



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

**DETERMINAÇÃO MUTIRRESÍDUO DE
AGROTÓXICOS EM PIMENTÃO UTILIZANDO
MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Magali Kemmerich

Santa Maria – RS, Brasil

2013

DETERMINAÇÃO MUTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM
PIMENTÃO UTILIZANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO
E UHPLC-MS/MS

Magali Kemmerich

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**

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria - RS, Brasil

2013

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

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

**DETERMINAÇÃO MUTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM
PIMENTÃO UTILIZANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO
E UHPLC-MS/MS**

elaborado por
Magali Kemmerich

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato Zanella - Orientador
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Liane Maldaner
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Osmar Damian Prestes
Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2013.

Dedico esse trabalho aos maiores incentivadores e
conselheiros, meus pais, com quem eu divido
valores, sonhos e um amor sem fim.

Esse trabalho é nosso!

Obrigada por tudo! Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella, pela orientação e pela oportunidade que recebi para participar do grupo do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), tornando-se um grande aprendizado. Obrigada pela confiança!

À Profa. Dra. Martha Bohrer Adaime, pela co-orientação e pelo apoio na realização do trabalho, além do carinho que sempre recebi. Obrigada pelo incentivo!

Ao Prof. Dr. Manoel Leonardo Martins, pela co-orientação e pelos ensinamentos durante todas as etapas deste trabalho. Obrigada pela paciência e dedicação!

Às bancas de qualificação e de defesa, Prof. Dr. Renato, Profa. Dra. Martha, Prof. Dr. Osmar e Profa. Dra. Liane, pelas sugestões e questionamentos, suas contribuições foram muito relevantes, não só para esta dissertação, mas também para meu futuro acadêmico.

Aos meus colegas, integrantes do LARP que se propuseram a me ajudar no decorrer do desenvolvimento do trabalho e também aqueles que não integram mais grupo, mas de alguma forma contribuíram para meu crescimento e aprendizado, principalmente à Débora, que esteve presente desde meu primeiro dia no laboratório.

À Tiele, mais do que uma colega, uma amiga para todas as horas, com quem tive a sorte de dividir os momentos mais angustiantes, mas também alguns dos mais alegres destes dois anos.

Aos meus demais amigos, que apesar de estarem tão longe nunca saem dos meus pensamentos e me dão a certeza de que apesar dos dias ruins, os bons valem a espera. Saudades sem fim!

Aos meus pais, a quem nunca terei palavras para agradecer o suficiente. Vocês são todo o meu apoio, são meu espelho, minha motivação, aqueles que me guardam e zelam, mesmo quando não estou olhando e deixam de viver suas próprias vidas para estarem comigo. Eu sou a pessoa mais sortuda do mundo, pois

sem o amor de vocês eu não nunca teria chegado até aqui. Muito obrigada! Eu também amo vocês!

Aos meus demais familiares, que torcem e me incentivam, vocês também moram no meu coração.

À CAPES pelo auxílio financeiro fornecido e pela bolsa de mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da UFSM, pelos ensinamentos no decorrer do curso e aos secretários do PPGQ, Ademir e Valéria, pela simpatia e atenção sempre prestados.

RESUMO

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

DETERMINAÇÃO MUTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM PIMENTÃO UTILIZANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS

Autora: Magali Kemmerich
Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella
Santa Maria, 28 de fevereiro de 2013

Nos últimos anos, o uso indiscriminado de agrotóxicos e a não adoção das boas práticas agrícolas têm sido evidenciados pelos resultados de análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos, como o pimentão, um dos recordistas brasileiros com princípios ativos proibidos ou acima dos limites recomendados. Assim, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método rápido para a determinação de 83 agrotóxicos em pimentão, utilizando método QuEChERS modificado e Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em série (UHPLC-MS/MS). Na etapa de preparo de amostra testou-se procedimentos de extração/partição, além de diferentes sorventes para a etapa de limpeza, como terra diatomácea e sorvente polimérico. Utilizou-se o planejamento fatorial 2^4 para otimização do método de extração, o qual foi constituído da extração de 10,0 g de pimentão com 10,0 mL de acetonitrila. Na etapa de partição adicionou-se 1,5 g de NaCl e 4,0 g de $MgSO_4$, seguindo-se agitação e centrifugação. Realizou-se a etapa de limpeza de 1,0 mL do extrato com 40,0 mg de PSA e 150,0 mg de $MgSO_4$, seguido de agitação e centrifugação. O extrato foi filtrado, diluído e analisado por UHPLC-MS/MS. A maioria dos compostos apresentou faixa linear ($r^2 \geq 0,99$). O efeito matriz foi compensado utilizando-se curvas analíticas preparadas no extrato “branco” da matriz. A exatidão do método foi verificada com ensaios de recuperação em quatro níveis de concentração, obtendo-se valores entre 70,0 e 120,0% para a maioria dos compostos avaliados. Valores de LOD_m e LOQ_m foram de 3 ou $7,5 \mu g kg^{-1}$ e 10 ou $25 \mu g kg^{-1}$, respectivamente. Valores de RSD inferiores a 20% garantiram a boa precisão do método. A aplicação do método foi realizada em 20 amostras de pimentão, nas quais resíduos de acetamiprido, azoxistrobina, boscalida, carbendazim, clorpirifós etílico, clotianidina, difenoconazol, fempropatrina, piraclostrobina e pirimetanil foram quantificados, em concentrações que variaram de 10 a $294 \mu g kg^{-1}$. O método QuEChERS modificado proposto para a determinação de resíduos de 81 dos 83 agrotóxicos em pimentão utilizando UHPLC-MS/MS mostrou ser eficaz, podendo ser aplicado em análises de rotina.

Palavras Chave: QuEChERS, UHPLC-MS/MS, pimentão, agrotóxicos

ABSTRACT

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

MULTIRESIDUE DETERMINATION OF PESTICIDES IN SWEET PEPPER BY MODIFIED QuEChERS METHOD AND UHPLC-MS/MS

Author: Magali Kemmerich
Advisor: Prof. Dr. Renato Zanella
Santa Maria, 28th February, 2013

In recent years, the indiscriminate use of pesticides and non-adoption of good agricultural practices have been evidenced by the results of analysis of pesticide residues in food, such as sweet pepper, one of Brazilian record holders with active ingredients that are banned or above the recommended limits. Thus, the present study aimed to develop and validate a rapid method for the determination of 83 pesticides in sweet pepper using modified QuEChERS method and Ultra-high Performance Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS). In the sample preparation extraction/partition procedures, and different sorbents for clean-up were tested, such as diatomaceous earth and polymeric sorbent. It was used the 2⁴ factorial design for optimization of the method of extraction, which consisted of the extraction of 10.0 g sweet pepper with 10.0 mL of acetonitrile. In the partition step 1.5 g of NaCl, 4.0 g MgSO₄ were added, carrying out shaking and centrifugation. It was carried out the clean-up step of 1.0 ml of extract with 40.0 mg of PSA and 150.0 mg of MgSO₄, followed by shaking and centrifugation. The extract was filtered, diluted and analyzed by UHPLC-MS/MS. Most compounds showed linear range ($r^2 \geq 0.99$). The matrix effect was compensated by using analytical curves prepared in 'blank' matrix-matched. The accuracy of the method was verified by testing recovery at four concentration levels, yielding values between 70.0 and 120.0% for most compounds evaluated. Values of LOD_m and LOQ_m were 3 or 7.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 10 or 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. RSD values lower than 20% ensured good precision of the method. The method was performed on 20 samples of sweet pepper, in which residues of acetamiprid, azoxystrobin, boscalid, carbendazim, chlorpyrifos ethyl, clothianidin, difenoconazole, fenpropathrin, pyraclostrobin and pyrimethanil were quantified in concentrations ranging from 10 to 294 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The proposed modified QuEChERS method for the determination of 81 from 83 pesticide residues in sweet pepper using UHPLC-MS/MS shown to be effective and can be applied in routine analysis.

Keywords: QuEChERS, UHPLC-MS/MS, sweet pepper, pesticides

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Uma das primeiras imagens publicadas de <i>Capsicum</i> , elaborada pelo botânico alemão Leonhart Fuchs, em 1543.	20
Figura 2 –	A) Estrutura da Piperina; B) Estrutura da Capsaicina.	21
Figura 3 –	Distribuição dos maiores produtores de pimentões no mundo.....	22
Figura 4 –	Esquema da fonte de ionização ESI.	36
Figura 5 –	Esquema da fonte de ionização APCI.....	37
Figura 6 –	Esquema da fonte de ionização APPI.....	38
Figura 7 –	Esquema do analisador de massas, tipo Triplo Quadrupolo (TQ).....	39
Figura 8 –	Fluxograma dos métodos QuEChERS original, acetato e citrato.	43
Figura 9 –	Cromatogramas de íons totais obtidos por UHPLC-MS/MS, a partir de soluções preparadas em acetonitrila (A) e no extrato da matriz de pimentão (B), na concentração de 20 µg L ⁻¹	70
Figura 10 –	Percentual de compostos que apresentaram recuperações médias entre 70 e 120% e RSD ≤ 20% obtidos para os testes de extração....	71
Figura 11 –	Percentual de compostos que apresentaram recuperações médias entre 70 e 120% e RSD ≤ 20% obtidos para os testes de limpeza.	72
Figura 12 –	Gráfico dos efeitos de cada variável: (1) NaCl, (2) Terra diatomácea A, (3) PSA e (4) Oasis HLB [®]	76
Figura 13 –	Superfícies de resposta geradas pelo planejamento 2 ⁴ , para otimização do método de extração de agrotóxicos em pimentão.....	77
Figura 14 –	Superfície de resposta gerada pelo planejamento 2 ⁴ , para o máximo de PSA (40,0 mg) e o mínimo de Oasis HLB [®] (0,0 mg).	78
Figura 15 –	Representação do método QuEChERS modificado utilizado para extração dos agrotóxicos nas amostras de pimentão.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição de nutrientes em 100 g de pimentão fresco.	23
Tabela 2 –	Produtos registrados e indicados para a cultura de pimentão.....	26
Tabela 3 –	Culturas analisadas nos programas de monitoramento PARA e PNCRC, de 2001 a 2010, como percentual de amostras positivas e irregulares.	30
Tabela 4 –	Tabela de agrotóxicos monitorados pelo PARA e PNCRC com os LMRs para a cultura de pimentão pelo Codex e União Europeia.	31
Tabela 5 –	Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico e fórmula molecular.	57
Tabela 6 –	Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de agrotóxicos em pimentão no sistema UHPLC-MS/MS.	60
Tabela 7 –	Relação dos testes preliminares realizados para análise dos compostos selecionados.	62
Tabela 8 –	Agrotóxicos analisados por UHPLC-MS/MS, utilizando o modo de ionização ESI (+), no modo de aquisição MRM com seus respectivos tempos de retenção (t_R), íons precursores e produtos para a quantificação e confirmação.....	67
Tabela 9 –	Ensaio gerados pelo planejamento fatorial 2^4 e resultados de compostos (%) com recuperação entre 70-120%, com as variáveis (1) NaCl, (2) Terra diatomácea A, (3) PSA e (4) Oasis HLB®.....	75
Tabela 10 –	Valores da faixa linear, coeficientes de determinação (r^2) das curvas analíticas em solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz (pimentão) e equação do modelo para a curva na matriz.	81
Tabela 11 –	Efeito matriz dos agrotóxicos avaliados no sistema de UHPLC-MS/MS, a partir de soluções preparadas em acetonitrila e na matriz de pimentão.	84
Tabela 12 –	Valores de limite de detecção (LOD_i e LOD_m) e quantificação (LOQ_i e LOQ_m) para cada agrotóxico na matriz de pimentão.....	87
Tabela 13 –	Percentuais de recuperação e RSD_r para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos em pimentão.....	89
Tabela 14 –	Percentuais de recuperação e RSD_{pi} do método de extração de agrotóxicos em pimentão, correspondente a precisão intermediária. .	92
Tabela 15 –	Resultados da análise das amostras de pimentão, através do método desenvolvido e validado neste trabalho.	95

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	– Ionização Química à Pressão Atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
APPI	– Fotoionização à Pressão Atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Photoionization</i>
BEH	– Sílica híbrida, do inglês <i>Ethylene Bridged Hybrid</i>
CI	– Ionização Química, do inglês <i>Chemical Ionization</i>
CID	– Dissociação Induzida por Colisão, do inglês <i>Collision-Induced Dissociation</i>
CV	– Coeficiente de Variação
DAD	– Detector por Arranjo de Diodos, do inglês <i>Diode Array Detector</i>
DC	– Corrente Direta, do inglês <i>Direct Current</i>
d. i.	– Diâmetro interno
d. p.	– Diâmetro de partícula
d-SPE	– Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês <i>Dispersive Solid Phase Extraction</i>
ECD	– Detector por Captura de Elétrons, do inglês <i>Electron Capture Detector</i>
EI	– Ionização por Elétrons, do inglês <i>Electron Ionization</i>
ESI	– Ionização por Eletronebulização, do inglês <i>Electrospray Ionization</i>
FD	– Detector de Fluorescência, do inglês <i>Fluorescence Detector</i>
FE	– Fase Estacionária
FID	– Detector por Ionização em Chama, do inglês <i>Flame Ionization Detector</i>
FM	– Fase Móvel
GCB	– Carvão grafiteado, do inglês <i>Graphitized Carbon Black</i>
GC-MS	– Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês <i>Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>

GC-MS/MS	– Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em série, do inglês <i>Gas Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry</i>
HAc	– Ácido acético
HCl	– Ácido clorídrico
HPLC	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IDA	– Ingestão Diária Aceitável
INMETRO	– Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUPAC	– União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LARP	– Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas
LC-MS/MS	– Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em série, do inglês <i>Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry</i>
LMR	– Limite Máximo de Resíduo
LOD	– Limite de Detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>
LOQ	– Limite de Quantificação, do inglês <i>Limit of Quantification</i>
m/z	– Razão massa carga
MAE	– Extração Assistida por Microondas, do inglês <i>Microwave Assisted Extraction</i>
MAPA	– Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeCN	– Acetonitrila
MgSO ₄	– Sulfato de magnésio anidro
MS	– Espectrometria de Massas, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	– Espectrometria de Massas em série
MSPD	– Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês <i>Matrix Solid Phase Dispersion</i>
NaAc	– Acetato de sódio anidro
NaCl	– Cloreto de sódio
NPD	– Detector de Nitrogênio e Fósforo, do inglês <i>Nitrogen Phosphorus Detector</i>
OMC	– Organização Mundial do Comércio

p.a.	– Grau pró-análise
pH	– Potencial Hidrogeniônico
PI	– Padrão Interno
PLE	– Extração Líquida Pressurizada, do inglês <i>Pressurised-Liquid Extraction</i>
PNCRC	– Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PSA	– Amina Primária Secundária, do inglês <i>Primary Secondary Amine</i>
q	– Segundo quadrupolo ou cela de colisão
Q1 ou MS1	– Primeiro quadrupolo
Q3 ou MS3	– Terceiro quadrupolo
QuEChERS	– Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês <i>Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe</i>
r	– Coeficiente de Correlação
r ²	– Coeficiente de Determinação
RF	– Rádio Frequência
RSD	– Desvio Padrão Relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
RSD _{pi}	– Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária
RSD _r	– Desvio Padrão Relativo para Repetitividade
RSM	– Metodologia de Superfície de Resposta, do inglês <i>Responde Surface Methodology</i>
SANCO	– Saúde e Proteção do Consumidor, do francês <i>Santé et protection des consommateurs</i>
SBSE	– Extração sortiva em barra de agitação, do inglês <i>Stir-Bar Sorptive Extraction</i>
SIM	– Monitoramento do Íon Selecionado, do inglês <i>Selected Ion Monitoring</i>
SPE	– Extração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>
SPME	– Microextração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Micro Extraction</i>
SRM	– Monitoramento Seletivo de Reações, do inglês <i>Selected Reaction Monitoring</i>
TCD	– Detector por Condutividade Térmica, do inglês <i>Thermal Conductivity Detector</i>
TIC	– Cromatograma do Íon Total, do inglês <i>Total Ion Chromatogram</i>

TPP	– Trifenilfosfato
TQ	– Triplo Quadrupolo
t_R	– Tempo de retenção
UE	– União Européia
UFMS	– Universidade Federal de Santa Maria
UHPLC	– Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, do inglês <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
USE	– Extração Ultrassônica, do inglês <i>Ultrasonic Extraction</i>
UV	– Ultravioleta
UV-vis	– Detector de Ultravioleta Visível

LISTA DE ANEXOS

Anexo A –	Fórmulas estruturais dos agrotóxicos em estudo nesse trabalho.....	109
Anexo B –	Estruturas dos solventes utilizados para limpeza do extrato.....	115
Anexo C –	Cromatogramas UHPLC-MS/MS, no modo SRM, a partir de solução preparada no extrato “branco” de pimentão, na concentração de 20 µg L ⁻¹	116

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	Pimentão	20
2.1.1	Composição e usos	23
2.1.2	Cultura do pimentão	25
2.2	Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos	27
2.3	Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos no Brasil....	28
2.4	Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos	33
2.4.1	Métodos cromatográficos para determinação de resíduos de agrotóxicos....	33
2.4.2	Cromatografia acoplada à Espectrometria de Massas para determinação de resíduos de agrotóxicos.....	35
2.4.3	Preparo de amostra para determinação de resíduos de agrotóxicos	40
2.5	Aplicação do Método QuEChERS e Técnicas Cromatográficas na Determinação de Agrotóxicos em Pimentão.....	45
2.6	Planejamento Fatorial	47
2.7	Validação.....	49
2.7.1	Seletividade.....	49
2.7.2	Curva Analítica e Faixa Linear	50
2.7.3	Efeito Matriz	51
2.7.4	Limites de Detecção e Quantificação	51
2.7.5	Precisão.....	52
2.7.6	Exatidão.....	53
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
3.1	Instrumentação.....	54
3.2	Reagentes, solventes e demais materiais utilizados.....	55
3.3	Processamento da Amostra	56
3.4	Seleção do Padrão Interno e do Padrão de Controle (ou substituição) .	56
3.5	Preparo das soluções analíticas dos compostos selecionados	57
3.6	Otimização do Sistema Cromatográfico UHPLC-MS/MS para a Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Pimentão.....	59
3.6.1	Escolha da Fase Móvel	60
3.6.2	Condições utilizadas no sistema UHPLC-MS/MS	60
3.7	Otimização do Método QuEChERS Modificado para a Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Pimentão	61
3.7.1	Testes preliminares	61
3.7.2	Planejamento Fatorial.....	63
3.8	Validação do Método QuEChERS Modificado para a Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Pimentão	63

3.8.1	Seletividade	63
3.8.2	Curva Analítica e Faixa Linear.....	64
3.8.3	Efeito Matriz	64
3.8.4	Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ).....	65
3.8.5	Ensaio de Recuperação para Avaliação da Exatidão.....	65
3.8.6	Precisão (repetitividade) e Precisão Intermediária	66
3.9	Aplicação do Método	66
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	67
4.1	Otimização do Sistema Cromatográfico UHPLC-MS/MS para a Determinação de Agrotóxicos em Pimentão	67
4.2	Otimização do Método QuEChERS para a Extração de Agrotóxicos em Pimentão.....	71
4.3	Planejamento Fatorial	74
4.4	Validação do Método QuEChERS Modificado Otimizado	79
4.4.1	Seletividade e Análise de Solventes e Reagentes	80
4.4.2	Curva Analítica e Faixa Linear.....	80
4.4.3	Efeito Matriz	83
4.4.4	Determinação dos Valores de LOD e LOQ	86
4.4.5	Exatidão (Ensaio de Recuperação) e Precisão (Repetitividade).....	89
4.4.6	Precisão Intermediária.....	91
4.5	Aplicação do Método	94
5	CONCLUSÕES	96
6	ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS	98
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	99
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
	ANEXOS.....	109

1 INTRODUÇÃO

É grande a importância das pimentas e pimentões para o Brasil, por ser o centro de diversidade do gênero *Capsicum* no mundo. Apesar de ser um setor ainda pouco explorado no país, sua produção ocorre praticamente em todas as regiões, onde o aumento da área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias, tem tornado o agronegócio nesta área um dos mais importantes do país (REIFSCHNEIDER; RIBEIRO, 2004).

Entretanto, o atual modelo de desenvolvimento agrícola, voltado para a alta produção, tem gerado grandes impactos. Nos últimos três anos, o Brasil ocupa o primeiro lugar no mundo em consumo de agrotóxicos e os impactos à saúde pública são amplos, pois atingem vastos territórios e envolvem diferentes grupos populacionais como trabalhadores, moradores do entorno de fábricas e fazendas, além dos consumidores de alimentos contaminados (CARNEIRO, 2012).

Uma vez empregados, os agrotóxicos deixam resíduos, às vezes inalterados (em sua forma química original) e, muitas vezes, sob a forma de produtos degradados. Assim, o estabelecimento e a regulamentação de Limites Máximos de Resíduos (LMR) em alimentos, por agências governamentais de diversos países, têm se tornado mais frequentes e, visam garantir a segurança do consumidor e a regulamentação do comércio externo (FERMAM; ANTUNES, 2009).

No Brasil, o responsável pelo estabelecimento de LMR das culturas é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Além desta, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através de seu programa de monitoramento, vêm apresentando nos últimos anos um panorama nacional sobre a presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos que estão na mesa do consumidor brasileiro.

Segundo análise de amostras de 22 culturas de frutas e hortaliças, coletadas em todas as 26 Unidades Federadas do Brasil nos últimos 10 anos, resíduos de agrotóxicos foram encontrados em 48% das amostras e 13,2% destas com alguma irregularidade, na maioria dos casos apresentava um ou mais ingredientes ativos não autorizados. Ainda, as culturas com a maior porcentagem de amostras positivas foram maçã, mamão, pimentão e morango (JARDIM; CALDAS, 2012).

Desta forma, há uma necessidade crescente no desenvolvimento de métodos de análise multirresíduo para determinação de resíduos de agrotóxicos em

alimentos, que produzam resultados confiáveis e que atendam aos limites estabelecidos pela legislação.

Com esta finalidade, o método de preparo de amostra multirresíduo QuEChERS (do inglês **Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged** e **Safe**) foi desenvolvido para a extração de agrotóxicos em frutas e hortaliças, apresentado por seus autores como sendo um método rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Entretanto, a otimização de um método pode ser muitas vezes delongada, uma vez que um dos maiores problemas do analista é determinar a influência das variáveis do seu sistema ou pelo menos obter uma aproximação satisfatória para ela. Assim, a utilização de planejamentos experimentais pode acelerar esta etapa e levar a conclusões mais consistentes (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Além das técnicas de preparo de amostra, o avanço na área cromatográfica com a utilização da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC) e, aliado a este fator, seu acoplamento com a Espectrometria de Massas em Série (MS/MS), tem possibilitado análises mais rápidas e com maior resolução, podendo-se atingir limites mais baixos de resíduos nas amostras, além de diminuir a geração de resíduos, atendendo à Química Verde.

