211	129
Endosulfam-beta	161	164	179	168	123	105	98
Endosulfam-sulfato						4185	1550
Endrim			891	593	430	389	252
Fempropatrina			3859	2758	2215	2581	1356
Fenitrotona						512640	53810
Fenotrina					578	293	142
Fenvalerato I - II*					17963	24430	8646
Flucitrinato I - II*				56389	27409	26403	8738
Fluvalinato I - II* ¹							
Folpete ¹							
Ftalimida	2531	4012	3290	4074	3163	3859	2120
HCH-alfa				1820	1575	1946	1300
HCH-beta					4113	1448	770
HCH-delta						38349	7446
HCH-gama (Lindano)					2720	2733	1397
Heptacloropóxido		892	517	354	191	194	117
Heptacloro				963	750	790	610
Hexaclorobenzeno	31	35	34	41	33	85	39
Mirex			163	116	66	31	22
Parationa-etílica					17533	18184	5934
Parationa-metílica ¹							
Permetrina-cis			546	509	390	495	299
Permetrina-trans			571	521	468	612	369
Protiofós	1660	1854	2218	2172	1829	2233	1177
Quintozeno	1409	1605	1814	1675	1179	1499	919
Tequinazeno	430	450	513	489	421	600	337
Teflutrina	35	36	36	41	31	81	38
Tetradifom	535	577	594	594	540	778	495
Tetrahidroftalimida** ¹							
Tetrametrina					8073	9079	3825
Transflutrina	78	81	88	92	81	137	74

¹ não identificado nas condições de análise.

*isômeros; **produtos de degradação de pesticidas.

Tendo em vista os resultados da tabela 12 pode-se observar que além do efeito matriz ser elevado para a maioria dos compostos, a matriz exerce um efeito prevalentemente positivo sobre os pesticidas, ou seja, a resposta dos analitos é aumentada na presença do extrato de café. Esse fato ocorre porque componentes co-extraídos da matriz competem com os pesticidas pelos sítios ativos do GC (injetor e coluna) e os protegem da degradação, ocasionando um aumento de sinal (FRENICH et al., 2009).

Não foi possível calcular efeito matriz para os pesticidas deltametrina, flucitrinato I-II, fluvalinato I-II e parationa metílica, porque esses pesticidas não foram detectados em nenhuma concentração das soluções analíticas preparadas em solvente orgânico, mas puderam ser detectados quando as soluções analíticas foram preparadas em matriz. Dessa forma, concluiu-se que para os compostos acima citados o efeito matriz é infinito, pois é tão grande que faz com que os pesticidas possam ser detectados somente quando em presença de extrato da matriz.

Na figura 11, estão representados dois cromatogramas totais das soluções analíticas de concentração $100 \mu\text{g L}^{-1}$, em solvente orgânico e em matriz. A maior intensidade dos picos dos pesticidas, quando em presença matriz, é realmente visível, evidenciando, o efeito matriz positivo do extrato de café.

O resumo dos parâmetros obtidos pela validação do método pode ser visto pela observação da tabela 13. Nessa tabela estão descritos 40 pesticidas e 1 produto de degradação, os quais demonstraram valores de recuperação entre 70-120%, aliado a valores de $\text{RSD} \leq 20\%$ em pelo menos umas das concentrações de fortificação, e, além disso, apresentaram coeficientes de correlação maiores que 0,90 conforme aconselhado pelo INMETRO.