O objetivo de qualquer medida analítica é a obtenção de dados consistentes, confiáveis e precisos, neste sentido, a validação de métodos analíticos desempenha um papel importante e deve ser realizado pelo analista que deseja provar que o método analítico desenvolvido é aceitável para a sua finalidade (RAMBLA-ALEGRE *et al.*, 2012).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método para a determinação de 84 agrotóxicos em pimentão, através do uso do método QuEChERS modificado e UHPLC-MS/MS. Como objetivos específicos (I) testar as melhores condições de extração/partição e limpeza do extrato e (II) realizar o planejamento fatorial 2^4 para otimizar o método de extração QuEChERS modificado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pimentão

A pimenta era conhecida na Grécia e em Roma por volta do século V a. C. e naquela época era mais usada para disfarçar o gosto da comida podre ou rançosa e provavelmente ajudava a desacelerar o avanço da deterioração (LE COUTEUR & BURRESON, 2006).

No século XV, o monopólio veneziano era tão completo e as margens de lucro tão grandes que outras nações começaram a considerar rotas alternativas para a Índia, iniciando a Era dos Descobrimentos, impulsionada em grande parte pela demanda de pimenta-do-reino, *Piper nigrum*. O ingrediente ativo que tanto interessava os consumidores da época era a piperina, um composto de fórmula química $C_{17}H_{19}O_3N$ (LE COUTEUR & BURRESON, 2006).

Foi assim que navegadores de Portugal e Espanha descobriram outras plantas, cultivadas pelos nativos da região, entre elas a pimenta vermelha e os pimentões, irmãos não picantes das pimentas (Figura 1). Hoje, estas culturas estão espalhadas por todo o território mundial, sendo o pimentão considerado uma das dez hortaliças mais importantes no mundo (REIFSCHNEIDER, 2000).



Figura 1 - Uma das primeiras imagens publicadas de *Capsicum*, elaborada pelo botânico alemão Leonhart Fuchs, em 1543.

Fonte: REIFSCHNEIDER; HENZ & RIBEIRO, 2009.

Diferentemente da pimenta-do-reino, a *Capsicum annuum*, é uma espécie que inclui os pimentões, a páprica, pimenta-da-jamaica e muitas outras. Em todas o composto químico responsável pelo sabor pungente e a ardência é a capsaicina, que tem fórmula química $C_{18}H_{27}O_3N$ e uma estrutura que apresenta semelhanças com a piperina, como pode ser observado na Figura 2. Ambas as moléculas têm em sua estrutura um grupo amida e um único anel aromático, sendo atribuída a sensação “picante” à forma das moléculas (LE COUTEUR & BURRESON, 2006).

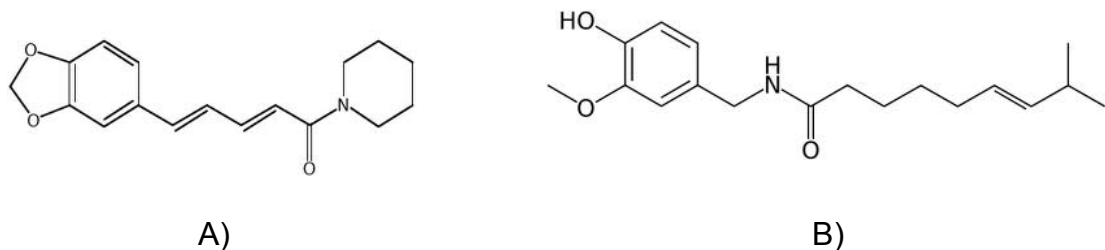


Figura 2 - A) Estrutura da Piperina; B) Estrutura da Capsaicina.

Ao ingerirmos alimentos que contém piperina ou capsaicina, a sensação picante que sentimos não é realmente um sabor, mas uma resposta de nossos receptores nervosos de dor a um estímulo químico. Quanto mais forte a pimenta, maior a dor, e, em consequência, maiores os traços de endorfina produzidos e maior o prazer final (LE COUTEUR & BURRESON, 2006).

Os registros mais antigos do consumo de pimentões datam de aproximadamente 9 mil anos, no México. Pode-se dizer que em 500 anos de história, com Colombo e Cabral, os *Capsicum* se estabeleceram em todo o mundo, em usos como geléias, remédios, molhos, temperos pratos quentes e frios (REIFSCHNEIDER; HENZ & RIBEIRO, 2009).

Capsicum annuum var. annuum é a variedade mais conhecida e difundida no mundo. Os tipos mais comuns são o pimentão, a pimenta americana (ou doce) e o jalapeño (EMBRAPA, 2012).

O Brasil é um importante centro secundário de espécies domesticadas, onde se observa considerável diversidade de *C. annuum var. annuum*. Além disso, o país contempla o maior número de espécies silvestres do gênero. A riqueza da diversidade das espécies brasileiras *Capsicum* ainda não foi utilizada em benefício da sociedade, mas as expectativas são promissoras (REIFSCHNEIDER, 2000).

Segundo dados da FAO (2011), o maior produtor de pimentões é hoje a China, que domina de longe o comércio, com 62% da produção mundial (aproximadamente 15 milhões de toneladas em 2011), conforme pode ser observado na Figura 3, que mostra a distribuição dos 10 maiores produtores mundiais.

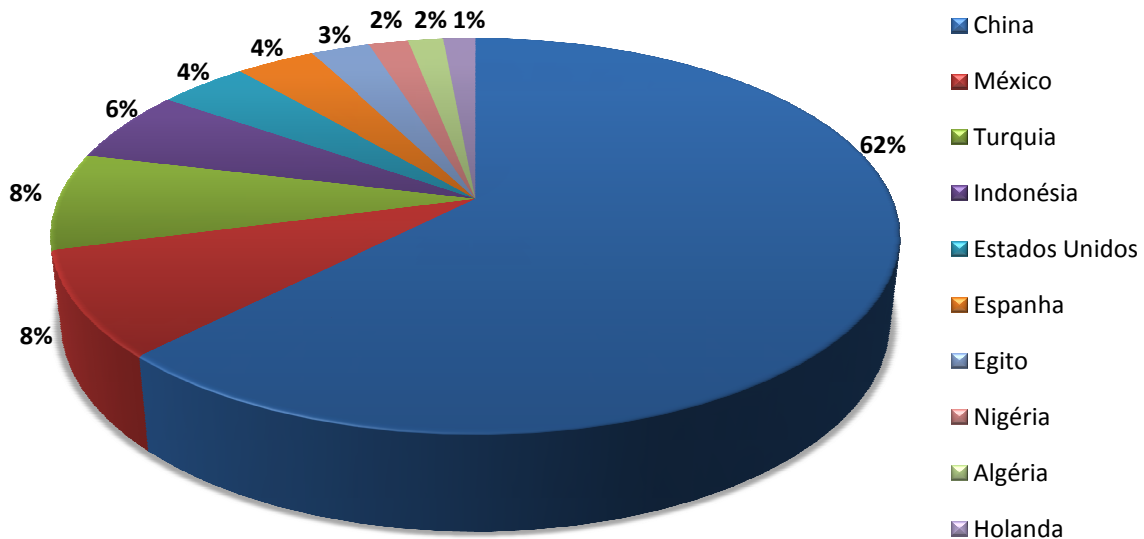


Figura 3 - Distribuição dos maiores produtores de pimentões no mundo.

Fonte: FAO, 2011.

Dados sobre a produção e a área cultivada no Brasil são escassos, mas a região sudeste é a maior produtora, tendo destaque o estado de São Paulo, outros dos principais estados produtores no país são Minas Gerais, Goiás, Ceará e Rio Grande do Sul. Os produtos destinam-se ao consumo direto do fruto fresco ou como condimentos. Entretanto, também existem no país indústrias de médio e grande porte que utilizam estes produtos para obtenção de processados (CRISÓSTOMO, 2006; REIFSCHNEIDER, 2000).

No mercado brasileiro, além de cultivares de frutos verdes (quadrados ou cônicos) e vermelhos quando maduros, existe no mercado um grande número de híbridos de pimentão coloridos, do marfim ao púrpura, passando pelo creme, amarelo e laranja. A área cultivada desses híbridos ainda é pequena, e as sementes são importadas, correspondem a 1% do volume de sementes comercializadas no Brasil, sendo normalmente cultivadas em estufa. Pimentões para usos especiais, como páprica, têm crescido de importância (REIFSCHNEIDER, 2000).

A estimativa é de que a área plantada de pimentas e pimentões no Brasil seja, anualmente, de 13 mil hectares e produção próxima a 290 mil toneladas de

frutos, sendo assim, uma atividade de alta significância para o setor olerícola no Brasil (SOUSA *et al.*, 2011).

Nas últimas três décadas, os setores público e privado brasileiro têm investido fortemente no aumento de conhecimento de *Capsicum* e criado novas oportunidades de mercado e produtos. A biodiversidade disponível começa a ser mais explorada e a ocupação de nichos de mercado estão em andamento (REIFSCHNEIDER; HENZ & RIBEIRO, 2009).

2.1.1 Composição e usos

Além dos nutrientes encontrados em quantidades variáveis nas pimentas e pimentões, que suprem a necessidade de produção de energia, há a presença dos componentes ditos funcionais, que respondem por outras propriedades e aplicações: os cetocarotenóides, pelos corantes vermelhos da páprica; a capsaicina, pela pungência das pimentas picantes; as pirazinas, pelo aroma característico e, também três antioxidantes naturais: a vitamina C, os carotenóides e a vitamina E (REIFSCHNEIDER, 2000).

Carboidratos são componentes predominantes nos frutos de *Capsicum*; a frutose é o principal açúcar. Todas as variedades possuem baixa caloria. O conteúdo de cinzas totais de pimentas e pimentões é o mesmo frequentemente encontrado em outros frutos, sendo a maioria solúvel em água, o que indica ser uma fonte de minerais, dentre os quais sobressaem potássio, fósforo, magnésio e cálcio. Dentre os ácidos graxos, os mais comuns são os ácidos insaturados, linoléico e linolênico, nutricionalmente mais favoráveis, pois são essenciais à nossa dieta. São, ainda, fontes importantes de fibras, elementos essenciais no processo de digestão, que previnem problemas intestinais. Na Tabela 1, pode-se observar a composição de nutrientes para 100 g de pimentão fresco (REIFSCHNEIDER, 2000).

Tabela 1 - Composição de nutrientes em 100 g de pimentão fresco.

Nutriente	Valor
Água	93,89 g
Calorias	20 kcal
Proteína	0,86 g
Lipídios (total)	0,17 g
Carboidratos	4,64 g

(continuação)

Nutriente	Valor
Fibras	1,7 g
Açúcar (total)	2,4 g
Cálcio (Ca)	10 mg
Ferro (Fe)	0,34 mg
Magnésio (Mg)	10 mg
Fósforo (P)	20 mg
Potássio (K)	175 mg
Sódio (Na)	3 mg
Zinco (Zn)	0,13 mg
Vitamina C (ácido ascórbico total)	80,4 mg
Vitamina E (alfa-tocofenol)	0,37 mg
Vitamina K	7,4 µg
Ácidos graxos saturados	58 mg
Ácidos graxos monoinsaturados	8 mg
Ácidos graxos poliinsaturados	62 mg

Fonte: USDA, 2012.

Quanto ao seu uso, sabe-se que as pimentas e os pimentões têm uma grande participação no mercado de condimentos, temperos e conservas, embora não haja dados estatísticos. Na indústria é cada vez maior o uso do pó do pimentão maduro (páprica), principalmente como corante (obtido da polpa do pimentão vermelho) ou flavorizante (obtido dos frutos verdes) de diversos produtos processados (REIFSCHNEIDER, 2000).

Toda a aplicabilidade dos pimentões na saúde humana é um reconhecimento dos muitos usos da espécie, não só em épocas antigas, como nos dias atuais. Na alopátia é usada, por exemplo, na fabricação de creme analgésico para aliviar dores musculares, pois a capsaicina torna a pele sensível depois do ardor. Além disso, há inúmeras citações sobre seu emprego para alívio de dor de dente, tosse, aftas, como remédio para tuberculose, hemorróida, enjôo, diarreia, dor de ouvido, problemas do aparelho digestivo e, ainda, como tratamento do escorbuto, por ser rica em vitamina C (REIFSCHNEIDER; HENZ & RIBEIRO, 2009).

Existem também, estudos no campo da psicologia sobre o efeito do uso da capsaicina, pois há indícios de que ela age sobre os sentidos através de uma descarga de endorfina do cérebro para o sistema nervoso central (REIFSCHNEIDER, 2000).

2.1.2 Cultura do pimentão

O pimentão pertence à família das Solanáceas e é uma planta perene, porém cultivado como cultura anual e necessitando de temperatura moderadamente elevada para seu cultivo (FILGUEIRA, 2003).

Possui formato quadrado e cônico e, se encontra geralmente pendente. A coloração dos frutos pode ser verde, amarelo esverdeado e verde amarelado (imaturos); vermelho, amarelo, alaranjado, marfim, roxo, marrom escuro (maduros). Quanto à pungência, é considerado doce e de aroma baixo (EMBRAPA, 2012).

O terreno ideal é aquele com solos profundos, com boa drenagem e pH entre 5,5 a 6,8. Os pimentões exigem suprimento regular de água durante todo o ciclo. A deficiência de água, especialmente durante os estágios de floração e pegamento de frutos, reduz a produtividade em decorrência da queda de flores e abortamento de frutos e provoca o aparecimento de podridão apical nos frutos (EMBRAPA, 2012).

As pimentas podem ser atacadas por várias doenças causadas por bactérias, fungos, nematóides e vírus. Também existem os distúrbios fisiológicos, que às vezes se confundem com as doenças, que podem ser causados por excesso ou deficiência de nutrientes, falta ou excesso de água, presença de insetos ou ácaros ou fitotoxicidade provocada por agrotóxicos. Quanto às pragas, vários artrópodes, principalmente insetos e ácaros, estão associados com *Capsicum* desde a sementeira até a colheita dos frutos (LOPES & ÁVILA, 2003).

A forma mais eficiente e econômica de prevenir os danos causados por estes distúrbios é através do monitoramento da cultura, uma vez que sua ocorrência depende da época de plantio, das condições de solo, do tipo de irrigação, da adubação, entre outros fatores. A aplicação de inseticidas e acaricidas é, na maioria das vezes, desnecessária, antieconômica e danosa aos homens, animais e meio ambiente (LOPES & ÁVILA, 2003).

Entretanto, se registrado o agrotóxico, recomenda-se seu uso na fase inicial da cultura e somente intensificar as pulverizações durante os períodos imediatamente anteriores e posteriores ao transplante, quando as plantas são mais susceptíveis a viroses (LOPES & ÁVILA, 2003).

O uso correto e seguro dos produtos registrados contribui para evitar o uso inadequado de agrotóxicos, que poderia acarretar no desenvolvimento de resistência de pragas nas lavouras e resíduos de agrotóxicos em produtos vegetais acima dos

Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos. Na Tabela 2, podemos verificar quais são os produtos recomendados para a cultura do pimentão, segundo o MAPA (AGROFIT, 2012).

Tabela 2 - Produtos registrados no MAPA e indicados para a cultura de pimentão.

Nome Comum	Grupo Químico	Classe (s)
Abamectina	Avermectina	Acaricida/Inseticida
Acefato	Organofosforado	Acaricida/Inseticida
Acefato de (E, Z, Z)-4,7,10-tridecatrienila	Acetato insaturado	Feromônio sintético
Acefato de (E4, Z7)-4,7-tridecatrienila	Acetato insaturado	Feromônio sintético
Azadiractina	Tetranortriterpenóide	Inseticida
Azoxistrobina	Estrobilurina	Fungicida
Clomazona	Isoxazolidinona	Herbicida
Clorfenapir	Análogo de pirazol	Acaricida/Inseticida
Clorotalonil	Isoflalonitrila	Fungicida
Deltametrina	Piretróide	Fungicida/Inseticida
Difenoconazol	Triazol	Fungicida
Enxofre	Inorgânico	Acaricida/Fungicida
Estreptomina	Antibiótico	Bactericida
Etiona	Organofosforado	Acaricida/Inseticida
E-11-hexadecenol	Álcool alifático	Feromônio sintético
Hidróxido de cobre	Inorgânico	Bactericida/Fungicida
Imidacloprido	Neonicotinóide	Inseticida
Iprodiona	Dicarboximida	Fungicida
Iprovalicarbe	Carbamato	Fungicida
Mancozebe	Alquilenobis (ditiocarbamato)	Acaricida/Fungicida
Metconazol	Triazol	Fungicida
Metiocarbe	Metilcarbamato de fenila	Acaricida/Inseticida
Metiram	Alquilenobis (ditiocarbamato)	Fungicida
Oxicloreto de cobre	Inorgânico	Bactericida/Fungicida
Óxido cuproso	Inorgânico	Bactericida/Fungicida
Oxitetracina	Antibiótico	Bactericida/Fungicida
Piraclostrobina	Estrobilurina	Fungicida
Piriproxifem	Éter piridiloxipropílico	Inseticida
Propinebe	Alquilenobis (ditiocarbamato)	Fungicida
Sulfato de cobre	Inorgânico	Bactericida/Fungicida
Tetradifona	Clorodifenilsulfona	Acaricida
Tiabendazol	Benzimidazol	Fungicida
Tiacloprido	Neonicotinóide	Inseticida
Tiametoxam	Neonicotinóide	Inseticida
Triclorfom	Organofosforado	Acaricida/Inseticida
Trifluralina	Dinitroanilina	Herbicida
(Z,Z, Z)-3, 6, 9-tricosatrieno	Hidrocarboneto insaturado	Feromônio sintético
1, 4-dimetoxibenzeno	Éter aromático	Feromônio sintético

Fonte: AGROFIT, 2012.

2.2 Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

O termo agrotóxico, segundo o *Codex Alimentarius*, refere-se a qualquer substância ou mistura que tenha como objetivo prevenir, destruir ou controlar qualquer tipo de praga incluindo espécies de plantas ou animais presentes durante a produção, estocagem, transporte, distribuição ou processamento de alimentos ou rações animais. O termo inclui substâncias utilizadas como reguladores de crescimento para plantas, desfolhantes, desseccantes, agentes promotores de amadurecimento de frutos, inibidores de germinação e substâncias que são aplicadas aos grãos antes e depois da colheita para evitar a deterioração do alimento durante o armazenamento e transporte (FAO, 2005).

A legislação brasileira, através do decreto nº 4.074, de 04 de Janeiro de 2002, o qual regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de Julho de 1989, conceitua agrotóxicos como:

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

Podem ser classificados de diferentes maneiras, a principal é quanto ao seu emprego: inseticidas (combatem os insetos), herbicidas (combatem as plantas daninhas), fungicidas (combatem os fungos), acaricidas (combatem os ácaros), moluscocidas (combatem os moluscos), rodenticidas (combatem as bactérias), entre outros (BAIRD, 2002).

Quanto à composição química, os agrotóxicos possuem uma enorme diversidade estrutural, sendo classificados em um mesmo grupo quando apresentam alguma característica em comum, ou seja, quanto à natureza dos elementos químicos presentes e da maneira como estão arrançados. Também, a classificação quanto à toxicidade é fundamental, uma vez que são compostos potencialmente perigosos para a saúde humana (BARBOSA, 2004).

O processo produtivo agrícola brasileiro está cada vez mais dependente dos agrotóxicos e fertilizantes químicos. Conforme dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Observatório da Indústria dos Agrotóxicos da

Universidade Federal do Paraná, divulgados no 2º Seminário sobre Mercado de Agrotóxicos e Regulação, em Brasília (DF), em abril de 2012, enquanto, nos últimos dez anos, o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, o mercado brasileiro cresceu 190%. Assim, em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos (CARNEIRO *et al.*, 2012).

A utilização de agrotóxicos contribui para o aumento na produção, porém há uma preocupação crescente com efeitos adversos causados no ambiente, tais como: contaminação dos recursos hídricos, impactos em organismos não alvos e na saúde humana. Entre os efeitos nocivos causados ao homem estão diversos tipos de câncer, danos ao sistema nervoso central, problemas no sistema reprodutivo e locomotor, deficiência mental, entre outros (PRESTES, 2011).

A FAO (do inglês *Food and Agricultural Organization*) define o termo “resíduo” como a fração de uma substância, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento proveniente de produtos agrícolas e/ou animais tratados com estas substâncias. Enquanto o termo “contaminante” é definido como qualquer substância que não seja intencionalmente adicionada aos alimentos, como resultado das etapas de produção, transformação, acondicionamento, embalagem, transporte e armazenagem do alimento (CODEX ALIMENTARIUS, 2001).

As deficiências nas boas práticas para a utilização de agrotóxicos incorrem no aparecimento de resíduos que, em níveis acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR), podem representar risco à saúde humana. Estes riscos estão estritamente correlacionados com o desrespeito às instruções de uso do fabricante contidas na bula dos agrotóxicos, como: indicação de uso para a espécie alvo, dosagem, via de administração e período de carência (PRESTES, 2011).

2.3 Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos no Brasil

No Brasil, o processo de registro de agrotóxicos envolve o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), responsável pela avaliação do impacto dos agrotóxicos na saúde humana e pelo estabelecimento dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) (ANVISA, 2011a).

Os LMR referem-se a valores provenientes de experimentos de campo, exigidos para cada cultura, levando em consideração a Ingestão Diária Aceitável

(IDA), que é a quantidade máxima que, ingerida diariamente durante toda a vida, parece não oferecer risco apreciável à saúde, à luz dos conhecimentos atuais (FERMAM; ANTUNES, 2009).

A fim de acompanhar a situação de resíduos de agrotóxicos em alimentos são estabelecidos os programas de monitoramento. Dois programas de monitoramento de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal estão em curso no Brasil: o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), coordenado pela ANVISA, e o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), coordenado pelo MAPA (ANVISA, 2011b). Os programas brasileiros são similares aos realizados em outros países, entretanto o uso de agrotóxicos não autorizados é uma prática comum no país, uma situação que o governo vem tentando solucionar (JARDIM; CALDAS, 2012).

O PARA foi iniciado em 2001 pela ANVISA com o objetivo de avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor, fortalecendo a capacidade do Governo em atender a segurança alimentar, evitando assim, possíveis agravos à saúde da população. Mediante os resultados obtidos pelo programa são traçadas estratégias em conjunto com outras instituições, com o objetivo de diminuir os riscos advindos da presença dos resíduos não autorizados ou acima dos limites (ANVISA, 2012).

Já o PNCRC Vegetal é um programa federal de inspeção e fiscalização de alimentos de origem vegetal, criado em 2006, baseado em análise de risco, que visa verificar a presença de resíduos de substâncias químicas potencialmente nocivas à saúde do consumidor, como resíduos de medicamentos veterinários, de agrotóxicos ou afins, de contaminantes ambientais (ex: aflatoxinas) e de contaminantes inorgânicos (metais pesados). Entre seus objetivos principais está a garantia de um sistema que provenha a segurança e a inocuidade dos alimentos disponibilizados aos consumidores e que seja equivalente aos requisitos sanitários internacionais estabelecidos pelo MERCOSUL, CODEX, OMC, e órgãos auxiliares (FAO, OIE, WHO) (MAPA, 2011).

Entre 2001 e 2010 13.556 amostras, provenientes das 26 Unidades Federadas do Brasil, foram analisadas para resíduos de agrotóxicos, das quais 12.072 foram analisadas pelo PARA (de julho de 2001 a dezembro de 2009) e 1.484 analisadas pelo PNCRC (de janeiro de 2006 a julho de 2010). Os dados avaliados

pelos programas de monitoramento brasileiros mostram que 48,3% das amostras analisadas foram positivas para pelo menos um resíduo de agrotóxico. Maçã, mamão, uva e pimentão foram as culturas com a maior porcentagem de amostras positivas (em torno de 80%). Irregularidades encontradas em 13,2% das amostras foram principalmente devido a presença de ingredientes ativos não autorizados, e 2,7% das amostras analisadas continha resíduos abaixo do LMR permitido no Brasil (JARDIM; CALDAS, 2012).

A Tabela 3 mostra o número e a porcentagem de amostras positivas e irregulares para cada cultura analisada nos programas. Maçã, mamão, morango, uva e pimentão foram as culturas com o maior número de amostras positivas (aproximadamente 80%). Pimentão foi a cultura com a maior porcentagem de irregularidades (70,7% das amostras analisadas), principalmente devido à compostos não autorizados. Morango, uva e pimentão apresentaram a maior porcentagem de amostras irregulares apresentando resíduos de compostos não autorizados e acima do LMR permitido (JARDIM; CALDAS, 2012).

Tabela 3 - Culturas analisadas nos programas de monitoramento PARA e PNCRC, de 2001 a 2010, como percentual de amostras positivas e irregulares.

Cultura	Amostras analisadas	Amostras positivas % ^a	Amostras irregulares				
			Total	% ^b	NA, % ^{c,d}	>LMR ^c , %	Ambos, % ^{c,e}
Maçã	1.750	79,9	107	6,1	82,2	16,8	0,9
Mamão	1.545	82,3	173	11,2	46,2	47,4	6,4
Batata ^f	1.222	25,9	49	4,0	12,2	87,8	-
Laranja ^f	1.219	28,5	38	3,1	86,8	13,2	-
Tomate	1.154	59,8	158	13,7	63,9	27,2	8,9
Cenoura ^f	1.021	15,5	83	8,1	48,2	51,8	-
Alface	1.007	33,9	210	20,9	97,1	1,0	1,9
Morango	992	76,3	393	39,6	73,3	13,5	13,2
Banana	911	11,3	25	2,7	52,0	44,0	4,0
Feijão ^f	301	55,1	6	2,0	50,0	50,0	-
Arroz ^f	298	18,5	15	5,0	93,3	6,7	6,7
Uva	286	82,2	98	34,3	62,2	21,4	16,3
Manga	284	30,6	9	3,2	66,7	33,3	-
Abacaxi	270	41,9	55	20,4	49,1	41,8	9,1
Repolho ^f	268	18,3	43	16,0	100,0	-	-
Pimentão ^f	266	82,0	188	70,7	86,7	2,7	10,6
Cebola ^f	263	1,1	3	1,1	100,0	-	-
Beterraba ^f	172	32,0	37	21,5	100,0	-	-
Pepino ^f	146	53,4	43	29,5	88,4	7,0	4,7

(continuação)

Cultura	Amostras analisadas	Amostras positivas % ^a	Amostras irregulares				
			Total	% ^b	NA, % ^{c,d}	>LMR ^c , %	Ambos, % ^{c,e}
Couve ^f	129	58,1	52	40,3	71,2	19,2	9,6
Limão ^g	31	74,2	3	9,7	100,0	-	-
Melão ^g	21	28,6	2	9,5	100,0	-	-
Total	13.556	48,3	1.790	13,2	72,1	20,6	7,4

^a Presença de resíduo de pelo menos um agrotóxico \geq LOQ.^b Relacionado ao total de amostras analisadas a cada ano.^c Relacionado ao total de amostras irregulares a cada ano.^d Ingredientes ativos não autorizados.^e Presença de ingredientes ativos não autorizados e resíduos acima do LMR.^f Somente analisado no PARA.^g Somente analisado no PNNCRC.

Fonte: Adaptado de Jardim; Caldas (2012).

Acima de 40% das amostras de pimentão e morango tinham resíduos na faixa de 0,1 e 0,5 mg kg⁻¹, sendo que pimentão foi a cultura com o maior número de amostras que apresentaram multirresíduo (73,9%), seguido por morango (71,6%) e uva (70,2%). A presença de multirresíduo pode sugerir que os princípios de boas práticas de agricultura não estão sendo respeitados (JARDIM; CALDAS, 2012).

A Tabela 4 apresenta os agrotóxicos monitorados em pimentão pelos programas PARA e PNNCRC, com os respectivos LMR.. A Tabela 4 também apresenta, quando existente, o LMR estabelecido pelo Codex Alimentarius e pela União Europeia (UE). No PNNCRC, o monitoramento da cultura de pimentão entrou em vigor na safra 2010/2011.

Tabela 4 - Tabela de agrotóxicos monitorados pelo PARA e PNNCRC com os LMRs para a cultura de pimentão pelo Codex e União Européia.

Princípio Ativo	Limites Máximos de Resíduos (LMR), mg kg ⁻¹			
	PARA	PNNCRC	CODEX	UE
Acefato	1	1	-	0,02
Acetamiprido	NA	NPC	-	0,3
Ametrina	0,02	NPC	-	-
Atrazina	0,02	-	-	-
Azaconazol	NA	P	-	-
Azoxistrobina	NA	0,5	3	3
Boscalida	NA	NPC	3	3
Bromoconazol	NA	NPC	-	-
Buprofezina	NA	NPC	2	2
Carbaril	NA	NPC	5	0,05

(continuação)

Princípio Ativo	Limites Máximos de Resíduos (LMR), mg kg ⁻¹			
	PARA	PNCRC	CODEX	UE
Carbendazim + Tiofanato Metílico + Benomil	NA	NPC	-	-
Carbofurano + 3-OH Carbofurano	NA	NPC	-	-
Cianazina	NA	-	-	-
Ciproconazol	NA	NPC	-	-
Clomazone	0,05	-	-	0,01
Clorpirifós etílico	NA	NPC	2	0,5
Clotianidina	NA	NPC	0,05	0,05
Deltametrina	0,01	0,01	-	0,2
Diazinona	NA	NPC	0,05	0,05
Difenoconazol	0,5	0,5	-	0,5
Dimetoato + Ometoato	NA	NPC	0,5	0,02
Dimoxistrobina	-	P	-	-
Diuron	NA	NPC	-	-
Dodemorfe	NA	P	-	-
Epoxiconazol	NA	NPC	-	-
Etiofencarbe	NA	P	-	-
Etoprofós	NA	NPC	0,05	-
Fembuconazol	NA	P	-	0,05
Fluasifope-P-butílico	NA	NPC	-	-
Flusilazole	NA	P	-	-
Flutriafol	NA	NPC	-	-
Furatiocarbe	NA	NPC	-	-
Imazalil	NA	NPC	-	-
Iprovalicarbe	0,05	0,05	-	-
Linurom	NA	NPC	-	-
Mefosfolan	-	P	-	-
Mepronil	-	P	-	-
Metalaxil-M	NA	NPC	1	0,5
Metobromuron	-	P	-	-
Metoxurom	-	P	-	-
Mevinfós	NA	NPC	-	-
Monocrotofós	NA	P	-	-
Monolinurom	-	P	-	-
Pencicurom	NA	NPC	-	-
Penconazol	NA	P	-	-
Picoxistrobina	NA	NPC	-	-
Piperonil butóxido	-	P	-	-
Piraclostrobina	1	1	0,5	0,5
Pirazofós	NA	NPC	-	-
Piridafentiona	NA	NPC	-	-
Pirimetanil	NA	NPC	-	-
Pirimifós etílico	NA	P	-	-

(continuação)

Princípio Ativo	Limites Máximos de Resíduos (LMR), mg kg ⁻¹			
	PARA	PNCRC	CODEX	UE
Pirimifós metílico	NA	NPC	-	-
Profenofós	NA	NPC	-	-
Propiconazol	NA	NPC	-	-
Simazina	NA	NPC	-	-
Tebuconazol	0,1	0,1	0,5	0,5
Tebufenozida	NA	NPC	-	-
Tebufenpirade	NA	P	-	-
Terbufós	NA	NPC	-	-
Tetraconazol	NA	NPC	-	-
Tiabendazol	2	2	-	-
Tiacloprido	0,2	0,2	1	-
Tiametoxam	0,02	0,02	-	-
Triazofós	NA	NPC	-	-
Trifloxistrobina	NA	NPC	0,3	-
Triflumizol	NA	NPC	-	-

NA – não autorizado (denominação PARA);

NPC – não permitido para a cultura (denominação PNCRC);

P – proibido (denominação PNCRC).

2.4 Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

2.4.1 Métodos cromatográficos para determinação de resíduos de agrotóxicos

A Cromatografia Gasosa é uma técnica de separação com um poder de resolução excelente, que baseia-se na diferente distribuição de substâncias da amostra entre uma fase estacionária e a fase móvel (um gás), sendo esta aplicada a análise de compostos voláteis ou volatilizáveis, que sejam termicamente estáveis. Após serem separadas na coluna, as substâncias analisadas chegam ao sistema de detecção, sendo os principais detectores clássicos aplicados nessa técnica: Detector por Condutividade Térmica (TCD, do inglês *Thermal Conductivity Detector*); Detector por Ionização em Chama (FID, do inglês *Flame Ionization Detector*); Detector por Captura de Elétrons (ECD, do inglês *Electron Capture Detector*) e Detector de Nitrogênio e Fósforo (NPD, do inglês *Nitrogen Phosphorus Detector*) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009).

Na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) o principal requisito para a análise é a solubilidade dos compostos na fase móvel. Como a maioria dos compostos não são

suficientemente voláteis para ser analisados por Cromatografia Gasosa, a HPLC tem tido grande destaque. Os principais sistemas clássicos de detecção empregados são: Detector de Ultravioleta e Visível (UV-vis); Detector por Arranjo de Diodos (DAD, do inglês *Diode Array Detector*) e Detector de Fluorescência (FD, do inglês *Fluorescence Detector*) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009; HARRIS, 2008).

A Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC, do inglês *Ultra-high Performance Liquid Chromatography*) fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da HPLC, entretanto emprega colunas cromatográficas com dimensões reduzidas (5-10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1-2,1 mm), recheadas com partículas de FE $\leq 2 \mu\text{m}$, podendo ser utilizadas altas velocidades lineares de fase móvel (FM) para obter melhores resultados (MALDANER; JARDIM, 2012).

Entre as vantagens do sistema UHPLC em relação à HPLC estão o pequeno volume de amostra utilizado; aumento na sensibilidade e eficiência da separação, portanto, tem-se um aumento de resolução; a facilidade em transferir um método desenvolvido em HPLC para UHPLC; possibilidade de analisar um maior número de amostras por unidade de tempo, além de grande variedade de colunas e equipamentos disponíveis no mercado (WATERS, 2013a).

Entretanto, a utilização da UHPLC com alto desempenho requer determinadas modificações, como equipamento capaz de trabalhar a elevadas pressões, acima de 1000 bar (~15000 psi); sistema de bombeamento robusto; sistema de injeção rápido, exato e preciso na faixa de pequenos volumes; volumes internos reduzidos (conexões, alça de amostragem, cela do detector e bombas); detectores com alta taxa de aquisição de dados, colunas e FE apropriadas (MALDANER; JARDIM, 2012). Entre estas FE, estão as partículas de sílica híbrida de terceira geração produzidas e patenteadas pela Waters, que consistem de partículas de sílica híbrida (*Ethylene Bridged Hybrid*, BEH) incorporadas com uma pequena quantidade de carga na superfície. Devido à estabilidade química intrínseca da tecnologia de partículas híbridas, a coluna que possui esta FE possui uma gama mais ampla de pH utilizável (pH de 1 a 12), permitindo uma tecnologia de separação versátil e robusta para o desenvolvimento de métodos analíticos (WATERS, 2013b).

Além disso, os cuidados com a limpeza do sistema cromatográfico também devem ser maiores no sistema UHPLC, uma vez que suas tubulações e seus filtros da coluna são muito mais suscetíveis ao entupimento que aquelas empregadas em

HPLC, devido a redução dos d.i. das tubulações (necessária para diminuir o volume extracoluna e evitar o alargamento do pico cromatográfico) e a diminuição da porosidade dos filtros (necessária para reter as partículas de FE $\leq 2 \mu\text{m}$ no interior da coluna mantendo um leito cromatográfico estável) (MALDANER; JARDIM, 2012).

Ainda, o emprego de pressões elevadas pode gerar alguns inconvenientes para a utilização da UHPLC, como o aumento no volume molar das moléculas, podendo haver alteração na ordem de eluição dos compostos, deslocamento ou sobreposição de picos cromatográficos. Outra consequência do aumento de pressão é a geração de gradientes de temperatura longitudinal e radial, que influenciam a retenção e eficiência. Esse fato ocorre devido ao atrito entre a FM e as partículas da FE empregadas em UHPLC (MALDANER; JARDIM, 2012).

2.4.2 Cromatografia acoplada à Espectrometria de Massas para determinação de resíduos de agrotóxicos

O uso de detectores clássicos torna as análises quantitativas mais limitadas, de um modo geral, pois a identificação do analito através do seu tempo de retenção (t_R) característico pode gerar um grande problema, visto que vários compostos podem apresentar o mesmo t_R (LANÇAS, 2009).

Dentre os detectores que podem ser utilizados na cromatografia líquida e na gasosa, a Espectrometria de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) tem se destacado, pela sua versatilidade de uso em ambas as técnicas, além disso, a combinação destas duas técnicas tem como vantagens a alta seletividade e separação eficiente, proveniente da cromatografia, e informações estruturais e aumento da seletividade, oriundo da espectrometria de massas (LANÇAS, 2009).

O princípio básico da Espectrometria de Massas é a geração de íons de compostos orgânicos ou inorgânicos e separação através da sua razão massa/carga (m/z), seguida da detecção qualitativa e quantitativa da respectiva m/z e abundância. Essa ionização pode ser realizada termicamente, por campo elétrico, por impacto energético de elétrons, íons ou fótons, dentre outros. O espectrômetro de massas consiste em uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector, sendo que os dois últimos são operados sob condições de alto vácuo. A fonte de íons não necessariamente estará sob vácuo (GROSS, 2004).

Quando se trata do acoplamento da Cromatografia Gasosa com a Espectrometria de Massas (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*), dois são os modos de ionização possíveis: Ionização por Elétrons (EI, do inglês *Electron Ionization*) ou por Ionização Química (CI, do inglês *Chemical Ionization*). Quanto à Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC/MS, do inglês *Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*), pode-se utilizar as fontes de eletronebulização (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*), ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) ou ainda fotoionização à pressão atmosférica (APPI, do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*) (LANÇAS, 2009).

No processo de ionização por eletronebulização (*Electrospray*, ESI), conforme Figura 4, a amostra é dissolvida e pressurizada em um tubo capilar de aço inox, ao qual é aplicada uma voltagem tipicamente entre 3.000 e 5.000 V. Como resultado, o líquido emerge do capilar à pressão atmosférica, na forma de um aerossol. A medida que ocorre a dessolvatação, assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N₂), o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento ocorre a chamada “explosão coulombica”, que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais se originaram. Uma série de explosões passa então a ocorrer até que são produzidos íons do analito a partir destas gotas, que são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização. Neste processo, apenas a ionização ocorre à pressão atmosférica, o espectrômetro de massas se encontra sob “vácuo”. É ideal para análise de moléculas mais polares, de maior massa molecular (LANÇAS, 2009; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

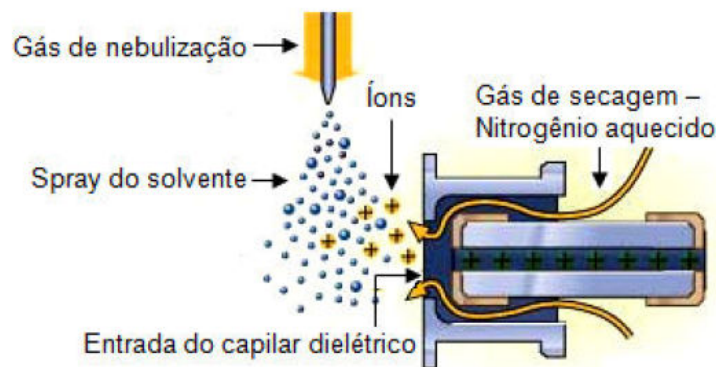


Figura 4 - Esquema da fonte de ionização ESI.

Fonte: Adaptado de CHROMEDIA, 2013.

A ionização química a pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI), como observado na Figura 5, é uma técnica apropriada para determinação de massas molares menores do que 2000 unidades de massa, em uma larga faixa de moléculas polares e apolares. No modo APCI, o eluato do cromatógrafo a líquido é vaporizado através de um vaporizador aquecido (normalmente de 250 a 400 °C), sob pressão atmosférica. O aquecimento vaporiza o líquido e as moléculas do solvente na fase gasosa são ionizadas por uma descarga de elétrons a partir uma agulha condutora. Então, os íons do solvente transferem cargas para as moléculas do analito através de reações químicas (ionização química). Devido a isso e ao fato de altas temperaturas estarem envolvidas, a APCI é menos utilizada do que o ESI para a análise de biomoléculas grandes que podem ser termicamente instáveis. APCI é usada com cromatografia em fase normal mais frequentemente do que o ESI, porque os analitos são usualmente apolares (PRIMER, 2004; FERNANDEZ-ALBA, 2005; NUÑEZ, 2005).

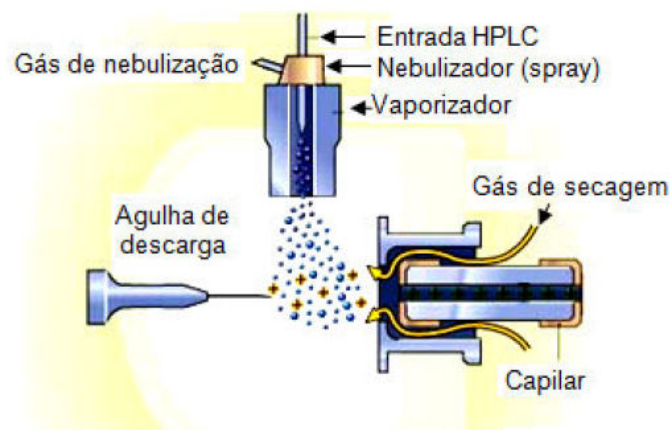


Figura 5 - Esquema da fonte de ionização APCI.

Fonte: Adaptado de CHROMEDIA, 2013.

A fotoionização a pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Photoionization*, APPI), conforme Figura 6, é aplicada na análise de compostos menos polares do que aqueles menos ionizáveis por APCI, podendo ser operada no modo positivo e negativo. Nesta técnica, o vaporizador converte o eluato do cromatógrafo a líquido em uma fase gasosa. A descarga de uma lâmpada gera fótons em uma faixa estreita de energia de ionização, que foi previamente escolhida para ionizar o maior número possível de moléculas do analito, enquanto minimiza a ionização das moléculas do

solvente. Os íons resultantes passam através de um capilar de vidro para dentro do analisador de massas (PRIMER, 2004; FERNANDEZ-ALBA, 2005; NUÑEZ, 2005).

Em todos os casos, a natureza do analito e as condições de separação têm uma forte influência sobre qual técnica de ionização (ESI, APCI ou APPI) irá promover os melhores resultados.

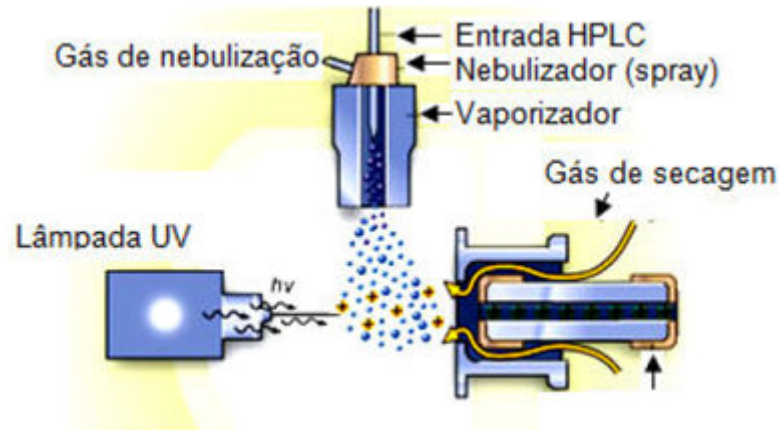


Figura 6 - Esquema da fonte de ionização APPI.

Fonte: Adaptado de CHROMEDIA, 2013.

Os analisadores de massas separam íons de acordo com a razão m/z . Atualmente, com a grande variedade de analisadores de massas disponíveis, a escolha do mais apropriado depende de fatores como a aplicação (faixa de massas desejada), o desempenho (resolução) bem como o custo. Alguns exemplos são: quadrupolo (e triplo quadrupolo), trapeamento de íons (do inglês, *ion trap*), tempo de voo e quadrupolo-tempo de voo.