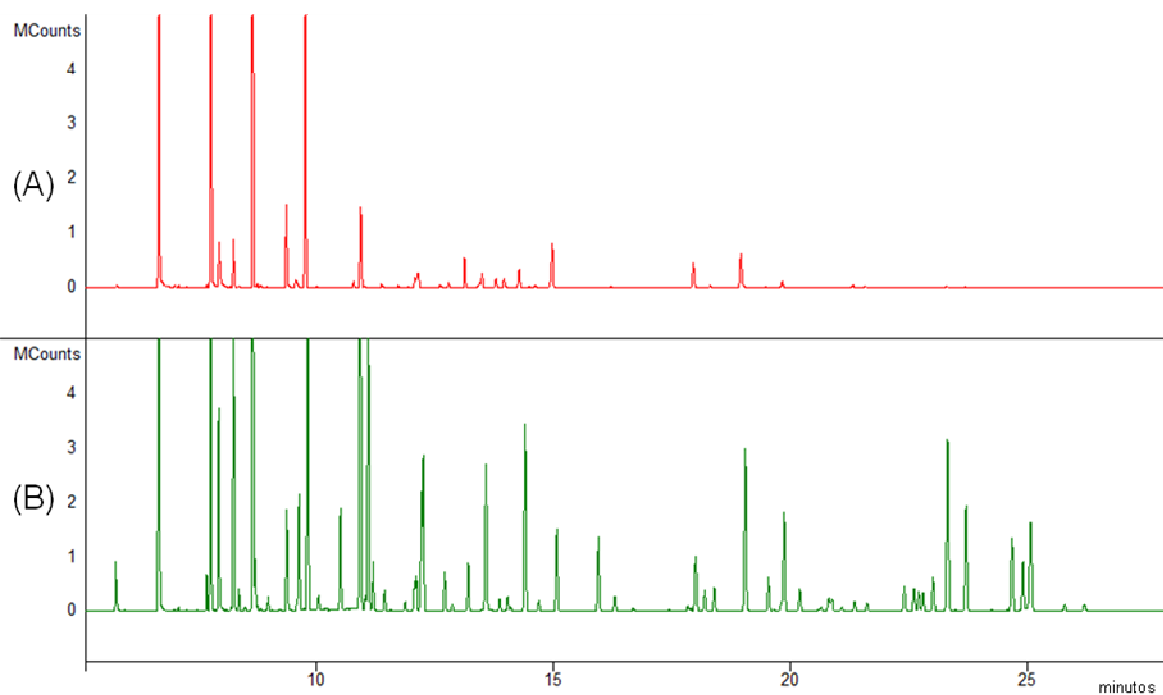


Figura 11 – Cromatogramas totais obtidos pela análise das soluções de concentração $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em solvente orgânico (A), em matriz (B), por GC-MS (NCI-SIM), mostrando o efeito matriz positivo do extrato de café.

Tabela 13 – Pesticidas que apresentaram recuperações médias percentuais entre 70-120%, RSD \leq 20% e coeficiente de correlação (r) $>$ 0,90.

Pesticida	Concentrações de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ _m validado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Soluções em matriz
	10		20		50			
	Recuperação média (%)	RSD (%)	Recuperação média (%)	RSD (%)	Recuperação média (%)	RSD (%)		r
Acrinatrina	100	7,5	104	8,8	106	7,5	10	0,9803
Aletrina I - II*	88	6,0	93	4,4	97	5,5	10	0,9884
Bifentrina	72	6,3	79	7,8	79	7,5	10	0,9838
Cialotrina-lambda	93	8,8	97	8,4	99	7,9	10	0,9904
Cifotrina I - II*	85	17,1	92	14,8	93	14,2	10	0,9884
Ciflutrina I - IV*	89	22,1	97	21,7	103	16,4	50	0,9787
Cipermetrina-alfa	85	24,0	92	23,8	97	18,6	50	0,9823
Clorpirifós etílico	92	4,9	98	3,5	98	3,9	10	0,9914
Clorpirifós metílico	92	13,2	96	14,6	102	10,4	10	0,9889
DDD-2,4	52	112,9	75	45,5	82	18,9	50	0,9833
DDE-p,p	67	12,0	70	8,5	71	6,1	20	0,9082
Deltametrina	95	24,4	103	24,2	114	18,8	50	0,9746
Diclorana	93	15,0	94	17,2	95	15,4	10	0,9899
Dieldrín	77	5,6	84	5,8	84	3,7	10	0,9679
Endosulfam-alfa	74	7,2	83	3,8	86	3,5	10	0,9818
Endosulfam-beta	89	8,0	93	6,8	95	11,4	10	0,9909
Endosulfam-sulfato	102	10,2	105	13,2	118	24,7	10	0,9853
Endrim	72	8,3	79	4,6	85	3,7	10	0,9679
Fempropatrina	85	2,7	91	3,8	93	2,8	10	0,9859
Fenitrotiona	101	22,9	107	26,1	112	17,8	50	0,9848
Fenotrina	78	1,5	83	4,7	77	4,7	10	0,9859
Fenvalerato I - II*	88	21,8	93	21,1	97	16,6	50	0,9833
Flucitrinato I - II*	97	13,7	102	13,5	106	11,0	10	0,9843
Fluvalinato I - II*	87	17,2	92	18,7	100	13,6	10	0,9731
Ftalimida**	85	20,9	93	9,9	96	15,9	20	0,9803
HCH-alfa	82	5,2	90	4,9	95	6,0	10	0,9859
HCH-beta	89	2,9	94	5,6	97	5,8	10	0,9838
HCH-delta	88	5,1	95	8,4	102	8,7	10	0,9808
HCH-gama (Lindano)	79	5,5	86	5,1	89	6,3	10	0,9695
Heptaclorepóxido	75	4,4	85	2,7	90	2,1	10	0,9813
Heptacloro	66	8,6	77	2,8	81	3,2	20	0,9471
Parationa-metilica	120	16,8	121	22,9	129	15,0	10	0,9823
Permetrina-cis	74	10,5	80	9,8	81	9,5	10	0,9869
Permetrina-trans	75	11,0	83	8,0	85	8,6	10	0,9864
Protiofós	67	2,0	75	3,1	80	2,1	20	0,9929
Quintozeno	74	10,6	81	9,1	84	8,2	10	0,9899
Tequinazeno	80	11,3	87	10,4	89	10,4	10	0,9864
Teflutrina	82	8,5	91	7,7	91	7,7	10	0,9859
Tetradifom	84	7,7	91	7,3	94	7,0	10	0,9899
Tetrametrina	92	11,1	97	10,7	102	7,9	10	0,9929
Transflutrina	85	7,0	92	4,6	95	5,6	10	0,9899