O analisador de massas tipo quadrupolo (qMS) é composto de quatro barras usualmente de metal, disposta em pares nos quais se aplicam uma corrente contínua do tipo DC (corrente direta) e um potencial RF (rádio frequência) alternante. A RF é variada para que os íons de diferentes m/z obtenham uma trajetória estável ao longo do quadrupolo chegando ao detector, gerando assim o espectro de massas. Os íons produzidos na fonte de ionização são focalizados até o centro da região entre os quatro cilindros e atravessam o quadrupolo axialmente. Suas trajetórias são dependentes do campo elétrico produzido onde apenas íons de determinada m/z terão essa trajetória estável e chegarão ao detector. A trajetória dos íons é um pouco complexa, mas simplificada segue uma trajetória helicoidal. Este é o analisador de massas mais popular, entre outros fatores, pela sua simplicidade, preço relativamente baixo, boa faixa linear, facilidade de ser

entendido e operado. (LANÇAS, 2009; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; CORILO, 2009; STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010).

O analisador tipo Triplo Quadrupolo (TQ), conforme pode ser observado na Figura 7, é constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo (Q2 ou q) é utilizado como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo (Q1 ou MS1), geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (CID, do inglês *collision-induced dissociation*), e também como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo (Q3 ou MS2). 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 (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Na dissociação induzida por colisão, 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, onde sofre repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia (geralmente Ar, He ou N₂), levando a um aumento na energia potencial deste íon até ocasionar sua fragmentação, conduzindo à formação dos íons produto (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010; GROSS, 2004).

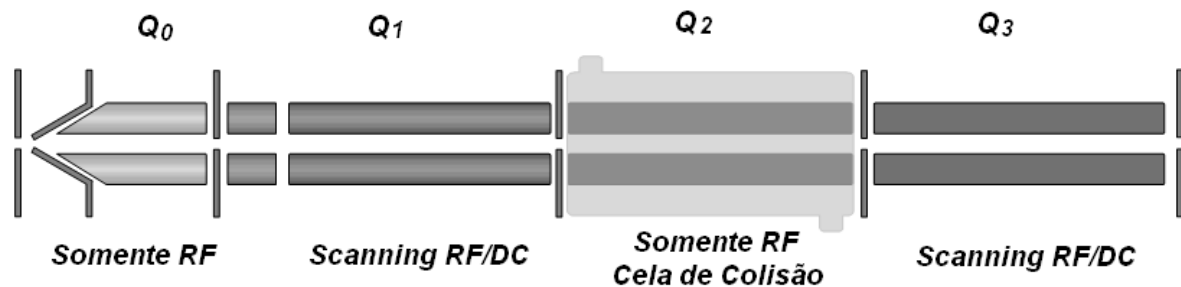


Figura 7 - Esquema do analisador de massas, tipo Triplo Quadrupolo (TQ).

Dentre as técnicas de operação para obtenção do espectro de massas em MS/MS, estão varredura completa (do inglês, *Full scan*), Monitoramento do Íon Selecionado (SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring*), Varredura do Íon Produto, Varredura do Íon Precursor e Monitoramento Seletivo de Reações (SRM, do inglês *Selected Reaction Monitoring*).

O tipo de varredura completa é muito comum quando se tem um único quadrupolo, mas quando se tem um sistema MS/MS pode-se optar por utilizar somente o Q1, desse modo realizando a varredura completa da amostra em uma

faixa ampla de m/z . O cromatograma nessa condição é conhecido como Cromatograma de Íon Total (TIC, do inglês *total ion chromatogram*) (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010; GROSS, 2004).

O modo SIM é muito utilizado quando se tem apenas um quadrupolo, mas também pode ser utilizado no sistema TQ. Quando operado no modo SIM, pode-se escolher um único íon a ser monitorado ou vários íons característicos dos analitos alvo de interesse presentes em uma mistura complexa, aumentando a sensibilidade (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010; GROSS, 2004).

A varredura do íon produto consiste em selecionar um íon precursor de determinada m/z no Q1, o qual opera em modo SIM, e determinar todos os íons produto resultantes da dissociação induzida por colisão no Q3. Já a varredura do íon precursor consiste na escolha de um íon produto para determinar a origem do mesmo, ou seja, qual o íon precursor que originou este produto. Assim, o Q1 opera no modo *scan* ou varredura, enquanto o Q3 no modo SIM (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

No modo de varredura SRM é monitorada a fragmentação de um íon precursor selecionado no Q1 e seus correspondentes íons produto que são filtrados em Q3. Este método permite que o equipamento focalize apenas o precursor e o produto, aumentando a sensibilidade para o monitoramento, associado ao aumento na seletividade (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010).

2.4.3 Preparo de amostra para determinação de resíduos de agrotóxicos

A etapa de preparo de amostra e as operações envolvidas podem afetar o resultado final e, dessa forma, necessita-se de um preparo de amostra adequado para se obter a informação correta na análise (FENIK; TANKIEWICZ; BIZIUK, 2011).

As técnicas que têm sido mais amplamente utilizadas para extração de resíduos e contaminantes em alimentos foram a Extração Sólido-Líquido (SLE, do inglês *Solid Liquid Extraction*) e a Extração Líquido-Líquido (LLE, do inglês *Liquid Liquid Extraction*). Ambas consistem na extração sucessiva de amostras sólidas e líquidas, respectivamente, com solvente orgânico empregando agitação vigorosa. A acetonitrila é considerada um dos melhores solventes, uma vez que promove uma extração bastante eficiente e extrai baixas concentrações de coextrativos da matriz,

mas metanol e acetato de etila também são amplamente utilizados, porém extraem elevadas quantidades de coextrativos da matriz (CABRERA *et al.*, 2012).

Para analitos voláteis, SPME ou SBSE são opções consideráveis. Na Microextração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*), ocorre a partição dos analitos de interesse entre o revestimento da fibra e a matriz da amostra em estudo até que o equilíbrio seja atingido, utilizando uma microseringa contendo uma fibra com revestimento de material adsorvente, próprio para o analito de interesse. Pode ser operada em modo direto ou *headspace*. A Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE, do inglês *Stir-Bar Sorptive Extraction*) é similar à SPME, empregando, em vez de fibras, uma barra de agitação recoberta com o sorvente. A barra de agitação é introduzida na amostra sob agitação, de forma a promover o movimento de rotação na matriz líquida e simultaneamente a extração dos analitos para a camada polimérica em condições experimentais otimizadas (ALMEIDA *et al.*, 2004).

A Extração Líquida Pressurizada (PLE, do inglês *Pressurised-Liquid Extraction*) tem provado ser uma técnica rápida e eficiente para muitos tipos de amostras sólidas, incluindo amostras ambientais, alimentícias e biológicas. Versões miniaturizadas do sistema PLE também têm sido desenvolvidas. Neste método, amostra e solvente são aquecidos e submetidos a alta pressão em uma cela fechada. Com a pressão e temperatura elevadas, a viscosidade do solvente muda, aumentando a extração dos analitos, no entanto as diferentes propriedades físico-químicas dos analitos dificultam o emprego em análises multirresíduo (HYÖTYLÄINEN, T., 2009; CABRERA *et al.*, 2012).

Na técnica de Extração Assistida por Micro-ondas (MAE, do inglês *Microwave-Assisted Extraction*) a amostra é imersa num frasco aberto ou fechado contendo solvente, sendo posteriormente irradiada com micro-ondas. A principal limitação da técnica é o uso de solventes que absorvam energia de micro-ondas, pois solventes não polares não absorvem essa energia. A Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*), envolve a mistura da amostra (viscosa, sólida ou semisólida) com um sorvente, a transferência da mistura para um cartucho e uma etapa de eluição com um solvente adequado. Já na Extração Ultrassônica (USE, do inglês *Ultrasonic Extraction*), a amostra com solvente é submetida ao banho com ultrassom (CABRERA *et al.*, 2012).

Os métodos de preparo de amostra que têm como base a instrumentação demandam analistas treinados e etapas de limpeza entre extrações, aumentando o tempo de análise. Além disso, o escopo de analitos que pode ser extraído em determinadas condições é limitado e, sendo assim, estes procedimentos estão distantes de serem considerados ideais para um método multirresíduo (CABRERA *et al.*, 2012).

Dessa maneira, o método QuEChERS (do inglês **Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged** e **Safe**) foi originalmente desenvolvido para a extração de uma ampla faixa de agrotóxicos em frutas e hortaliças e se tornou muito conhecido desde que foi introduzido por Anastassiades *et al.* (2003). Esse método é caracterizado pela utilização de um solvente polar, acetonitrila, para extração de uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades, este solvente também extrai menor quantidade de coextrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos (MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004a).

Além disso, a adição de sais para promover o efeito *salting out* é utilizada em vários métodos multirresíduo sendo muito conveniente, pois é rápida, fácil, apresenta baixo custo, tem a grande vantagem de não diluir o extrato da amostra e proporciona a separação das fases orgânica e aquosa. O cloreto de sódio (NaCl) foi proposto inicialmente para auxiliar no efeito *salting out*, diminuindo a solubilidade dos compostos na fase aquosa, bem como, a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2011).

Durante o período de otimização do método QuEChERS, percebeu-se que a utilização de tampões (pH 5,0) promoviam recuperações satisfatórias (>70%) para compostos dependentes do pH. Assim, Lehotay *et al.* (2005a) desenvolveram o método “QuEChERS-acetato”, no qual o efeito tamponante (pH 4,8) é promovido pela adição de acetato de sódio e adição de ácido acético à acetonitrila. Mais tarde, Anastassiades *et al.* (2007) propuseram o método “QuEChERS-citrato”, que utiliza uma mistura de citrato de sódio di e sesquidratados como responsáveis pelo efeito tamponante (pH 5,0-5,5).

Na etapa de extração/partição, a utilização de sais secantes tem a finalidade de melhorar a recuperação de agrotóxicos polares. O sulfato de magnésio (MgSO₄) foi escolhido no desenvolvimento do método QuEChERS por apresentar maior

capacidade de remover água quando comparado a outros sais (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

A complexidade da composição dos alimentos ocasiona dificuldades na quantificação de agrotóxicos, sendo necessária a realização de uma etapa de limpeza do extrato, após a extração com solvente. Essa etapa é fundamental, pois reduz as interferências e o efeito matriz, além de diminuir a necessidade de manutenção do sistema cromatográfico (PRESTES *et al.*, 2009).

Tradicionalmente, a etapa de limpeza emprega a Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*), a qual utiliza cartuchos ou colunas que contêm entre 60 e 1000 mg de sorvente, requer grande habilidade do operador e, quando automatizada, apresenta um custo considerável. Assim, juntamente com o método QuEChERS foi proposto um novo método de limpeza denominado Extração Dispersiva em Fase Sólida (d-SPE), onde uma quantia de extrato é colocada em contato com uma mistura de sorventes com ou sem uso de sais (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). A Figura 8 apresenta os métodos QuEChERS original, QuEChERS acetato e QuEChERS citrato.

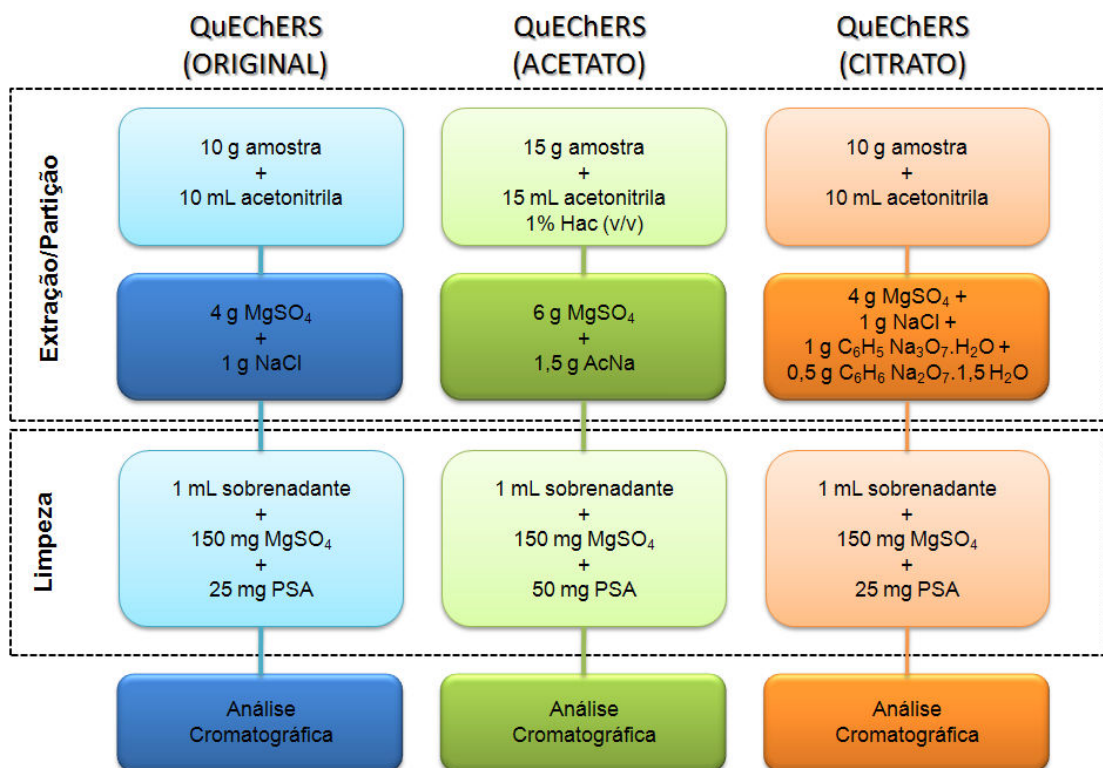


Figura 8 - Fluxograma dos métodos QuEChERS original, acetato e citrato.

Fonte: Adaptado de PRESTES, 2011.

Entre os sorventes que podem ser utilizados na etapa de d-SPE, estão uma amina primária-secundária (etilenodiamino-N-propil, PSA), a qual tem elevado efeito quelante devido a presença dos grupamentos amino primário e secundário, acarretando em remoção de ácidos orgânicos polares, pigmentos polares, alguns açúcares e ácidos graxos. O tamanho de partícula do sorvente utilizado é, geralmente, de 40 μm . O sorvente PSA tem sido usado em associação com outros sorventes, principalmente com C_{18} ou carbono grafitizado (PRESTES *et al.*, 2009; WILKOWSKA; BIZIUK, 2011; CABRERA *et al.*, 2012).

O sorvente octadecilsilano (C_{18}) é mais utilizado para matrizes com teor de gordura maior que 2%, pois remove com boa eficiência interferentes apolares, tais como substâncias graxas e lipídios. No entanto, tem sido utilizado em conjunto com PSA para diferentes tipos de matrizes e analitos, tendo um custo inferior ao do PSA. O tamanho de partícula mais utilizado é de 40 μm (CABRERA *et al.*, 2012).

O carvão disponível comercialmente para fins cromatográficos, comumente chamado de carbono grafitizado (GCB, do inglês *Graphitized Carbon Black*), possui uma grande área superficial e contém grupos altamente polares na superfície, com alto potencial para formação de ligação de hidrogênio. Acarretando, assim, a redução do teor de pigmentos nos extratos provenientes de amostras vegetais (CABRERA *et al.*, 2012).

Entre outros sorventes de limpeza para utilização na determinação de agrotóxicos em alimentos, encontra-se na literatura descrições da utilização de terra diatomácea e sorventes poliméricos. A terra diatomácea, também denominada diatomita, diatomita calcinada, diatomita fluxo calcinada, sílica diatomácea e sílica amorfa, destaca-se pelo seu baixo custo, alta área superficial e baixa massa específica, tendo como componente majoritário a sílica, a qual se encontra na forma hidratada. A coloração varia do branco ao cinza-escuro e os tamanhos de partícula disponíveis variam de 4 e 500 μm (CABRERA *et al.*, 2012).

Os sorventes poliméricos são sólidos rígidos microporosos ou apresentam uma mistura de microporos e mesoporos e, em contraste com a sílica, são estáveis numa faixa de pH de 1 a 13. Os cartuchos Strata X[®] e Oasis[®] são vendidos contendo sorventes poliméricos com uma superfície modificada com divinilbenzeno (não polar) e com um grupo N-vinilpirrolidona (polar), o que facilita a extração de agrotóxicos de diferentes polaridades em uma única etapa de extração. Estes sorventes são

recomendados para extração de substâncias ácidas, básicas e neutras, de média a alta polaridade (DONATO, 2012).

A terra diatomácea foi utilizada em métodos de preparo de amostra empregando MSPD para extração de agrotóxicos por Cabrera (2012), que testou terra diatomácea branca, de 64-76 μm de tamanho de partícula, como sorvente na d-SPE, empregando QuEChERS modificado, para 26 agrotóxicos em arroz, entretanto, somente 9 compostos apresentaram recuperações dentro da faixa de 70% a 120%. Além disso, Rodrigues (2010) comparou a utilização de terra diatomácea e sorventes poliméricos com C_{18} na técnica de MSPD, obtendo bons resultados, onde os três sorventes demonstraram ser adequados na determinação de agrotóxicos em cebola.

Há, no entanto, outros materiais que poderiam ser utilizados para tal finalidade, como as fases fluoradas, desenvolvidas como fase estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência. As FE fluoradas possuem átomos de flúor ligados à cadeia alquila ou a grupos fenil, e a apresentam uma seletividade única proveniente das propriedades específicas das ligações C-F que intensifica a interação com compostos polares (MALDANER *et al.*, 2010).

2.5 Aplicação do Método QuEChERS e Técnicas Cromatográficas na Determinação de Agrotóxicos em Pimentão

Na literatura tem sido relatado o uso de diferentes técnicas de preparo de amostra para a extração de agrotóxicos em pimentão. A aplicação do método QuEChERS e de técnicas cromatográficas avançadas, sendo a cromatografia líquida mais amplamente utilizada, tem como objetivos minimizar o manuseio da amostra, diminuir os níveis de concentração detectados e quantificados, bem como reduzir os resíduos tóxicos gerados, em análises rápidas e com confiabilidade.

Zhang *et al.* (2011), desenvolveram e validaram um método de análise multirresíduo de 201 agrotóxicos por LC-MS/MS, para 24 culturas, entre elas: maçã, morango, pimentão e tomate. A separação cromatográfica ocorreu em coluna a 35 $^{\circ}\text{C}$, contendo FE C_{18} (100 mm x 2,1 mm, 3 μm) e como FM empregaram uma mistura de metanol:água (1:1, v/v, com 5 mmol L^{-1} de formiato de amônio e 0,1% de ácido acético), a uma vazão de 0,5 mL min^{-1} , no modo de eluição por gradiente. Como método de preparo de amostra otimizado, utilizaram 10 g amostra, extração com 10 mL de ACN e partição utilizando 4 g MgSO_4 e 1 g NaCl. Na etapa de limpeza, para 9

mL do extrato foram adicionados 400 mg PSA e 1200 mg MgSO₄. O Limite de Quantificação do Método (LOQ_m) obtido pelos autores foi de 10 µg kg⁻¹.

Já Ventocilla (2009), estabeleceu um método para análise de resíduos de 75 agrotóxicos, principalmente inseticidas e fungicidas dos grupos conazole, carbamato, benzimidazoles e pirimidinas em aspargo e pimentão utilizando método QuEChERS acetato e detecção por LC-MS/MS, com fonte de ionização ESI no modo positivo e negativo. A porção da amostra (15 g) foi submetida a extração com acetonitrila contendo ácido acético, seguido pela adição de sais (MgSO₄ e NaAc) e, em seguida, foi executada a extração por d-SPE com uma mistura de sulfato de magnésio, amina primária secundária (PSA) e carvão grafitizado (GCB). Os valores de LOQ_m obtidos variaram de 5 a 20 µg kg⁻¹.

Núñez *et al.* (2012), desenvolveram um método para análise de um grupo de 100 agrotóxicos (herbicidas, fungicidas e inseticidas) em frutas e hortaliças por LC-MS e LC-MS/MS, usando uma coluna analítica de fase reversa C₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) a 25 °C. A fim de complementar a estratégia de aquisição dos dados foi utilizado o modo SIM para LC-MS/MS. O preparo da amostra foi realizado utilizando 15 g de amostra para 15 mL de acetonitrila, 1,5 g de NaCl e 4 g de MgSO₄ para extração/partição, além de 250 mg de PSA e 750 mg de MgSO₄ para limpeza de 5 mL de extrato, com uma etapa adicional de evaporação e reconstituição em fase móvel (acetonitrila:água, 1:1, v/v, contendo 0,1% de ácido fórmico). Os Limites de Detecção do método (LOD_m) variaram de 0,01 a 20 µg kg⁻¹.

Também, Fenoll *et al.* (2010), estabeleceram um método analítico multirresíduo usando LC-MS/MS com TQ para determinação simultânea de 54 agrotóxicos em hortaliças (pimentão e tomate) e frutas cítricas (laranja e limão). Diferentemente dos trabalhos citados anteriormente, o volume de injeção utilizado foi de 5 e não 10 µL. O tempo de corrida foi de 35 minutos. Frutas e hortaliças (10 g) foram extraídas com acetonitrila (10 mL) e particionadas com a adição de MgSO₄ e NaCl (2 g) e, então, filtradas através de um filtro de membrana de 0,45 µm. Os LOD_m variaram de 0,03 a 14,9 µg kg⁻¹.

Sinha, Rao e Vasudev (2012) desenvolveram um método para determinação de agrotóxicos organofosforados em diferentes tipos de hortaliças, utilizando LC-MS/MS para quantificação. O volume de injeção foi de 20 µL e como fase móvel empregou-se acetonitrila e água contendo 0,1%(v/v) ácido fórmico em gradiente.

Para extração dos agrotóxicos utilizaram uma modificação do método QuEChERS original: 10 g de amostra, 10 mL de acetonitrila, 6 g de MgSO_4 e 1,5 g de NaCl para etapa de extração. Empregaram 400 mg de PSA com 1200 mg de MgSO_4 para limpeza de 15 mL de extrato e uma etapa de evaporação até secagem com fluxo suave de nitrogênio e reconstituição com 1 mL de acetonitrila. Os valores de LOQ_m obtidos variaram de 0,009 a 0,317 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Quanto ao uso de Cromatografia Gasosa, Zafra-Gómez *et al.* (2011), desenvolveram um método para determinação de 121 resíduos de agrotóxicos em frutas e hortaliças por GC-MS/MS, com 12 segmentos em menos de 30 minutos. Procedeu-se o preparo da amostra com o método QuEChERS citrato, utilizando 15 g amostra (tomate, alface, pepino, berinjela, abobrinha, melancia, maçã ou pimentão), 10 mL de acetonitrila para extração, 6 g MgSO_4 , 1,5 g NaCl, 1,5 g citrato de sódio diidratado e 0,75 g hidrogenocitrato de sódio sesquidratado para partição. A limpeza de 5 mL de extrato foi efetuada com 125 mg PSA e 750 mg MgSO_4 . O LOQ_m foi de 6 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

2.6 Planejamento Fatorial

Na maioria das vezes, durante a otimização de um método são utilizadas variáveis experimentais por meio de procedimentos que avaliam o efeito de uma variável por vez (univariado), entretanto, este fator apresenta algumas desvantagens, como o tempo gasto para otimização e a falta de avaliação acerca das interações entre as variáveis que afetam o processo em estudo. Por outro lado, o uso de planejamentos experimentais, como os de sistemas de planejamento fatorial, permite avaliar simultaneamente o efeito de mais de uma variável, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais (CUNICO *et al.*, 2008).

O caso mais simples de planejamento fatorial é aquele em que cada fator k está presente em apenas dois níveis (experimento fatorial 2^k), ou seja, em um experimento com k fatores (ou variáveis) e dois níveis, são realizadas $2 \times 2 \times \dots \times 2$ (k vezes) = 2^k observações da variável resposta. Entretanto, com um número reduzido de níveis é praticamente impossível explorar de maneira completa uma grande região no espaço das variáveis (>4), estes ainda se mostram vantajosos,

pois permitem verificar tendências importantes para a realização de investigações posteriores (CUNICO *et al.*, 2008).

Nos tipos de planejamento fatorial onde $k > 2$, os níveis são costumeiramente codificados com os sinais (+) e (-), a atribuição aos níveis superiores ou inferiores se dá de forma arbitrária e não interfere na realização dos experimentos ou interpretação dos resultados. Estes sinais também permitem esquematizar estas variáveis na forma de matrizes de planejamento, assim como determinar, por meio de cálculos, a influência das mesmas e das suas interações no sistema (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

A este tipo de experimentos podem ser incluídos experimentos no centro do planejamento, normalmente entre 3 e 5, podendo ser aplicada para variáveis quantitativas e qualitativas. A partir das repetições realizadas é possível obter a média e a variância das replicatas, facilitando a estimativa do erro padrão para os efeitos, que é o mesmo, tanto para os efeitos principais quanto para os de interação (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Uma das vantagens de utilizar o planejamento 2^4 é que podemos calcular, além da média global dos efeitos, outros quinze: quatro efeitos principais, seis interações de dois fatores, quatro interações de três fatores e uma interação de quatro fatores. Em geral, podemos esperar que a importância de uma interação para um modelo decresça com o número de fatores envolvidos na sua definição (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

A metodologia de superfícies de resposta (RSM, do inglês *Response Surface Methodology*) é uma ferramenta de otimização baseada em planejamentos fatoriais e apresenta duas etapas distintas: modelagem e deslocamento, as quais são repetidas tantas vezes quanto necessário, com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada. A modelagem é normalmente feita ajustando-se modelos simples (em geral, lineares ou quadráticos) a respostas obtidas com planejamentos fatoriais ou planejamentos fatoriais ampliados. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

2.7 Validação

A validação de um método analítico é um requisito importante para a prática da análise química para garantir o fornecimento de dados com a qualidade exigida e, por esta razão, tem recebido uma atenção considerável na literatura e agências reguladoras. Os resultados da validação do método podem ser utilizados para julgar a qualidade, a confiabilidade e a consistência dos resultados analíticos (RAMBLA-ALEGRE *et al.*, 2012).

De acordo com LANÇAS (2004), validação é o ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal. Visa diminuir os fatores que levam a imprecisão ou inexatidão de um dado gerado. Ainda, segundo Ribani *et al.* (2004), é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência.

No Brasil, a ANVISA, com a Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, bem como o INMETRO com o decreto DOQ-CGCRE-008 (revisão 04) de 2011 estabelecem guias para validação de processos analíticos, assim como os órgãos internacionais: Conferência Internacional em Harmonização (ICH, 2005), União Internacional de Química Pura e Aplicada - IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002) e SANCO (Saúde e Proteção do Consumidor, do francês *Santé et protection des consommateurs*) (2011).

Os parâmetros envolvidos no processo de validação de métodos analíticos avaliados neste trabalho foram: curva analítica e faixa linear, efeito matriz, seletividade, exatidão, precisão (repetitividade e precisão intermediária), limite de detecção e de quantificação.

2.7.1 Seletividade

Seletividade de um método é a capacidade que o mesmo possui de medir exatamente um analito em uma mistura complexa sem a interferência de outros componentes presentes (RAMBLA-ALEGRE *et al.*, 2012). A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se ela não for assegurada, a faixa linear, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI *et al.*, 2004).

2.7.2 Curva Analítica e Faixa Linear

É a capacidade de uma técnica analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (RIBANI *et al.*, 2004).

Este parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação da curva analítica. Um coeficiente de correlação (r) maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI *et al.*, 2004). É aceito pela ANVISA um coeficiente de correlação de 0,99 (ANVISA, 2003).

Pode-se utilizar do coeficiente de determinação (r^2) o qual é a porcentagem da variação da variável dependente (y) explicada pela variável independente (x), por exemplo, quando $r^2=0,99$ indica que as variáveis independentes explicam 99% da variação da variável independente (ANVISA, 2003).

A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é a Equação 1 (INMETRO, 2011):

$$y = ax + b \quad (1)$$

sendo:

y = resposta medida (área do pico);

x = concentração;

a = coeficiente angular - inclinação da curva analítica = sensibilidade;

b = coeficiente linear - interseção com o eixo y , quando $x = 0$.

O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação (a). A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (INMETRO, 2011).

Em determinado momento percebe-se que o modelo de regressão linear é incapaz de descrever adequadamente os dados do modelo, assim, faz-se uso do

modelo quadrático. Uma regressão quadrática consiste em determinar um polinômio de segundo grau que se ajuste aos dados disponíveis (UFCG, 2013).

2.7.3 Efeito Matriz

O efeito matriz é observado como um aumento ou diminuição na resposta do detector na presença do analito no extrato da matriz comparado com o mesmo analito presente em solvente orgânico. Quando o resultado for acima de 10% considera-se que o efeito matriz começa a exercer influência nas análises (PIZZUTI *et al.*, 2007; PINHO *et al.*, 2009).

Segundo Krueve *et al.* (2008), a alteração da eficiência de ionização, na presença de outros compostos é denominada efeito matriz. Os compostos que causam o efeito matriz podem aparecer como picos cromatográficos normais ou como bandas largas. A interferência de um composto que elui como um pico cromatográfico geralmente distorce a forma do pico do analito. Esta influência pode não ser visualmente detectada, sendo mais facilmente identificada por meio de cálculos.

O efeito matriz sofre variações ao longo do tempo e varia dependendo da condição do instrumento utilizado, devendo, ser constantemente avaliado, tanto na etapa de desenvolvimento do método quanto na aplicação em análises de rotina (PRESTES, 2011). A avaliação exata do efeito matriz pode evitar estimativas errôneas das quantidades dos analitos, além de ser mais confiável (RIBANI *et al.*, 2004).

2.7.4 Limites de Detecção e Quantificação

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis de concentração é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2011).

Segundo Ribani *et al.* (2004), o limite de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. Já o limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of*

Quantification) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, com um grau aceitável de confiança, utilizando um determinado procedimento experimental.

Existem três modos de calcular LOD e LOQ: pelo método visual, pelo método relação sinal-ruído ou, pelo método baseado em parâmetros da curva analítica. O método mais utilizado é o da relação sinal-ruído, porém em técnicas analíticas de separação, como as cromatográficas, a medição do ruído é às vezes subjetiva, uma vez que a curva analítica é construída a partir do valor das áreas dos picos e não a partir da altura dos picos. Assim, é importante utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável (RIBANI *et al.*, 2004).

2.7.5 Precisão

A precisão mede o quão bem os resultados obtidos se assemelham entre si. Descreve a reprodutibilidade das medidas – em outras palavras, a proximidade entre os resultados que foram obtidos exatamente da mesma forma (LANÇAS, 2004).

Normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição, as três formas mais comuns de expressá-la são: por meio da repetibilidade, precisão intermediária e da reprodutibilidade. A precisão é avaliada através do desvio padrão absoluto (σ), o qual utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s), sendo a precisão usualmente expressa em termos de desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV) (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2011).

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição: procedimento; observador; instrumento usado sob mesmas condições; local, e repetições no menor espaço de tempo possível (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2011).

Precisão intermediária tem por objetivo verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados. Refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no

mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas; diferentes equipamentos; diferentes tempos (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2011).

Reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas: operador, local, equipamentos, etc. Refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios (interlaboratorial) e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2011).

Para métodos empregados em nível de análise de traços ou impurezas, valores de desvio padrão relativo de até 20% são aceitos, dependendo da complexidade da amostra (SANCO, 2011).

2.7.6 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão (RIBANI *et al.*, 2004).

A exatidão representa a existência de erros sistemáticos, e é um dos critérios mais importantes para o julgamento do desempenho de um método analítico. Segundo o *Codex Alimentarius*, na indisponibilidade de material de referência certificado, a exatidão pode ser avaliada através dos ensaios de fortificação e recuperação (PRESTES, 2011).

A limitação deste procedimento é o fato de o analito adicionado não estar necessariamente na mesma forma que na amostra. Assim, a presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável poderia ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação (INMETRO, 2011).

Valores aceitos de recuperação para a análise de substâncias a nível de traços estão na faixa de 70 a 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Entretanto, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (RIBANI *et al.*, 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho proposto consistiu na otimização e validação de um método de preparo de amostra para extração de agrotóxicos em amostras de pimentão verde, seguida, pela detecção e quantificação destes por UHPLC-MS/MS.

Durante o processo de validação avaliou-se os seguintes parâmetros analíticos: faixa linear, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão, limites de detecção e quantificação e efeito matriz.

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

3.1 Instrumentação

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados abaixo:

- ✓ Sistema de purificação de água, Milli-Q Direct UV3R (Millipore, Bedford, MA, EUA);
- ✓ Lavadora ultrassônica, linha Soniclean (Sanders do Brasil, MG, Brasil);
- ✓ Centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- ✓ Centrífuga (Centribio, Brasil);
- ✓ Agitador Vortex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ✓ Processador de Alimentos VariMix (Targo, Espanha);
- ✓ Balança analítica de precisão AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- ✓ Balança analítica de precisão UX-420H (Shimadzu, Japão);
- ✓ Micropepitadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- ✓ Sistema UHPLC-MS/MS, modelo Xevo TQ (Waters, EUA), contendo analisador TQ MS, amostrador automático sample manager (Acquity);
- ✓ Coluna analítica ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 1,7 µm - 2,1 x 50 mm;
- ✓ Sistema de aquisição de dados MassLynx V 4.1;
- ✓ Sistema gerador de nitrogênio, modelo SF2FF (Atlas Copco, EUA),
- ✓ Gás argônio 6.0 usado como gás de colisão no sistema UHPLC-MS/MS.

3.2 Reagentes, solventes e demais materiais utilizados

Os reagentes, solventes e demais materiais utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados abaixo:

- ✓ Acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt, NJ, EUA);
- ✓ Ácido acético glacial 100% (J. T. Baker, EUA);
- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3R (resistividade de 18,2 M Ω cm);
- ✓ Metanol, grau HPLC (Mallinckrodt, NJ, EUA);
- ✓ Formiato de amônio (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas de rosca com capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ✓ Microtubo, tipo eppendorff, capacidade 2 mL (Axygen Scientific; Califórnia, EUA);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro p.a. (J.T. Baker, Japão);
- ✓ Cloreto de sódio p.a. (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- ✓ Acetato de sódio anidro (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Citrato de sódio diidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Hidrogenocitrato de sódio sesquiidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Sorvente Bondesil C₁₈ com d.p. de 40 μ m (Agilent, EUA);
- ✓ Sorvente Bondesil PSA com d.p. de 40 μ m (Agilent, EUA);
- ✓ Carvão Supelclean ENVI-Carb d.p. 105-125 μ m (SUPELCO, EUA; fornecedor: Sigma-Aldrich, Brasil);
- ✓ Chromosorb W-HP, d.p. 125-150 μ m (Merck, Brasil);
- ✓ Chromosorb P, d.p. 150-178 μ m (Johns Manville, Colorado, EUA);
- ✓ Fase fluorada, d.p. 35-70 μ m, diâmetro de poro 60 nm, 9% de Carbono (Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, Brasil);
- ✓ Cartuchos para SPE Oasis HLB[®] 60 mg/3 mL, d.p. 30 μ m (Waters, EUA);
- ✓ Cartuchos para SPE Strata X[®] 500 mg/6 mL, d.p. 33 μ m (Phenomenex, EUA);
- ✓ Acetona grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- ✓ Hexano (95% n-hexano) (J.T. Baker, EUA);

- ✓ Filtros de nylon de 13 mm e porosidade de 0,2 μm (Vertical Chromatography, Tailândia);
- ✓ Frascos de vidro (vial), capacidade de 2 mL (Agilent, EUA);
- ✓ Extran[®] neutro e alcalino (Merck, Brasil);
- ✓ Padrões sólidos dos compostos em estudo (Tabela 5);
- ✓ Vidraria comum de laboratório.

3.3 Processamento da Amostra

As amostras “branco” de pimentão verde utilizadas para otimização e validação do método de preparo de amostra proposto neste trabalho, foram cultivadas isentas de agrotóxicos, na cidade de Ernestina-RS.

O processamento foi realizado conforme o *Codex Alimentarius*, onde uma porção de 1 kg de pimentão com as sementes e sem o talo foi cortada em pedaços e, então, processada com auxílio de um processador VariMix. A amostra processada foi acondicionada em potes de 200 mL sob refrigeração, em temperatura abaixo de -4 °C, até sua utilização.

3.4 Seleção do Padrão Interno e do Padrão de Controle (ou substituição)

Padrão Interno (PI) e Padrão de Controle (PC), também chamado de substituição, são adicionados em diferentes estágios do procedimento analítico, e tem o objetivo de assegurar a execução correta do procedimento de extração e de análise para cada amostra no sistema cromatográfico, auxiliando assim, a localização de fontes de erros (SANCO, 2011).

Como padrão interno utilizou-se o composto trifenilfosfato (TPP), tendo como base o trabalho desenvolvido por Anastassiades *et al.* (2003) para análises utilizando QuEChERS, apenas para a avaliação do instrumento, aceitando-se valores de variação de área de 20%. No extrato final (1 mL) foi adicionado 20 μL de uma solução 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, resultando na concentração final de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Como padrão de controle utilizou-se linuron d-6, para a avaliação do procedimento de extração, nas mesmas concentrações empregadas para avaliação dos ensaios de recuperação (10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

3.5 Preparo das soluções analíticas dos compostos selecionados

Os compostos selecionados para este estudo foram adquiridos da empresa Dr. Ehrenstorfer (Ausburg, Alemanha) e estão listados na Tabela 5, juntamente com a classe, grupo químico e pureza do padrão sólido (P. S.).

Tabela 5 - Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico e fórmula molecular.

Composto	Classe (s)	Grupo Químico	Pureza (%)
3-OH Carbofurano	Inseticida	Carbamato (precursor de)	97,0
Acefato	Inseticida	Organofosforado	99,0
Acetamiprido	Inseticida	Neonicotinóide	99,0
Ametrina	Herbicida	Triazina	99,0
Atrazina	Herbicida	Triazina	99,5
Azaconazol	Fungicida	Triazol	98,0
Azoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	99,0
Benomil	Fungicida	Benzimidazol	98,0
Boscalida	Fungicida	Anilida	99,5
Bromoconazol	Fungicida	Triazol	98,8
Buprofezina	Inseticida e acaricida	Tiadiazinona	99,0
Butóxido de piperonil	Inseticida	Piretróide	92,5
Carbaril	Inseticida	Metilcarbamato de naftila	98,5
Carbendazim	Fungicida	Benzimidazol	99,0
Carbofurano	Inseticida, cupinicida, acaricida e nematocida	Metilcarbamato de benzofuranila	98,5
Cianazina	Herbicida	Triazina	99,0
Ciproconazol	Fungicida	Triazol	99,0
Clomazone	Herbicida	Isoxazolidinona	95,5
Clorantraniliprole	Inseticida	Antranilamida	94,5
Clorbromurom	Herbicida	Uréia	98,3
Clorpirifós etílico	Inseticida, formicida e acaricida	Organofosforado	99,5
Clotianidina	Inseticida	Neonicotinóide	99,5
Deltametrina	Inseticida e formicida	Piretróide	99,0
Diazinona	Inseticida	Organofosforado	96,0
Difenoconazol	Fungicida	Triazol	99,0
Dimetoato	Inseticida e acaricida	Organofosforado	98,0
Dimoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	99,0
Diuron	Herbicida	Uréia	97,5
Dodemorfe	Fungicida	Morfolina	98,0
Epoconazol	Fungicida	Triazol	99,0
Etiofencarbe sulfona	Inseticida	Metilcarbamato (precursor de)	98,0
Etiofencarbe sulfóxido	Inseticida	Metilcarbamato (precursor de)	98,5
Etoprofós	Nematocida e inseticida	Organofosforado	93,0

(continuação)

Composto	Classe (s)	Grupo Químico	Pureza (%)
Fembuconazol	Fungicida	Triazol	99,0
Fempropatrina	Inseticida e acaricida	Piretróide	99,5
Fempropimorfe	Fungicida	Morfolina	94,5
Fluasifope-P-butílico	Herbicida	Ácido ariloxifenoxipropiônico	97,0
Flusilazole	Fungicida	Organosiliconado	99,5
Flutolanil	Fungicida	Carboxamida	99,0
Flutriafol	Fungicida	Triazol	99,5
Furatiocarbe	Inseticida	Metilcarbamato de benzofuranila	99,0
Imazalil	Fungicida	Imidazol	97,5
Iprovalicarbe	Fungicida	Carbamato	97,5
Linurom	Herbicida	Uréia	99,4
Linurom d6 - PC	Herbicida	Uréia	99,9
Mefosfolan	Inseticida	Fosforamidato	97,0
Mepronil	Fungicida	Carboxamida	99,0
Metalaxil-M	Fungicida	Acilalaninato	99,5
Metobromuron	Herbicida	Uréia	98,0
Metolacloro	Herbicida	Cloroacetamida	97,0
Metoxurom	Herbicida	Uréia	99,5
Mevinfós	Inseticida e acaricida	Organofosforado	92,0
Monocrotofós	Inseticida	Organofosforado	97,5
Monolinurom	Herbicida	Uréia	99,0
Ometoato	Inseticida e acaricida	Organofosforado	98,0
Paraoxon etílico	Inseticida	Organofosforado	99,0
Pencicurom	Fungicida	Feniluréia	99,5
Penconazol	Fungicida	Triazol	99,2
Picoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	98,5
Piraclostrobina	Fungicida	Estrobilurina	97,5
Pirazofós	Fungicida e inseticida	Fosforotioato de heterociclo	97,0
Piridafentiona	Inseticida e acaricida	Organofosforado	99,0
Pirifenox	Fungicida	Piridina	96,5
Pirimetanil	Fungicida	Anilinopirimidina	98,3
Pirimifós etílico	Inseticida	Organofosforado	98,5
Pirimifós metílico	Inseticida e acaricida	Organofosforado	99,0
Profenofós	Inseticida e acaricida	Organofosforado	98,0
Propanil	Herbicida	Anilida	99,5
Propiconazol	Fungicida	Triazol	97,5
Simazina	Herbicida	Triazina	98,0
Tebuconazol	Fungicida	Triazol	98,0
Tebufenozida	Inseticida	Diacilhidrazina	97,0
Tebufenpirade	Inseticida e Acaricida	Pirazol	98,0
Terbufós	Inseticida e nematocida	Organofosforado	94,0

(continuação)

Composto	Classe (s)	Grupo Químico	Pureza (%)
Terbutilazina	Herbicida	Triazina	99,0
Tetraconazol	Fungicida	Triazol	97,5
Tiabendazol	Fungicida	Benzimidazol	99,0
Tiacloprido	Inseticida	Neonicotinóide	99,7
Tiametoxam	Inseticida	Neonicotinóide	99,7
Tiobencarbe	Herbicida	Tiocarbamato	98,0
Tiofanato-metílico	Fungicida	Benzimidazol (precursor de)	99,0
	Inseticida, acaricida e		
Triazofós	nematicida	Organofosforado	81,0
Trifenilfostato - PI	Inseticida	Organofosforado	99,5
Trifloxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	99,0
Triflumizol	Fungicida	Imidazol	98,0

As estruturas moleculares destes compostos estão apresentados no Anexo A.

PI: padrão interno e PC: padrão de controle.

Preparou-se 10 mL das soluções estoque individuais de cada composto, na concentração de 1000 mg L^{-1} , e levando-se em consideração a pureza de cada padrão calculou-se a massa a ser pesada e posteriormente diluída no solvente (acetonitrila). A partir destas soluções, preparou-se uma mistura na concentração 5 mg L^{-1} . As soluções estoque foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura abaixo de $-4 \text{ }^\circ\text{C}$. Apenas a solução estoque individual do composto carbendazim foi preparada com acetonitrila 8% HCl (v/v).

A partir da mistura $5,0 \text{ mg L}^{-1}$, foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações de 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 100,0; 250,0; 500,0 e $1000,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ em solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz (pimentão). Para injeção no sistema UHPLC-MS/MS, foram realizadas diluições na proporção 1:4 (v/v) destas soluções em água ultrapura de modo que as concentrações finais das soluções foram 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 20,0; 50,0; 100,0 e $200,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

3.6 Otimização do Sistema Cromatográfico UHPLC-MS/MS para a Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Pimentão

A Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC) é uma técnica que apresenta como vantagens a diminuição considerável no tempo de análise, a facilidade de transferência de um método desenvolvido originalmente em HPLC, uma grande variedade de colunas, de equipamentos e de detectores disponíveis

comercialmente, indicando que, possivelmente, num futuro próximo, ela venha a superar a HPLC em análises de rotina (MALDANER & JARDIM, 2012).

3.6.1 Escolha da Fase Móvel

A fim de melhorar a ionização dos compostos analisados neste trabalho, através do sistema UHPLC-MS/MS, inicialmente utilizou-se o ácido fórmico como modificador químico da fase móvel, porém observou-se que para alguns compostos obteve-se resposta com sinais mais adequados ao utilizar formiato de amônio em conjunto com o ácido fórmico. Assim, a fase móvel empregada consistiu em: A) solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) e formiato de amônio 5 mmol L⁻¹ e B) solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) e formiato de amônio 5 mmol L⁻¹ em metanol, conforme gradiente descrito na Tabela 6. O tempo total de corrida foi de 10 minutos.