*isômeros; **produtos de degradação de pesticidas;

5 CONCLUSÕES

Considerando-se que café é uma matriz de grande complexidade e a escassez de trabalhos publicados a respeito dessa *commodity*, o mérito deste trabalho é evidente. A necessidade de métodos analíticos para verificação da conformidade dos resíduos de pesticidas com os LMR permitidos pela legislação torna-se cada vez mais necessária tendo-se em vista que o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores mundiais de café (CECAFÉ, 2011).

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método multirresidual (QuEChERS modificado) para determinação de 40 pesticidas (incluindo alguns de seus isômeros) e 1 produtos de degradação em grãos de café verde utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas no modo de ionização química negativa e monitoramento seletivo de íons.

Com o objetivo de obter-se uma amostra bem homogênea, foi preparado um *slurry* de café verde moído e água na proporção de 1:4 (café/água). Esse *slurry* possibilitou uma maior eficiência na extração dos pesticidas da matriz, além de facilitar o procedimento de pesagem. A etapa de *clean-up* mostrou-se necessária em função da grande quantidade de interferentes presentes na matriz, como por exemplo a cafeína. O adsorvente que forneceu os melhores resultados foi C18, na quantidade de 500 mg.

A validação foi realizada analisando-se amostras de café fortificadas nas concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com 6 replicatas ($n=6$) para cada concentração. Avaliou-se também, a linearidade das curvas analíticas (r), exatidão (percentual de recuperação), LOD e LOQ do instrumento e do método, precisão (RSD%) e efeito matriz (%) para cada um dos 51 pesticidas estudados, a partir das soluções analíticas preparadas em acetonitrila e em extrato “branco” de café em sete diferentes concentrações 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 20; 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Aproximadamente 76% dos compostos mostraram valores de recuperações entre 70-120% e em torno de 75% alcançaram valores de $\text{RSD} \leq 20\%$ para a fortificação de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para as fortificações de 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ os resultados foram ainda melhores. O LOQ_m foi de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para 33, 3 e 6 pesticidas, respectivamente. Cinco pesticidas não apresentaram recuperações entre 70-120% e $\text{RSD} \leq 20\%$, portanto seu LOQ_m não

pode ser determinado, e 4 pesticidas somente puderam ser detectados via seus produtos de degradação.

Mesmo com a utilização de uma etapa de purificação do extrato de café, o efeito matriz manteve-se presente para todos os pesticidas estudados. Dessa forma, para o método ser utilizado em análises de rotina, a confecção curvas analíticas deve ser feita em matriz (*matrix-matched calibration*).