Tabela 6 - Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de agrotóxicos em pimentão no sistema UHPLC-MS/MS.

Tempo (min)	%A	%B
Inicial	95	5
0,25	95	5
7,75	0	100
8,5	0	100
8,51	95	5
10	95	5

Vazão constante de 0,225 mL min⁻¹.

3.6.2 Condições utilizadas no sistema UHPLC-MS/MS

Os parâmetros utilizados no sistema UHPLC-MS/MS foram aqueles otimizados previamente no LARP-UFSM, através de planejamento experimental. Abaixo estão descritas as condições utilizadas para a otimização do método e análise dos agrotóxicos em amostras de pimentão.

- ✓ Temperatura da coluna: 40 °C;
- ✓ Pressão: 15000 psi;
- ✓ Voltagem capilar: 2,0 kV;
- ✓ Temperatura de dessolvatação: 500 °C;
- ✓ Vazão do gás de dessolvatação (N₂): 600 L h⁻¹;

- ✓ Vazão do *spray*: 80 L h⁻¹;
- ✓ Vazão do gás colisão: 0,15 mL min⁻¹;
- ✓ Temperatura da fonte: 150 °C;
- ✓ Volume de injeção: 10 µL;
- ✓ Tempo de residência (*dwell time*): 0,01 s.

Para obtenção das condições ótimas de análise de cada um dos compostos em estudo, foram realizadas injeções diretas no modo combinado, ou seja, sem a coluna e na presença da fase móvel no espectrômetro de massas, com solução analítica padrão 0,5 mg L⁻¹ de cada composto.

Os íons característicos de cada composto selecionados foram monitorados no modo SIM no quadrupolo (Q1) e no quadrupolo 3 (Q3) foi realizada varredura do íon produto variando as energias de colisão, a fim de otimizar as melhores condições de detecção. A partir deste estudo prévio, selecionou-se o modo de ionização da fonte (eletrobulização positiva em todos os casos), voltagem do capilar, energias de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos.

Após, foram avaliadas as transições, no modo de SRM a serem utilizadas para a quantificação (transição de maior intensidade) e confirmação (transição de segunda maior intensidade) dos compostos estudados.

3.7 Otimização do Método QuEChERS Modificado para a Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Pimentão

O método de preparo de amostra proposto neste trabalho foi otimizado com base em trabalhos da literatura para determinação multirresíduo de agrotóxicos em hortaliças, sendo propostos diferentes testes de extração e limpeza do método QuEChERS, através da realização de testes prévios e uma etapa de planejamento experimental, a fim de avaliar-se melhor os resultados.

3.7.1 Testes preliminares

Os testes preliminares, de acordo com a Tabela 7, que tiveram por objetivo encontrar as melhores condições de extração e limpeza, previamente ao planejamento experimental, foram pensados em função de trabalhos encontrados na

literatura que relatam a utilização do método QuEChERS original e modificado. Para tal, realizou-se ensaios com base na recuperação em triplicata no nível de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e avaliados em relação a uma curva analítica na matriz de 8 pontos ($0,5$ a $200 \mu\text{g L}^{-1}$), uma vez que os compostos presentes no método apresentam diferentes faixas lineares.

Tabela 7 - Relação dos testes preliminares realizados para análise dos compostos selecionados.

Teste	Etapa de Extração	Etapa de Limpeza
T1	10 g de amostra + 10 mL MeCN → agitação em vortex por 1 min + 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl → agitação manual por 1 min → centrifugação 3400 rpm/8 min/10 °C	1 mL do extrato + 150 mg MgSO ₄ + 30 mg PSA → agitação em vortex por 1 min → centrifugação 1000 rpm/4 min/10 °C
T2	10 g de amostra + 10 mL MeCN acidificada com 1% de CH ₃ COOH (v/v) → agitação em vortex por 1 min + 4 g MgSO ₄ + 1,5 g CH ₃ COONa → agitação manual por 1 min → centrifugação 3400 rpm/8 min/10 °C	
T3	10 g de amostra + 10 mL MeCN → agitação em vortex por 1 min + 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl + 1 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2 H ₂ O + 0,5 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 1,5 H ₂ O → agitação manual por 1 min → centrifugação 3400 rpm/8 min/10 °C	
T4	10 g de amostra + 10 mL MeCN → agitação em vortex por 1 min + 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl + 1 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2 H ₂ O + 0,5 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 1,5 H ₂ O → agitação manual por 1 min → centrifugação 3400 rpm/8 min/10 °C	1 mL do extrato + 150 mg MgSO ₄ + 30 mg Fase fluorada → agitação em vortex por 1 min → centrifugação 1000 rpm/4 min/10 °C
T5		1 mL do extrato + 150 mg MgSO ₄ + 30 mg Strata X [®] → agitação em vortex por 1 min → centrifugação 1000 rpm/4 min/10 °C
T6		1 mL do extrato + 150 mg MgSO ₄ + 25 mg PSA + 10 mg C ₁₈ → agitação em vortex por 1 min → centrifugação 1000 rpm/4 min/10 °C
T7		1 mL do extrato + 150 mg MgSO ₄ + 30 mg terra diatomácea A → agitação em vortex por 1 min → centrifugação 1000 rpm/4 min/10 °C
T8		1 mL do extrato + 150 mg MgSO ₄ + 25 mg PSA + 4 mg carvão ativado → agitação em vortex por 1 min → centrifugação 1000 rpm/4 min/10 °C
T9		1 mL do extrato + 150 mg MgSO ₄ + 30 mg terra diatomácea B → agitação em vortex por 1 min → centrifugação 1000 rpm/4 min/10 °C
T10		1 mL do extrato + 150 mg MgSO ₄ + 30 mg Oasis HLB [®] → agitação em vortex por 1 min → centrifugação 1000 rpm/4 min/10 °C

Terra diatomácea A: Chromosorb W-HP, d. p. 125-150 μm ;

Terra diatomácea B: Chromosorb P, d. p. 150-178 μm .

As estruturas moleculares dos sorventes utilizados na etapa de limpeza estão no Anexo B.

3.7.2 Planejamento Fatorial

Posteriormente aos testes preliminares, realizou-se o planejamento fatorial 2^4 , a fim de encontrar o procedimento que permitisse a extração adequada dos compostos selecionados para este trabalho e, então, de acordo com os resultados obtidos executar a validação.

Para realizar o planejamento experimental foram avaliados os testes em que um maior número de compostos obteve recuperação entre 70 e 120%, além de RSD (%) menor que 20. Além disso, levou-se em consideração a disponibilidade dos reagentes no laboratório, para dar sequência à otimização do método.

Assim, o planejamento experimental consistiu na variação de quatro fatores, com a geração de 27 ensaios: 16 ensaios com as quantidades projetadas, 3 de repetição do ponto central e outros 8 de extrapolações das quantidades.

3.8 Validação do Método QuEChERS Modificado para a Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Pimentão

O método QuEChERS modificado para a análise de resíduos de agrotóxicos em pimentão foi validado avaliando os parâmetros de: seletividade, curva analítica e faixa linear, limites de detecção e quantificação, exatidão através do ensaio de recuperação, precisão (repetitividade) e precisão intermediária, além da avaliação do efeito matriz.

3.8.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada por comparação dos cromatogramas obtidos com as injeções no sistema UHPLC-MS/MS de extratos de amostras “branco”, ou seja, ausente dos compostos do estudo, e da amostra fortificada com estes compostos. Este ensaio tem por objetivo avaliar a ocorrência de co-eluição de interferentes da matriz e de analitos de interesse.

3.8.2 Curva Analítica e Faixa Linear

A fim de verificar a faixa linear das curvas analíticas foi realizada a injeção em triplicata das soluções analíticas preparadas de acordo com o item 3.5, nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 20,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, tanto em solvente quanto no extrato da matriz.

A partir das curvas, avaliou-se através do coeficiente de determinação (r^2), qual o modelo de calibração mais adequado para ser utilizado, linear ou quadrático. Os dados de regressão foram obtidos com auxílio do *software* (MassLynx V 4.1) do equipamento.

3.8.3 Efeito Matriz

No desenvolvimento de um método analítico, os possíveis efeitos matriz na análise cromatográfica devem ser levados em consideração. Para isso são preparadas duas curvas analíticas com os mesmos pontos, sendo uma no solvente e uma no extrato “branco” da matriz.

Na avaliação do efeito matriz, realizou-se a comparação entre as áreas obtidas. Efetuou-se o cálculo através da Equação 2 (GOSETTI *et al.*, 2010; SANCO, 2011).

$$\text{Efeito matriz} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

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

X_2 = média das áreas da solução analítica de cada composto avaliado, preparado no solvente numa dada concentração.

Através deste cálculo, verifica-se se a matriz exerce efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (decréscimo de sinal) sobre o resultado da análise. Considera-se que quando o resultado for acima de 10% o efeito matriz começa a exercer influência nas análises e, então, recomenda-se a construção das curvas analíticas no extrato da matriz para minimizar o efeito (GOSETTI *et al.*, 2010; SANCO, 2011).

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

A partir da faixa linear das curvas analíticas, determinou-se o limite de detecção e de quantificação do instrumento (LOD_i e LOQ_i) para cada analito, levando em consideração a relação sinal ruído calculada pelo software do equipamento, considerando no mínimo 3 e 10 vezes a razão do sinal pela linha de base (ruído), respectivamente.

Como o método proposto apresenta etapa de diluição do extrato final, o limite adotado referente ao instrumento e ao método de preparo de amostra são diferentes. O LOD_i e LOQ_i instrumentais, são expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$. Já o limite de detecção e quantificação do método, LOD_m e LOQ_m respectivamente, podem ser obtidos multiplicando-se o valor de LOD_i e LOQ_i pelo fator obtido pelo método de extração, obtendo-se os valores de LOD_m e LOQ_m em $\mu\text{g kg}^{-1}$ (RIBANI *et al.*, 2004).

Entretanto, considera-se o valor verdadeiro do LOQ_m (em $\mu\text{g kg}^{-1}$), como sendo a menor concentração que, fortificada na matriz, apresente resultados de recuperações entre 70 e 120%, com RSD% menor ou igual a 20% (SANCO, 2011). Ainda, segundo recomendações da EU, mais rigorosa, o nível desejado de LOQ_m é de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Assim, para os compostos que não apresentaram resultados satisfatórios no nível de fortificação de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, fez-se um nível extra, de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$, para ser adotado como LOQ_m . O LOD_m foi obtido dividindo-se o valor de LOQ_m por 3,33.

3.8.5 Ensaios de Recuperação para Avaliação da Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através dos ensaios de recuperação, fortificando as amostras “branco” em quatro níveis de concentração (10; 25; 50 e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$). Foram realizadas 7 réplicas de extração para cada nível de fortificação e a exatidão, expressa em percentagem de recuperação foi calculada com auxílio do *software* (MassLynx V 4.1) do equipamento. Conforme recomendações do guia de validação do INMETRO (2011), o cálculo de recuperação é feito de acordo com a Equação 3.

$$\text{recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde:

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração usada para fortificação.

3.8.6 Precisão (repetitividade) e Precisão Intermediária

A precisão pode ser calculada através da fórmula do desvio padrão relativo (RSD), de acordo com a Equação 4.

$$RSD (\%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

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

x_i = valores individuais;

\bar{X} = média das medidas em replicatas;

n = número de medidas.

A precisão do método, em termos de repetitividade (RSD_r) foi avaliada efetuando a extração e análise das amostras fortificadas, sendo realizadas em replicata ($n=7$) para cada nível de concentração, injetada uma única vez.

A precisão intermediária (RSD_{pi}) do método foi avaliada realizando o procedimento analítico em dias diferentes, através da injeção da curva analítica e das amostras “branco” fortificadas no nível intermediário de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

3.9 Aplicação do Método

O método desenvolvido e validado foi aplicado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em 20 amostras de pimentão: 5 pimentões amarelos, 6 pimentões vermelhos e 9 pimentões verdes. As amostras foram adquiridas em supermercados e feiras de Santa Maria-RS, no mês de fevereiro de 2013.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Otimização do Sistema Cromatográfico UHPLC-MS/MS para a Determinação de Agrotóxicos em Pimentão

Foi utilizada a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em série (UHPLC-MS/MS), empregando analisador triploquadrupolo. As condições cromatográficas utilizadas foram estabelecidas de acordo com trabalhos realizados no LARP, conforme o item 3.6.

A Tabela 8 apresenta todos os agrotóxicos analisados por UHPLC-MS/MS, utilizando o modo de ionização ESI (+), no modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção (t_R), íons precursores e íons produto para quantificação e confirmação de cada analito em estudo.

Tabela 8 - Agrotóxicos analisados por UHPLC-MS/MS, utilizando o modo de ionização ESI (+), no modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção (t_R), íons precursores e produtos para a quantificação e confirmação.

Compostos	t_R (min)	Íon Precursor (m/z)	Voltagem do Cone (V)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Confirmação	
				Íon Produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	Íon Produto (m/z)	Energia de colisão (eV)
3-OH Carbofurano	3,47	238	25	163	16	181	10
Acefato	9,2	184,1	8	143	8	125,1	8
Acetamiprido	3,51	223	23	126	20	56,1	15
Ametrina	5,43	228,1	32	186,1	18	68,1	36
Atrazina	5,29	216,1	30	174,1	18	96,1	23
Azaconazol	5,5	300	25	152	28	131,1	18
Azoxistrobina	5,76	404	17	329	30	372	15
Benomil	6,66	291	13	160	28	192	16
Boscalida	5,94	342,9	32	307	20	139,9	20
Bromuconazol	6,15	376	32	158,9	35	70,1	25
Buprofezina	7,25	306,1	22	201	12	57,4	20
Butóxido de piperonil	7,31	356,3	17	119	37	176,9	11
Carbaril	4,93	202	19	145	22	117	28
Carbendazim	2,65	192,1	24	160,1	18	132,1	28
Carbofurano	4,73	222,11	25	165,1	16	123	16
Cianazina	4,47	241	28	214	17	96	25
Ciproconazol	6,23	292,2	27	125,1	24	70,2	18

(continuação)

Compostos	t _R (min)	Íon Precursor (m/z)	Voltagem do Cone (V)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Confirmação	
				Íon Produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	Íon Produto (m/z)	Energia de colisão (eV)
Clomazone	5,67	240	23	125	18	89	46
Clorantraniliprole	5,58	482	20	451	22	284	14
Clorbromurom	5,92	292,9	24	203,9	18	182	16
Clorpirifós etílico	7,45	349,9	27	97	32	198	20
Clotianidina	3,24	250	15	132	18	169	12
Deltametrina	7,76	523,1	16	281	18	506	11
Diazinona	6,69	305,1	20	96,9	35	169	22
Difenoconazol	6,97	406	37	251,1	25	111,1	60
Dimetoato	3,47	230,1	12	125	20	199	10
Dimoxistrobina	6,54	327,1	21	116,1	21	205,2	10
Diuron	5,46	233	27	72,1	18	46,3	14
Dodemorfe	5,57	282,1	31	116	21	98	28
Epoconazol	6,33	330	25	101	50	121,04	22
Etiofencarbe sulfona	3,09	258	19	107	18	201,1	5
Etiofencarbe sulfóxido	3,16	242,1	19	107,1	18	185,1	8
Etoprofós	6,35	243,2	18	97	31	131	20
Fembuconazol	6,42	337	29	125	36	70,1	20
Fempropatrina	7,46	350,1	15	97	34	125	14
Fempropimorfe	5,83	304,2	41	147,1	28	57,2	30
Fluasifope-P-butílico	7,19	384,1	27	282,1	22	328,1	16
Flusilazole	6,57	316	27	165	28	247	18
Flutolanil	6,02	324,1	23	65	40	262,1	18
Flutriafol	5,32	302,1	23	123,1	29	70,2	18
Furatiocarbe	7,2	383,2	22	194,9	18	252	12
Imazalil	5,32	297	31	159	22	69	22
Iprovalicarbe	6,22	321,1	19	119,06	16	203,1	10
Linurom	5,84	249,1	25	160,1	18	181,1	16
Linurom d6 (PC)	5,81	255,3	24	160	20	185,5	17
Mefosfolan	4,64	270,1	25	140	24	75,1	22
Mepronil	6,06	270,1	27	91	44	119	28
Metalaxil-M	5,41	280,1	15	192,1	17	220,1	13
Metobromuron	5,22	259,1	22	170	20	148,1	15
Metolacloro	6,4	284,1	17	176,1	25	252,1	15
Metoxurom	4,16	229	20	72	18	155,9	25
Mevinfós	3,94	225,1	13	127,1	15	193,1	8
Monocrotófós	2,81	224,1	15	127,1	16	98,1	12
Monolinurom	5,01	215,04	23	99	34	126,01	22

(continuação)

Compostos	t_R (min)	Íon Precursor (m/z)	Voltagem do Cone (V)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Confirmação	
				Íon Produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	Íon Produto (m/z)	Energia de colisão (eV)
Ometoato	1,88	214,1	16	125,1	22	183,1	11
Paraoxom etílico	5,27	276,1	28	220,1	17	248,2	16
Pencicurom	6,89	329,1	30	124,98	22	125,1	40
Penconazol	6,63	284	25	159	34	70,1	16
Picoxistrobina	6,48	368	10	145,1	22	205,1	10
Piraclostrobina	6,76	388,1	20	163	25	193,9	12
Pirazofós	6,8	374	33	194	32	222,1	22
Piridafentiona	6,13	341	31	189	22	92	34
Pirifenox	6,16	295	29	93,1	22	67,2	60
Pirimetanil	5,58	200	42	107	24	82	24
Pirimifós etílico	7,29	334,1	30	198,1	23	182,1	25
Pirimifós metílico	6,79	306,1	25	108,1	32	164,1	22
Profenofós	7,19	372,9	25	127,9	40	302,6	20
Propanil	5,88	217,9	31	161,9	16	127	22
Propiconazol	6,72	342	37	159	34	69	22
Simazina	4,65	202	34	96	22	124	16
Tebuconazol	6,66	308	31	70,1	22	125	40
Tebufenozida	6,48	353,1	12	133	20	297,1	8
Tebufenpirade	7,25	334	43	117	34	145	28
Terbufós	7,27	289	12	57,2	22	103	8
Terbutilazina	5,92	230	28	174	16	96	28
Tetraconazol	6,32	372	32	159	30	70,1	20
Tiabendazol	3,04	202	42	175	25	131	30
Tiacloprido	3,85	253	32	126	20	90,1	40
Tiametoxam	2,68	292	19	132	22	211,2	12
Tiobencarbe	6,88	258,2	21	125,1	17	100,1	12
Tiofanato metílico	4,63	343,1	23	151	21	311,1	11
Triazofós	6,16	314,1	22	161,9	35	118,9	18
Trifenilfosfato (PI)	6,72	327,2	40	152,1	37	215,2	28
Trifloxistrobina	6,99	409	25	145	40	186	16
Triflumizol	7,05	346	13	277,9	10	277,9	10

PI: padrão interno; PC: padrão de controle.

A Figura 9 apresenta cromatogramas obtidos a partir dos íon selecionados no modo de aquisição SRM para as soluções analíticas preparadas em (A) acetonitrila

e (B) no extrato da matriz de pimentão, ambas com os analitos na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$.

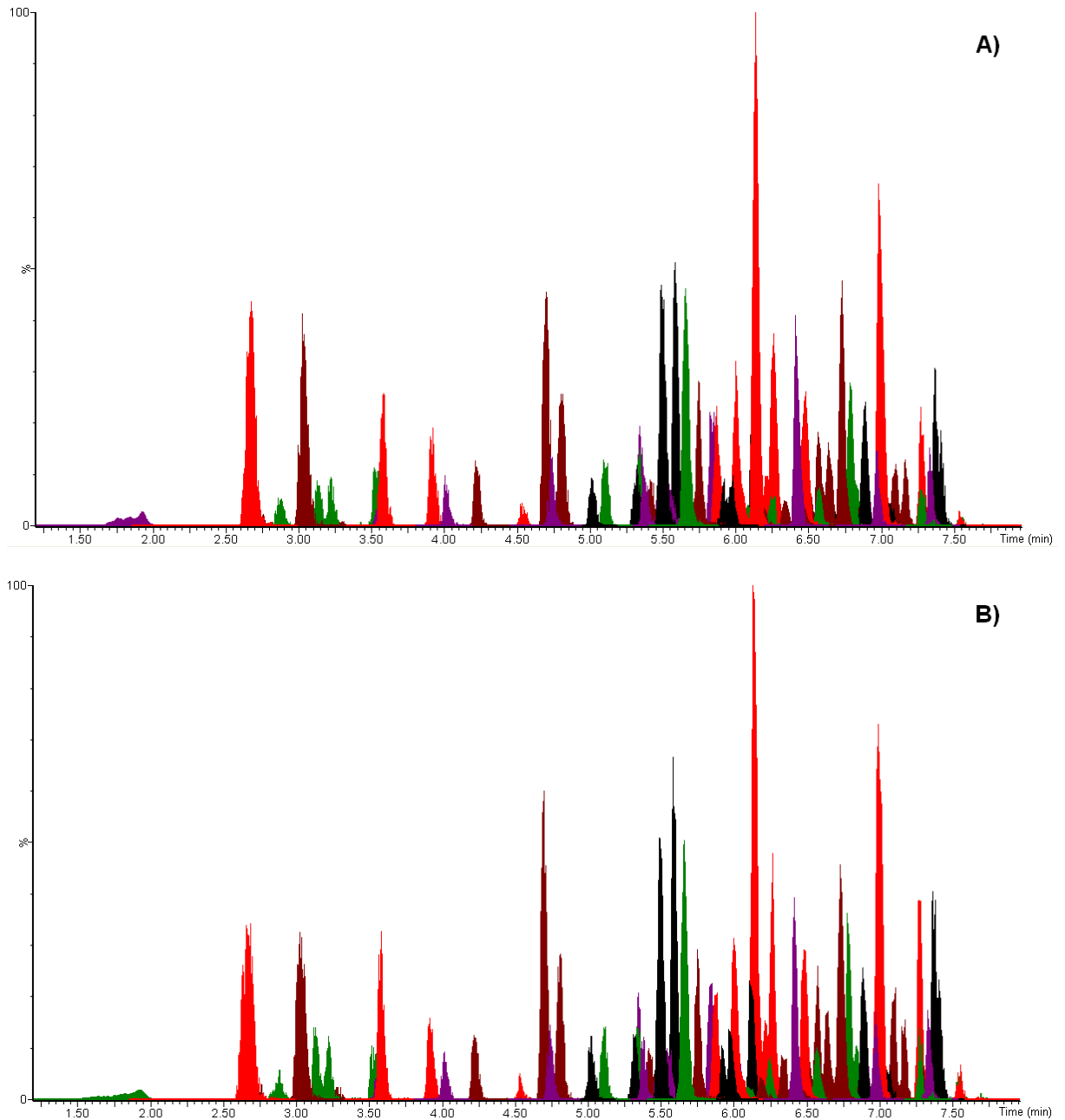


Figura 9 - Cromatogramas de todos os íons selecionados obtidos por UHPLC-MS/MS, a partir de soluções preparadas em acetonitrila (A) e no extrato da matriz de pimentão (B), na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$.