Conclui-se que o método desenvolvido mostrou-se adequado para aplicação na determinação de resíduos de 40 pesticidas e 1 produto de degradação, em grãos de café verde, com o objetivo de verificar a conformidade da amostra com os limites máximos de resíduos permitidos pelas legislações européia e brasileira.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aplicação do método desenvolvido e validado no monitoramento de resíduos de pesticidas em amostras de café produzido no Brasil;
- Avaliação da utilização de outros adsorventes no procedimento de purificação do extrato de café;
- Avaliação da utilização de outros métodos de preparo de amostra, como método de Luke ou extração com acetato de etila, para a determinação de resíduos de pesticidas em café;
- Desenvolvimento e validação de método para análise de café torrado.

REFERÊNCIAS

AGROBYTE, Pragas no café. **Agrobyte**, 2011. Disponível em: <<http://www.agrobyte.com.br/index.php?pag=cafe>>. Acesso em: 29 nov. 2011.

AMÉRICO, J. Uso de agrotóxicos no Brasil deve superar recorde de 1 milhão de toneladas, **Ecodebate**, São Paulo, 7 fev. 2011. Disponível em: <<http://www.ecodebate.com.br/2011/02/07/uso-de-agrotoxicos-no-brasil-deve-superar-recorde-de-1-milhao-de-toneladas/>>. Acesso em: 12 dez. 2011.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412–431, 2003.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Agrotóxicos e Toxicologia**, 2011. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia/>>. Acesso em: 30 nov. 2011.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos: relatório de atividades de 2009**. 2010. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/especiais/2010/06/relatorio_para_anvisa.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2011.

ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction**. Huddersfield. Ed. John Wiley & Sons, Ltd., 2003.

BRASIL, Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. **Diário Oficial da República Federal do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm>. Acesso em: 16 dez. 2010.

CARNEIRO, F. F. O Brasil é o país que mais usa agrotóxicos no mundo. **Jornal Agrosoft Brasil**, 01 jul. 2010. Disponível em: <<http://www.agrosoft.org.br/agropag/214789.htm>>. Acesso em: 8 dez. 2011.

CASTRO, J. S. M.; CONFALONIERI, U. Uso de Agrotóxicos no Município de Cachoeiras de Macau (RJ). **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 473-482, 2005.

CAVERO, E. S. **Inseticidas e Acaricidas Toxicologia-Receituário Agrônomo**. Piracicaba, Ed. Livroceres, 1985. 412 p.

CECAFÉ, Exportação de café do Brasil é recorde em 12 meses. **Economia**, 2011. Disponível em: <<http://economia.ig.com.br/empresas/agronegocio/exportacao+de+cafe+do+brasil+e+recorde+em+12+meses/n1597014864028.html>>. Acesso em: 12 dez. 2011.

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

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO P. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. São Paulo, Ed. Unicamp, 1997. 279 p.

DE KROON, M. et al. Integrated sample preparation method for the analysis of 221 pesticides and 26 mycotoxins in rice samples. Part 1: Determination of 52 pesticides by GC-MS (NCI-SIM). In: 1st Latin American Pesticide Residue Workshop (LAPRW), **Anais**, Santa Maria, 2007, p. 88.

EPA, U.S. Environmental Protection Agency. **Types of Pesticides**, 2010. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>>. Acesso em: 8 dez. 2011.

EPA, U.S. Environmental Protection Agency. **Pesticide Program. Promoting Safety for America's Future**. EPA-735-R-03-001, FY 2002 Annual Report. EPA, 2002. Disponível em: <<http://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/>>. Acesso em: 8 dez 2011.

EPA, U.S. Environmental Protection Agency. **Residue Analytical Methods (RAM)**, 2011. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/methods/ramindex.htm>>. Acesso em: 1 dez. 2011.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Coffee botany and ecology**. Disponível em: <http://www.coffee-ota.org/3_1_botany.asp>. Acesso em: 29 nov. 2011a.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The JMPR practice in estimating maximum residues levels and proposing maximum residue limits**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/x5848e/X5848e07.htm>>. Acesso em: 8 dez. 2011b.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos, **Ciência & Saúde Coletiva**, 12(1):25-38, 2007.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. **Comprehensive analytical chemistry: Chromatographic-mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues**. Elsevier, 2005. p. 279-282.

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

GALETI, P. A. **Pelos Caminhos do Café**. 1^a ed. Campinas, Ed. CATI, 2004. 178 p.