4.2 Otimização do Método QuEChERS para a Extração de Agrotóxicos em Pimentão

A otimização do procedimento de extração foi realizada no sistema UHPLC-MS/MS. Baseando-se na literatura foram inicialmente realizados onze testes para otimização da extração de agrotóxicos em pimentão, conforme a Tabela 7.

A Figura 10 apresenta os resultados dos três primeiros testes para avaliação da etapa de extração/partição, com o percentual de compostos com resultados adequados, avaliados em triplicata fortificando a matriz na concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$.

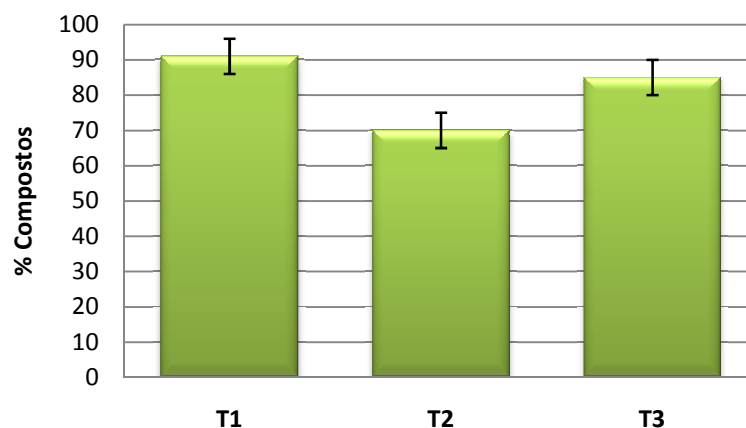


Figura 10 - Percentual de compostos que apresentaram recuperações médias entre 70 e 120% e RSD $\leq 20\%$ obtidos para os testes de extração.

Ao comparar os testes de extração/partição (T1, T2, T3), observou-se que foram obtidos resultados satisfatórios, ou seja, com recuperação média entre 70-120% e RSD $\leq 20\%$, para 70% dos compostos no teste T2, ao utilizar acetato de sódio e acetonitrila acidificada com ácido acético 1% (v/v). Quanto ao teste T3, empregando QuEChERS citrato, uma porcentagem menor de compostos (85%) apresentou resultados satisfatórios em comparação com T1. Desta forma, constatou-se que apenas a formação de tampão (pH 4,5-5,0), ao utilizar as modificações do método QuEChERS (acetato e citrato, respectivamente), não foi adequada para a extração dos compostos avaliados em pimentão.

Entretanto, o teste T1, utilizando cloreto de sódio, apresentou os melhores resultados, com 91% dos compostos apresentando resultados ideais de recuperação (70-120%) e RSD ($\leq 20\%$), uma vez que a amostra já apresentava pH em torno de 5,0. A utilização de NaCl influencia na recuperação, principalmente, de compostos

polares, sendo assim escolhido como um dos fatores a serem avaliados no planejamento experimental. Enquanto que o uso de acetonitrila como solvente de extração é interessante visto que proporciona a extração de uma ampla faixa de compostos com diferentes polaridades, além disso, uma menor quantidade de coextrativos lipofílicos provenientes da matriz, tais como ceras, gorduras e pigmentos são extraídos (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009).

Efetuuou-se um teste de extração utilizando o método QuEChERS acetato, empregando-se uma solução extratora composta de uma mistura de metanol e acetonitrila (1:1, v/v) acidificada com ácido acético 1% (v/v). Durante o teste, não foi observada a etapa de partição e este teste foi descartado.

Para avaliação da etapa de limpeza, diferentes combinações de sorventes foram testadas, conforme a Tabela 7. A Figura 11 apresenta os resultados para os compostos com recuperação e RSD% aceitáveis para cada teste de limpeza (de T3 a T10), realizados através de ensaios de fortificação (n=3), na concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$.

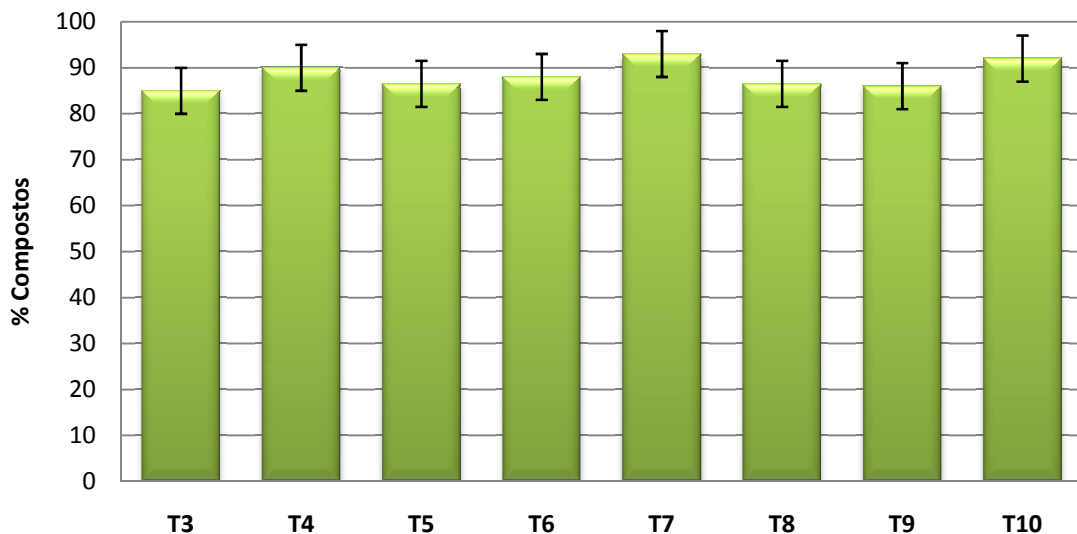


Figura 11 - Percentual de compostos que apresentaram recuperações médias entre 70 e 120% e RSD \leq 20% obtidos para os testes de limpeza.

Conforme os resultados, pode-se observar que entre os testes não houve grandes variações, girando em torno de 88% dos compostos com resultados adequados (recuperação entre 70-120% e RSD \leq 20%), onde tanto a utilização de apenas um sorvente quanto a combinação de dois mostrou-se eficiente. Ainda assim, analisou-se cada teste de forma distinta.

No teste T3, utilizando somente PSA, 85% dos compostos obtiveram resultados de recuperação adequados. Os bons resultados empregando PSA ocorrem por este ser um adsorvente de troca aniônica fraco, com a habilidade de remover ácidos graxos, açúcares, alguns pigmentos e outros coextratos da matriz que formam ligações de hidrogênio (MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004b).

Para o teste T4, no qual testou-se a fase fluorada, 90% dos compostos obtiveram resultados de recuperação adequados. Seu bom desempenho pode estar ligado às propriedades específicas das ligações entre carbono e flúor, que promovem um aumento no caráter dipolar da FE, o que intensifica a interação com compostos polares.

Os testes T5 e T10 empregaram sorventes poliméricos, Strata-X[®] e Oasis HLB[®], respectivamente. O percentual de compostos com resultados de recuperação adequados foi de 87% para T5 e 92% para T10. Apesar das estruturas dos dois sorventes apresentarem semelhanças, atribui-se os melhores resultados ao Oasis HLB[®] por este possuir maior capacidade de retenção em relação a outras fases poliméricas, uma vez que sua cadeia possui equilíbrio entre os monômeros hidrofílico (N-vinilpirrolidona) e lipofílico (divinilbenzeno), proporcionando uma capacidade maior de retenção de compostos polares.

Em relação aos testes T7 e T9, utilizou-se dois tipos de terra diatomácea, uma com diâmetro de partícula menor (125-150 μm) e outra com diâmetro de partícula maior (150-178 μm), respectivamente. A terra diatomácea empregada em T7 apresentou melhores resultados de recuperação (93%) em relação àquela utilizada em T9 (86%), o que pode ser explicado pela sua maior eficiência na retenção de pigmentos e coextrativos, por esta apresentar uma maior área superficial. Este fato somado às diferenças das características físico-químicas das partículas dos dois sorventes testados torna a eficácia da terra diatomácea A maior.

Quanto às suas propriedades físico-químicas, sabe-se que os dois sorventes testados podem também ser utilizados como FE para separações cromatográficas. Assim, enquanto a superfície da Chromosorb W (terra diatomácea A) é relativamente não-adsorptiva e é mais usada para a separação de compostos polares, sendo de alta qualidade por ser do tipo HP, a Chromosorb P (terra diatomácea B) é principalmente utilizada em separações cromatográficas de compostos

moderadamente polares, apesar de ter alto grau de adsorção e possuir alta quantidade de metais presentes e grupos hidroxila livres em sua estrutura.

Nos testes T6 e T8, testou-se em combinação com PSA dois sorventes bem conhecidos na literatura para limpeza de extratos no método QuEChERS, C₁₈ e carvão grafitizado. Os valores de porcentagem de compostos com resultados de recuperação adequados foram similares para ambos os testes. Enquanto o uso de C₁₈ (T6) resultou em 88%, para o carvão grafitizado (T8) este valor foi de 87%. Não sendo de grande significância a adição destes sorventes ao PSA quando comparados ao resultado obtido com apenas o PSA, além de requerer uma etapa a mais de pesagem para a etapa de limpeza, estes testes não foram considerados para a etapa de planejamento experimental.

Conforme todos os testes de limpeza, os melhores resultados foram obtidos com a fase fluorada, com a terra diatomácea A e com o sorvente polimérico Oasis HLB[®], todos acima de 90% dos compostos com valores adequados. Entretanto, como relatado anteriormente, os demais testes também apresentaram bons resultados e, para escolha dos sorventes a serem utilizados na etapa de planejamento experimental, teve-se que considerar outros fatores.

Apesar da fase fluorada ter apresentado ótimos resultados, a quantidade insuficiente para que se desse sequência à otimização do procedimento, juntamente com terra diatomácea A e Oasis HLB[®], fez com que se optasse pela utilização de PSA, um sorvente com ampla e bem estabelecida aplicação.

4.3 Planejamento Fatorial

O planejamento fatorial 2⁴ foi realizado utilizando quantidade de NaCl (0,5 a 2,5 g) na etapa de extração, e quantidade de sorvente PSA, Oasis HLB[®] e terra diatomácea A (0,0 a 40,0 mg) na etapa de limpeza. Manteve-se a quantidade de MgSO₄ para extração e limpeza fixos em 4,0 g e 150,0 mg (para 1,0 mL de extrato), respectivamente.

Dessa maneira foram gerados 27 ensaios a serem realizados para análise da superfície de resposta e escolha das condições ideais para extração e limpeza, conforme a Tabela 9, que também apresenta os resultados da porcentagem de compostos com recuperação entre 70-120%, realizados pela fortificação da matriz “branco” na concentração de 100 µg L⁻¹.

Tabela 9 - Ensaios gerados pelo planejamento fatorial 2⁴ e resultados de compostos (%) com recuperação entre 70-120%, com as variáveis (1) NaCl, (2) Terra diatomácea A, (3) PSA e (4) Oasis HLB®.

Ensaio	(1) NaCl (g)	(2) Terra diatomácea A (mg)	(3) PSA (mg)	(4) Oasis HLB® (mg)	% Compostos
1	1	10	10	10	71
2	2	10	10	10	73
3	1	30	10	10	78
4	2	30	10	10	76
5	1	10	30	10	78
6	2	10	30	10	80
7	1	30	30	10	75
8	2	30	30	10	82
9	1	10	10	30	83
10	2	10	10	30	82
11	1	30	10	30	81
12	2	30	10	30	76
13	1	10	30	30	79
14	2	10	30	30	70
15	1	30	30	30	74
16	2	30	30	30	78
17	1,5	20	20	20	76
18	1,5	20	20	20	75
19	1,5	20	20	20	75
20	0,5	20	20	20	80
21	2,5	20	20	20	79
22	1,5	0	20	20	58
23	1,5	40	20	20	80
24	1,5	20	0	20	82
25	1,5	20	40	20	76
26	1,5	20	20	0	57
27	1,5	20	20	40	65

De acordo com os resultados obtidos nos 27 ensaios do planejamento experimental, obteve-se primeiramente o gráfico dos efeitos de cada variável, com variância do erro padrão de $\pm 2,87$, obtido pela reprodução do ponto central.

Conforme a Figura 12, podemos observar que individualmente nenhuma variável é significativa (fora dos limites do erro padrão), mas ao modificarmos duas variáveis este efeito começa a se pronunciar. Para a combinação de duas variáveis 1 e 4, 2 e 4, 3 e 4 este efeito é negativo. Enquanto que para a combinação de três variáveis 1, 2 e 3; 2, 3 e 4 o efeito é positivo, demonstrando que o fator que tem mais influência sobre as etapas de extração e limpeza é a quantidade dos sorventes.

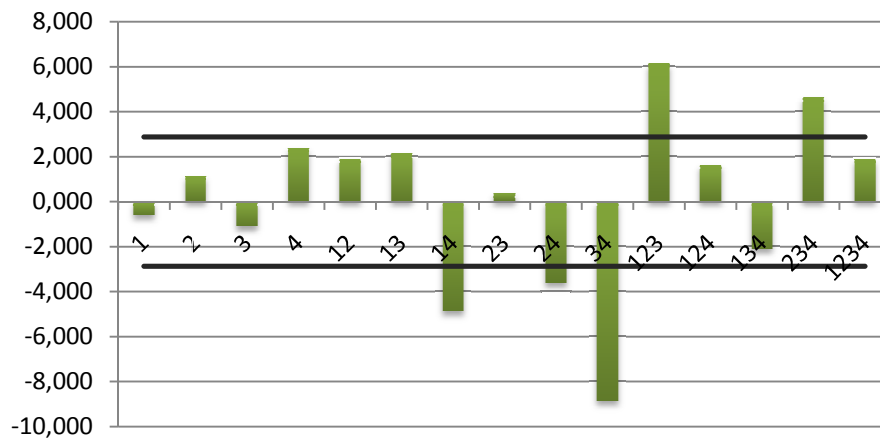


Figura 12 - Gráfico dos efeitos de cada variável: (1) NaCl, (2) Terra diatomácea A, (3) PSA e (4) Oasis HLB[®].

O planejamento também gerou 9 superfícies de resposta, conforme a Figura 13, onde o eixo x corresponde à quantidade de terra diatomácea A (mg), o eixo y à porcentagem de compostos com resultados adequados e o eixo z à quantidade de NaCl (g). Ainda, os gráficos na horizontal referem-se à mesma quantidade de PSA (mg) e na vertical à mesma quantidade de Oasis HLB[®] (mg).

A fim de analisar de modo geral as superfícies de resposta geradas, tomou-se como referência a quantidade de PSA. Assim, para o máximo de PSA (Figura 13: A, B e C) o maior número de compostos é alcançado quando há uma maior quantidade de NaCl, havendo pouca variação no número quando varia-se outro sorvente.

Já quando é utilizada uma quantidade intermediária de PSA (Figura 13: D, E e F) as variações para o maior número de compostos é ainda menor, podendo observar-se que alterando a quantidade de sorventes ou de NaCl, o número de compostos permanece o mesmo, sendo menor que no caso anterior.

Para o mínimo de PSA (Figura 13: G, H e I) o máximo de compostos é possível em quatro condições: com o máximo de Terra diatomácea A e o mínimo de NaCl; com o máximo de Oasis HLB[®] e o máximo de NaCl; com o máximo de Terra diatomácea A e Oasis HLB[®] e o mínimo de NaCl; com o máximo de Terra Diatomácea A, o mínimo de NaCl e uma quantidade intermediária de Oasis HLB[®].

Esses dados demonstram que, em geral, a média das recuperações e a porcentagem de compostos melhora conforme as quantidades de NaCl e sorvente para limpeza (independentemente de qual é ele) aumentam.

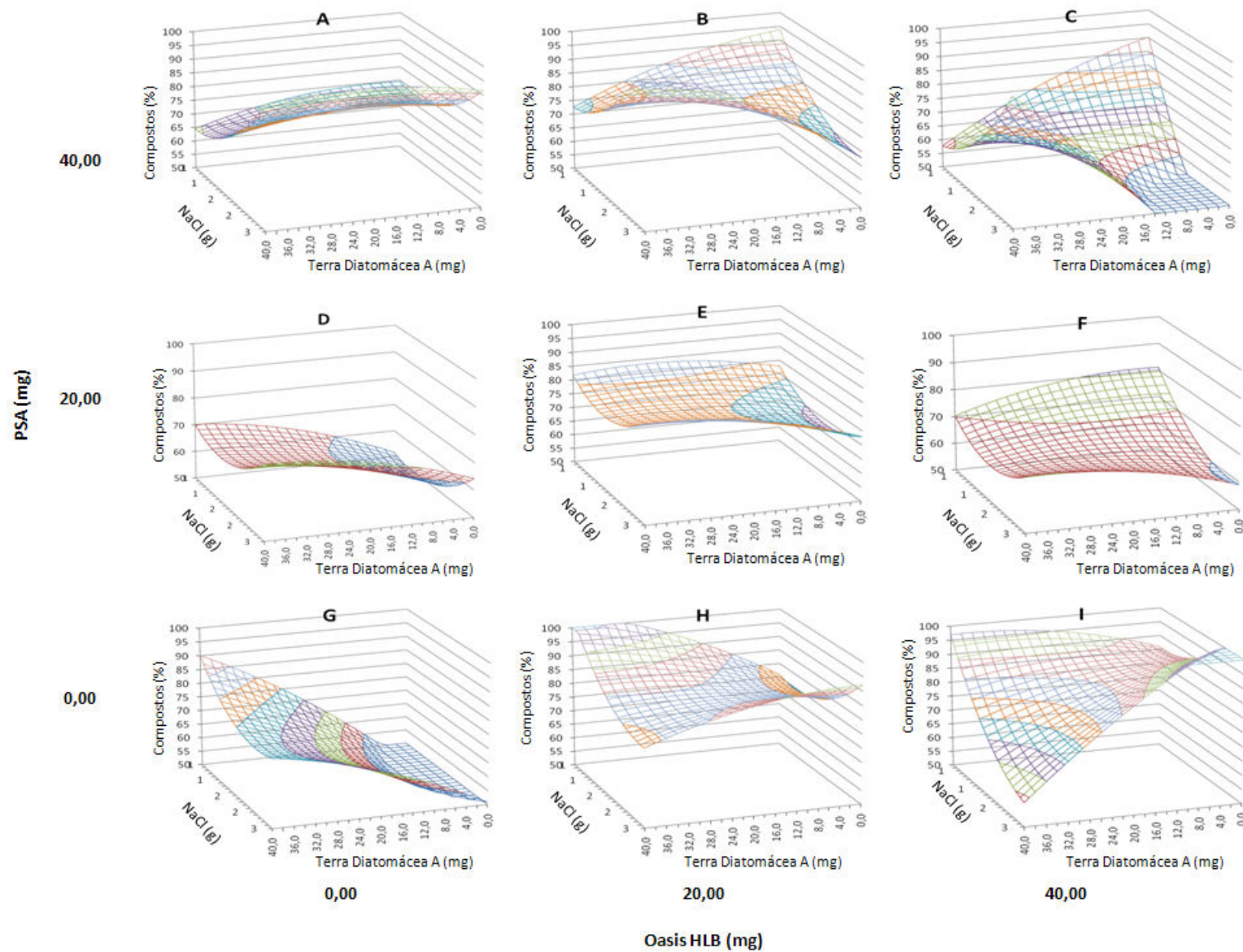


Figura 13 - Superfícies de resposta geradas pelo planejamento 2⁴, para otimização do método de extração de agrotóxicos em pimentão.

A terra diatomácea e o Oasis HLB[®] têm pouca aplicação como sorventes para d-SPE, sendo mais empregados em outras áreas da Química Analítica, o que torna sua aquisição dispendiosa para laboratórios de rotina, principalmente sorventes poliméricos, que geralmente só são vendidos em cartuchos e, além do alto preço, necessitam ser previamente retirados do cartucho. Comparando-se os preços de mercado atual, a relação entre os sorventes terra diatomácea/PSA/Oasis[®] seria de 1:80:1445 vezes. Apesar da terra diatomácea ser mais barata que os outros sorventes, uma vez que é utilizada frequentemente em escala industrial, esta não possui alta pureza, desejada em análises de resíduos, o que diminuiria a robustez do método.

Assim, o PSA, amplamente utilizado em análises de alimentos e que proporciona resultados reprodutíveis, foi escolhido como sorvente de limpeza. Escolhido o sorvente, pôde-se aprofundar a análise da superfície de resposta e obter a melhor condição onde utiliza-se somente o PSA.

Conforme a Figura 14, que refere-se à utilização de 40,0 mg de PSA e 0,0 mg de Oasis HLB[®], se acompanharmos o eixo x, onde o valor de terra diatomácea A também é de 0,0 mg, projeta-se que o máximo de compostos com resultados adequados é obtido também com a maior quantidade de sal (NaCl).

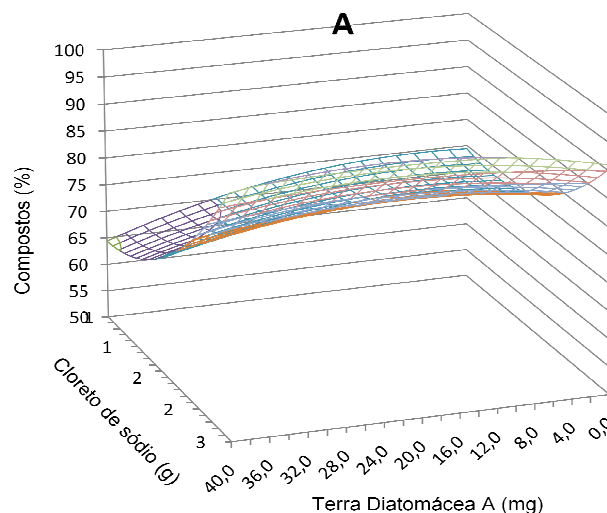


Figura 14 - Superfície de resposta gerada pelo planejamento 2^4 , para o máximo de PSA (40,0 mg) e o mínimo de Oasis HLB[®] (0,0 mg).