GATES, P. In: University of Bristol. Mass spectrometry Resource, Collision Induced Dissociation (CID), Bristol, 2005. Disponível em: <<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/cid-fragmentation.html>>. Acesso em: 8 dez. 2011.

GILLESPIE, A. M.; WALTERS, S. M. Rapid clean-up of fat extracts for organophosphorus pesticide residue determination using C18 solid-phase extraction cartridges. **Analytica Chimica Acta**, v. 245 p. 259-265, 1991.

HAGER, J. W.; LE BLANC, J. C. Y. High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with a new quadrupole/linear ion trap instrument. **Journal of Chromatography A**, v. 1020, p. 3-9, 2003.

HERCEGOVÁ, A.; DÖMÖTÖROVÁ, M.; MATISOVÁ, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 54, 2007.

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

HUNT, D. F.; McEWEN, C. N.; HARVEY T. M. Positive and negative chemical ionization mass spectrometry using a Townsend discharge ion source. **Analytical Chemistry**, v. 47, p. 1730, 1975.

HÚŠKOVÁ, R. et al. Analysis of pesticide residues by fast gas chromatography in combination with negative chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1216, p. 6326–6334, 2009.

ICO, INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **A história do café**, 2011a. Disponível em: <http://www.ico.org/pt/coffee_storyp.asp>. Acesso em: 2 jan. 2012.

ICO, INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION, **Aspectos botânicos**, 2011b. Disponível em: <<http://www.ico.org/botanical.asp>>. Acesso em: 2 jan. 2012.

KITSON, F. G.; LARSEN, B. S.; McEWEN, C. N. **Gas Chromatography and Mass Spectrometry - A Practical Guide**, London, Academic Press, 1996, 381 p.

LARINI, L., **Toxicologia**, 3ª ed. São Paulo, Ed. Manole, 1997, 301 p.

LEANDRO, C. C.; FUSSELL, R. J.; KEELY, B. J. Determination of priority pesticides in baby foods by gas chromatography tandem quadrupole mass spectrometry, **Journal of Chromatography**, v. 1085, p. 207-212, 2005.

LEHOTAY, S. J. et al. Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of 229 Pesticide Residues in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. **Journal of AOAC**, v. 88, p. 595-614, 2005.

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

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

LESUEUR, C. et al. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. **Food Control**, v. 19, p. 906-914, 2008.

LIMA, U. A., **Matérias-Primas dos Alimentos, Parte I: Origem Vegetal, Parte II: Origem Animal**, São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda. 2010, 2402 p.

LUKE, M. A.; FROBERG, J. E.; MASUMOTO, H. T. Extraction and clean-up of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. **Journal of AOAC**, v. 56, p. 1020-1026, 1975.

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

MENDONÇA L. M. V. L. et al. Composição química de grãos crus de cultivares *decoffea arabica* L. suscetíveis e resistentes à *Hemileia vastatrix* Berg et Br. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, p. 413-419, 2007.

MILLS, P. A.; ONLEY, J. H.; GUITHER, R. A. Rapid method for chlorinated pesticide residues in non fatty foods. **Journal of AOAC**. v. 46, p. 186-191, 1963.

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

MOREIRA J. C. et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ, **Ciência & Saúde Coletiva**, 7(2):299-311, 2002.

NGUYEN, T. D. et al. A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS simple preparation method and gas chromatography mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 110, p. 207–213, 2008.

NVWA, The Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority. **Bepaling van bestrijdingsmiddelen in groente-fruit-en graanproducten m.b.v. gas chromatografie-massaspectrometrie**, CHE01-WV624, 2^a versão, Ministry of Health, Welfare and Sport, The Hague, Holanda, 2005.

OGA S.; CAMARGO M. M. A.; BATISTUZZO J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**, São Paulo, Ed. Atheneu, 2008, 677 p.

PACHECO, P. Brasil lidera o consumo mundial de agrotóxicos. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 7 de ago. 2009. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br/noticias/impresso,brasil-lidera-uso-mundial-de-agrotoxicos,414820,0.htm>>. Acesso em: 8 dez. 2011.

PERES et al. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos, **Ciência & Saúde Coletiva**, 10(Sup):27-37, 2005.

PIHLSTRÖM, T.; BLOMKVIST, G.; FRIMAN, P.; PAGARD, U.; ÖSTERDAHL, B. G. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 1773-1789, 2007.

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

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

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

ROOS, A. H. et al. Universal Extraction/Clean-up Procedure for Screening of Pesticides by Extraction with Ethyl Acetate and Size Exclusion Chromatography. **Analytica Chimica Acta**. v. 196, p. 95-102, 1987.

SANCO, **Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**, Document No. SANCO/10684, 2009.

SANCO, **Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**, Document No. SANCO/12495, 2011.

SANTOS, P. M. Comissão executiva do plano da lavoura cacaueteira (CEPLAC), **Artigo técnico: Café**, 2011. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/cafe.htm>>. Acesso em: 29 nov. 2011.

SHEN, C. et al. Determination of 17 pyrethroid residues in troublesome matrices by gas chromatography/mass spectrometry with negative chemical ionization. **Talanta**, v. 84, p. 141-147, 2011.

SHIMELIS, O. et al. Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1165, p. 18-25, 2007.

SINITOX, Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas. Casos de Intoxicação por Agrotóxicos em Geral por Unidade Federada, Segundo Circunstância Registrado em 2009. 2009. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/tab01_agro_geral_2009.pdf>. Acesso em: 5 dez. 2011.

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

THOMAZIELLO, R. A.; TOLEDO FILHO, J. A. de; OLIVEIRA, E. L. **Guia para identificação de deficiências minerais, toxidez, distúrbios fisiológicos, pragas e doenças do cafeeiro**. Campinas: Ed. CATI, 1979, 84 p.

VAN DER HOFF, G. R.; VAN ZONNEN, P. Trace analysis of pesticides by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 843, p. 301-322, 1999.

VARELI, C. S. **Desenvolvimento e validação de método para determinação de etilenotiouréia em urina empregando HPLC-UV**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

VEIGA, M. M. et al., Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 22(11):2391-2399, 2006.

VEIGA, M. M.; SILVA D. M.; VEIGA L. B. E. Análise do Risco de Contaminação Ambiental por Agrotóxicos nos Sistemas Hídricos do Município de Paty do Alferes, RJ. In: XXV ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO (ENEGEP), **Anais**, Porto Alegre, 2005, p. 4259-4264.

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

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

ZROSTLÍKOVÁ, J. et al. Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 937 p. 73-86, 2001.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Determinação da linearidade das curvas analíticas.

Tabela 1 - Preparo das soluções analíticas para avaliação da linearidade das curvas analíticas em solvente orgânico e em matriz.

Concentração de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentração da solução mistura de pesticidas ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Volume de solução mistura adicionado à solução (μL)	Massa absoluta adicionada à solução (ng)	Volume total de solução (mL)	Concentração dos pesticidas na solução ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Aliquota de volume utilizado (μL)	Volume de P.I.E. adicionado ao <i>vial</i> (μL)	Volume no <i>vial</i> antes da injeção (mL)	Concentração da solução no <i>vial</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Fator*
0,8	100	10	1	5	0,2	990	10	1	0,2	4
2	100	25	2,5	5	0,5	990	10	1	0,5	4
4	100	50	5	5	1	990	10	1	1	4
8	1000	10	10	5	2	990	10	1	2	4
20	1000	25	25	5	5	990	10	1	5	4
80	1000	100	100	5	20	990	10	1	20	4
400	1000	500	500	5	100	990	10	1	100	4

*Fator = concentração de fortificação / concentração dos pesticidas antes da injeção.

Apêndice 2 -Avaliação da exatidão do método analítico.

Tabela 2 - Preparo das amostras de café fortificadas para avaliação das recuperações.

Concentração de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentração da solução mistura de pesticida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Volume de solução mistura adicionado à solução (μL)	Massa absoluta adicionada à solução (ng)	Volume de solvente extrator (mL)	Massa de <i>slurry</i> de café (g)	Concentração dos pesticidas na solução ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Alíquota de volume utilizado (μL)	Volume de P.I.E. adicionado ao <i>vial</i> (μL)	Volume no <i>vial</i> antes da injeção (mL)	Concentração da solução no <i>vial</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Fator*
10	1000	25	25	10	10	2,5	990	10	1	2,5	4
20	1000	50	50	10	10	5	990	10	1	5	4
50	1000	125	125	10	10	12,5	990	10	1	12,5	4

*Fator = concentração de fortificação / concentração dos pesticidas antes da injeção.