De acordo com Anastassiades *et al.* (2003), a quantidade de sal a ser utilizada deve ser otimizada, pois se for muito elevada pode acarretar na extração excessiva de coextrativos polares, diminuindo a recuperação dos analitos de interesse.

Dessa maneira, para comprovar a eficácia na extração, otimizou-se a quantidade de NaCl, através de testes fortificando o pimentão em uma concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. Observou-se que ao utilizar mais do que 1,5 g de NaCl não ocorreu a etapa de partição, devido à quantidade elevada de sal presente, sendo assim esta deve ser a quantidade máxima adotada de NaCl para o método em desenvolvimento.

A quantidade de PSA determinada para ser utilizada no método foi de 40 mg. Este valor mais elevado em relação ao método QuEChERS original (25 mg) é importante para limpeza do extrato de pimentão, uma vez que a matriz em estudo contém elevada quantidade de pigmentos e apresenta outros coextrativos, em sua maior parte carboidratos e açúcares. É importante ressaltar a necessidade de filtração dos extratos com filtros de porosidade de $0,25 \mu\text{m}$ e posterior diluição 1:4 (v/v) em água ultrapurificada, a fim de minimizar os danos ao equipamento UHPLC-MS/MS, como entupimento de tubulações e filtros.

4.4 Validação do Método QuEChERS Modificado Otimizado

A validação do método QuEChERS foi realizada utilizando UHPLC-MS/MS, seguindo o procedimento descrito em Figura 15, na qual foram avaliados os agrotóxicos relacionados na Tabela 8. Todas as soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz (pimentão) obtidos a partir de amostras “branco”. Dessa maneira, foi possível avaliar os parâmetros de validação de métodos cromatográficos.

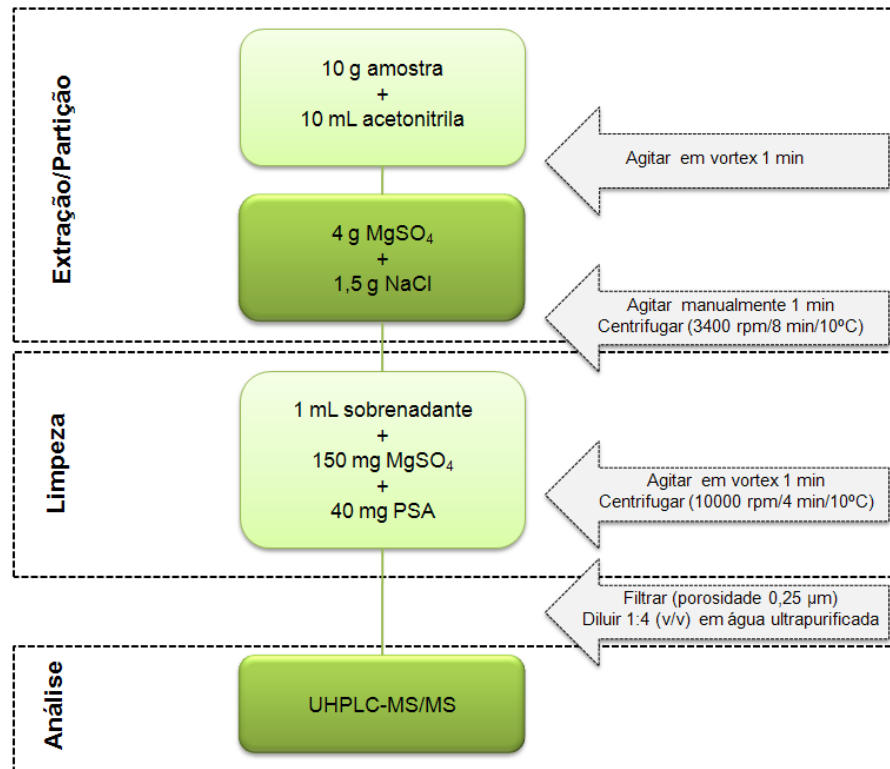


Figura 15 - Representação do método QuEChERS modificado utilizado para extração dos agrotóxicos nas amostras de pimentão.

4.4.1 Seletividade e Análise de Solventes e Reagentes

A seletividade do método foi assegurada, uma vez que não há interferentes com os mesmos íons de quantificação e confirmação nos mesmos tempos de retenção de cada agrotóxico nas amostras “branco”. Na matriz não foi verificada a presença dos analitos em estudo acima do LOD do método, utilizando-se, dessa forma, as amostras avaliadas para confecção da curva analítica e ensaios de fortificação.

Ainda, nas análises não foi observada variação da área do padrão interno (PI), trifenilfosfato (TPP), maior de 20%, assegurando os resultados obtidos com o instrumento.

4.4.2 Curva Analítica e Faixa Linear

A Tabela 10 apresenta os valores dos coeficientes de determinação (r^2), para as equações das curvas analíticas em solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz

de pimentão, bem como bem como a faixa linear de cada agrotóxico e as equações do modelo matemático de descrição da curva analítica.

Tabela 10 - Valores da faixa linear, coeficientes de determinação (r^2) das curvas analíticas em solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz (pimentão) e equação do modelo para a curva na matriz.

Compostos	Faixa de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2		Equação
		Solvente	Matriz	
3-OH Carbofurano	1 a 200	0,9914	0,9951	$0,0137879x^2+80,7535x-63,8986$
Acetamiprido	0,5 a 200	0,9945	0,9982	$1160,45x-261,156$
Ametrina	0,5 a 200	0,9983	0,9985	$1,27388x^2+782,288x-179,046$
Atrazina	0,5 a 200	0,9931	0,9922	$415,175x-232,76$
Azaconazol	0,5 a 200	0,9980	0,9925	$1814,68x+39,109$
Azoxistrobina	0,5 a 200	0,9950	0,9917	$850,148x-308,673$
Boscalida	0,5 a 200	0,9938	0,9964	$0,599886x^2+281,046x-173,646$
Bromuconazol	0,5 a 200	0,9937	0,9968	$-0,10109x^2+351,19x-146,488$
Buprofezina	0,5 a 200	0,9960	0,9955	$0,17299x^2+251,803x-104,775$
Butóxido de piperonil	0,5 a 200	0,9935	0,9956	$434,394x-36,8949$
Carbaril	0,5 a 200	0,9945	0,9946	$222,482x-95,0696$
Carbendazim	0,5 a 200	0,9984	0,9971	$-1,26353x^2+921,292x-243,499$
Carbofurano	0,5 a 200	0,9985	0,9983	$1,06019x^2+715,299x-263,933$
Cianazina	1 a 200	0,9955	0,9952	$0,097235x^2+73,0778x-23,3173$
Ciproconazol	0,5 a 200	0,9961	0,9956	$0,0725075x^2+288,052x-168,692$
Clomazone	0,5 a 200	0,9952	0,9956	$478,804x-185,141$
Clorantraniliprole	0,5 a 200	0,9939	0,9974	$0,209605x^2+168,235x-121,969$
Clorbromurom	0,5 a 200	0,9901	0,9937	$0,05627x^2+228,962x-151,956$
Clorpirifós etílico	0,5 a 200	0,9955	0,9950	$0,0680182x^2+108,308x-60,6696$
Clotianidina	2 a 200	0,9837	0,9917	$-0,0336923x^2+44,3482x-69,2865$
Diazinona	0,5 a 200	0,9956	0,9951	$938,617x-245,726$
Difenoconazol	2 a 200	0,9901	0,9924	$0,152234x^2+136,272x-104,615$
Dimetoato	0,5 a 200	0,9967	0,9966	$368,915x-67,8896$
Dimoxistrobina	0,5 a 200	0,9962	0,9957	$0,917056x^2+413,183x-146,421$
Diuron	0,5 a 200	0,9970	0,9973	$0,62235x^2+308,888x-90,4383$
Dodemorfe	0,5 a 200	0,9975	0,9968	$0,749359x^2+414,547x-199,653$
Epoconazol	1 a 200	0,9941	0,9979	$-0,263x^2+283,219x-190,62$
Etiofencarbe sulfona	0,5 a 200	0,9927	0,9947	$0,245959x^2+385,038x-102,454$
Etiofencarbe sulfóxido	0,5 a 200	0,9942	0,9955	$0,198061x^2+292,971x-128,891$
Etoprofós	0,5 a 200	0,9957	0,9950	$-0,347986x^2+935x-215,809$
Fembuconazol	0,5 a 200	0,9947	0,9955	$-0,119236x^2+285,927x-92,9739$
Fempropatrina	0,5 a 200	0,9940	0,997	$-0,00969399x^2+111,515x-88,1673$
Fempropimorfe	0,5 a 200	0,9966	0,9971	$0,806781x^2+709,529x-302,722$
Fluasifope-P-butílico	0,5 a 200	0,9930	0,995	$0,718418x^2+1120,86x-276,076$
Flusilazole	0,5 a 200	0,9904	0,9900	$0,0309411x^2+255,952x-183,62$
Flutolanil	0,5 a 200	0,9968	0,9975	$-0,789873x^2+608,65x-138,493$
Flutriafol	0,5 a 200	0,9906	0,9978	$285,991x-102,792$
Furatiocarbe	2 a 200	0,9925	0,9918	$0,160676x^2+110,279x-34,3807$

(continuação)

Compostos	Faixa de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2		Equação
		Solvente	Matriz	
Imazalil	0,5 a 200	0,9962	0,9968	$-0,0645644x^2+569,06x-262,961$
Iprovalicarbe	0,5 a 200	0,9769	0,9900	$0,0341587x^2+80,1248x-118,408$
Linurom	0,5 a 200	0,9975	0,9968	$0,494395x^2+330,554x-156,052$
Linurom d6 (PC)	0,5 a 200	0,9958	0,9956	$1,03031x^2+487,235x-137,059$
Mefosfolan	0,5 a 200	0,9969	0,9979	$1,36506x^2+1798,37x-476,982$
Mepronil	0,5 a 200	0,9984	0,9986	$-5,53737x^2+2670,77x-3392,588$
Metalaxil-M	0,5 a 200	0,9968	0,997	$0,658431x^2+427,166x-143,013$
Metobromuron	0,5 a 200	0,9971	0,9975	$0,548647x^2+332,249x-201,204$
Metolacloro	0,5 a 200	0,9947	0,9973	$1,08809x^2+536,364x-200,775$
Metoxurom	0,5 a 200	0,9912	0,9928	$372,673x-148,032$
Mevinfós	0,5 a 200	0,9971	0,9967	$0,0954457x^2+288,294x-83,9421$
Monocrotofós	0,5 a 200	0,9954	0,996	$251,138x-81,9737$
Monolinurom	0,5 a 200	0,9946	0,9978	$414,389x-136,825$
Ometoato	0,5 a 200	0,9971	0,9951	$0,133628x^2+181,327x-116,17$
Paraoxom etílico	0,5 a 200	0,9975	0,9955	$580,274x-119,068$
Pencicurom	0,5 a 200	0,9977	0,9958	$2482,01x-23,7278$
Penconazol	0,5 a 200	0,9969	0,9931	$1278,32x+101,341$
Picoxistrobina	0,5 a 200	0,9967	0,9930	$0,872781x^2+591,177x-286,226$
Piraclostrobina	0,5 a 200	0,9914	0,9981	$0,337888x^2+236,16x-51,5761$
Pirazofós	0,5 a 200	0,9957	0,9977	$0,499762x^2+210,255x-60,1101$
Piridafentiona	0,5 a 200	0,9825	0,9937	$462,655x-383,777$
Pirifenox	0,5 a 200	0,9893	0,9905	$391,808x-214,17$
Pirimetanil	0,5 a 200	0,9966	0,9985	$1812,97x-436,79$
Pirimifós etílico	0,5 a 200	0,9947	0,9960	$0,851641x^2+863,034x-285,158$
Pirimifós metílico	0,5 a 200	0,9960	0,9930	$0,545058x^2+672,985x-322,846$
Profenofós	0,5 a 200	0,9927	0,9952	$-0,288309x^2+210,109x-88,0377$
Propanil	0,5 a 200	0,9925	0,9939	$0,0268538x^2+176,855x-88,0884$
Propiconazol	0,5 a 200	0,9945	0,9954	$-0,416271x^2+554,679x-204,379$
Simazina	0,5 a 200	0,9936	0,9902	$309,861x-81,3952$
Tebuconazol	1 a 200	0,9939	0,9931	$0,730774x^2+246,804x-108,287$
Tebufenozida	1 a 200	0,9959	0,9968	$0,339638x^2+230,802x-174,488$
Tebufenpirade	0,5 a 200	0,9913	0,9916	$352,226x-27,2483$
Terbufós	2 a 200	0,9872	0,9931	$0,0540365x^2+26,5735x-7,41648$
Terbutilazina	0,5 a 200	0,9959	0,9951	$796,905x-224,054$
Tetraconazol	0,5 a 200	0,9943	0,9929	$-0,0905691x^2+481,17x-187,047$
Tiabendazol	0,5 a 200	0,9989	0,9988	$1015,75x-302,941$
Tiacloprido	0,5 a 200	0,9960	0,9981	$386,471x-94,2592$
Tiametoxam	1 a 200	0,9919	0,9916	$0,00942471x^2+45,1733x-40,5727$
Tiobencarbe	0,5 a 200	0,9947	0,9986	$0,818438x^2+499,999x-109,971$
Tiofanato metílico	0,5 a 200	0,9939	0,9961	$0,0494518x^2+103,532x-105,658$
Triazofós	0,5 a 200	0,9966	0,9952	$-0,060561x^2+506,327x-75,4245$
Trifloxistrobina	0,5 a 200	0,9873	0,9959	$642,808x-156,802$
Triflumizol	0,5 a 200	0,9939	0,9955	$0,522989x^2+391,277x-87,0658$

Cromatogramas destes compostos e do padrão interno (trifenilfosfato), no modo SRM, em concentração $20 \mu\text{g L}^{-1}$ no extrato 'branco' da matriz estão no anexo C. PC: padrão de controle.

A faixa linear para os agrotóxicos quando preparados na matriz de pimentão foi bastante eficiente visto que para todos os analitos obteve-se um r^2 maior de 0,99. Ao contrário, para alguns compostos o valor de r^2 ficou abaixo de 0,99 quando preparados em solvente (acetoneitrila), sendo estes: clotianidina, iprovalicarbe, piridafentiona, pirifenox, terbufós, tridemorfe e trifloxistrobina. Ainda, três compostos não apresentaram faixa linear, em nenhum dos casos: acefato, benomil e deltametrina.

Em uma análise multirresíduo torna-se difícil adequar a otimização do método analítico para todos os analitos. Os compostos acefato e deltametrina necessitam de condições diferenciadas de análise, como temperatura de dessolvatação mais baixa. Assim, resíduos destes dois agrotóxicos não puderam ser determinados através do método desenvolvido neste trabalho.

A degradação de benomil a carbendazim é um fenômeno bem conhecido. Záfira-Gomez *et al.* (2000), monitoraram a taxa de conversão em amostras de frutas e hortaliças e determinaram que a degradação era completa após 25 minutos do processo de extração. Por este motivo, os experimentos de recuperação dos compostos carbendazim e benomil são conduzidos separadamente e as recuperações calculadas como carbendazim.

4.4.3 Efeito Matriz

Um dos potenciais problemas do efeito matriz é que diferentes amostras, tipos de extratos e diferentes “concentrações” da matriz podem apresentar efeitos desta natureza em diferentes graus de magnitude (QUEIROZ *et al.*, 2012).

O efeito matriz é mais significativo quando os analitos encontram-se em concentrações mais baixas ou quando a proporção de componentes da matriz/analito é muito alta. Assim, quando se analisam os extratos, apenas uma quantidade insignificante do analito é adsorvida, porque a proporção de componentes da matriz/analito é muito alta e os interferentes são preferencialmente adsorvidos (PINHO *et al.*, 2009).

Vários fatores podem afetar a ionização e a identificação dos analitos e, conseqüentemente, o processo de quantificação. Algumas ações podem ser

tomadas para minimizar ou corrigir o aumento ou supressão do sinal analítico, como alterações nas condições do MS, do processo de limpeza, das condições cromatográficas e uso de curva preparada no extrato da matriz isento dos analitos de interesse (GOSETTI *et al.*, 2010; SANCO, 2010).

Conforme Krueve *et al.* (2008), o efeito matriz é mais acentuado no método QuEChERS, uma vez que a supressão de ionização é maior para muitos agrotóxicos, apesar de este ser um método mais econômico em termos de tempo, trabalho e solventes, além de ter maior recuperação para muitos agrotóxicos.

Os resultados obtidos para a avaliação do efeito matriz para todos os agrotóxicos avaliados, nas concentrações de 2, 5 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11 - Efeito matriz dos agrotóxicos avaliados no sistema de UHPLC-MS/MS, a partir de soluções preparadas em acetonitrila e na matriz de pimentão.

Compostos	Efeito Matriz (%)		
	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	2,0	5,0	20,0
3-OH Carbofurano	26,9	13,8	-7,8
Acetamiprido	11,5	-2,8	17,9
Ametrina	-10,8	-10,4	12,6
Atrazina	-5,0	-14,2	-0,1
Azaconazol	17,4	21,2	0,1
Azoxistrobina	53,0	44,8	16,9
Boscalida	73,4	24,6	1,9
Bromuconazol	3,9	5,8	5,3
Buprofezina	52,8	-0,1	16,0
Butóxido de piperonil	41,2	6,3	19,9
Carbaril	11,6	1,7	22,3
Carbendazim	8,4	-12,8	-3,4
Carbofurano	10,9	-5,6	6,3
Cianazina	36,8	61,3	15,1
Ciproconazol	86,7	28,3	65,8
Clomazone	-5,3	6,3	73,9
Clorantraniliprole	6,3	4,5	54,0
Clorbromurom	45,9	42,0	65,3
Clorpirifós etílico	132,6	78,2	30,5
Clotianidina	74,4	-8,8	75,7
Diazinona	6,2	-8,7	0,4
Difenoconazol	20,8	-1,2	28,6
Dimetoato	4,3	-8,9	30,3
Dimoxistrobina	10,2	-1,5	51,1
Diuron	4,9	11,4	60,7
Dodemorfe	13,9	-14,4	19,9

(continuação)

Compostos	Efeito Matriz (%)		
	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	2,0	5,0	20,0
Epoxiconazol	1,4	5,0	2,3
Etiofencarbe sulfona	28,8	-6,1	19,8
Etiofencarbe sulfóxido	23,3	-8,2	-5,9
Etoprofós	-5,3	0,3	16,7
Fembuconazol	41,1	5,7	29,4
Fempropatrina	152,1	104,2	7,4
Fempropimorfe	29,7	11,0	2,9
Fluasifope-P-butílico	106,8	40,5	112,9
Flusilazole	8,7	23,6	0,1
Flutolanil	2,7	-0,9	-6,8
Flutriafol	12,7	16,9	24,2
Furatiocarbe	74,4	41,2	-5,8
Imazalil	-10,1	-5,2	-1,7
Iprovalicarbe	-14,3	22,9	65,3
Linurom	1,8	3,7	40,7
Linurom d6 (PC)	10,5	18,4	72,9
Mefosfolan	10,8	-9,0	5,4
Mepronil	8,3	-13,3	12,7
Metalaxil-M	4,2	-11,1	7,0
Metobromuron	12,7	-15,5	9,3
Metolacloro	-0,1	-16,1	-16,3
Metoxurom	-4,8	-18,0	-18,0
Mevinfós	40,0	17,3	27,8
Monocrotofós	-12,8	-26,1	-27,8
Monolinurom	-4,9	-8,6	49,1
Ometoato	13,3	-28,9	-54,2
Paraoxom etílico	0,0	2,2	-17,2
Pencicurom	32,8	4,1	33,5
Penconazol	7,8	-4,8	1,9
Picoxistrobina	19,8	0,2	24,0
Piraclostrobina	50,0	25,3	106,3
Pirazofós	34,4	31,4	-11,0
Piridafentiona	33,0	23,3	26,0
Pirifenox	3,1	1,8	1,5
Pirimetanil	7,3	-5,5	7,4
Pirimifós etílico	50,6	1,1	22,6
Pirimifós metílico	9,5	-13,8	19,9
Profenofós	23,5	2,2	31,2
Propanil	10,9	3,7	-1,7
Propiconazol	19,1	-0,1	-12,0
Simazina	-0,1	-7,7	10,4
Tebuconazol	1,3	-25,1	-31,2
Tebufenozida	12,7	6,7	-7,2
Tebufenpirade	29,1	-0,6	79,1

(continuação)

Compostos	Efeito Matriz (%)		
	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	2,0	5,0	20,0
Terbufós	46,7	28,4	-9,7
Terbutilazina	-2,7	-3,8	19,8
Tetraconazol	12,3	-1,5	20,0
Tiabendazol	-4,1	-20,5	-9,9
Tiacloprido	-4,1	-7,1	4,3
Tiametoxam	-7,1	-9,2	-48,5
Tiobencarbe	42,6	14,3	-2,7
Tiofanato metílico	-99,9	-67,7	-51,2
Triazofós	6,5	18,0	-7,7
Trifloxistrobina	60,8	32,4	32,8
Triflumizol	24,2	13,1	-13,2

PC: padrão de controle.

O efeito matriz observado foi significativo para diversos compostos (fora do limite $\pm 10\%$), apesar da utilização de maior quantidade de PSA na etapa de limpeza, demonstrando que a presença de pigmentos e outros coextrativos é bastante pronunciada na matriz estudada (pimentão). Dessa forma, destaca-se como sendo de extrema importância o preparo de soluções analíticas no extrato da matriz pimentão, em relação aos agrotóxicos avaliados no sistema de UHPLC-MS/MS.

4.4.4 Determinação dos Valores de LOD e LOQ

Os valores de limite de detecção e quantificação, tanto para o instrumento quanto para o método foram obtidos como descrito no item 3.8.4. O LOQ_i variou de 0,5 a 2 $\mu\text{g L}^{-1}$, e o LOD_i de 0,15 a 0,9 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que o LOQ_m foi de 10 ou 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e o LOD_m de 3 ou 7,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabela 12).

Estes valores de limites de detecção e quantificação são considerados satisfatórios, considerando os valores de limites máximos de resíduos (LMR) permitidos na legislação brasileira (Tabela 3). Além disso, os valores de LOQ_m são adequados para a quantificação dos demais agrotóxicos, sendo que sua maioria é de uso proibido.

Tabela 12 - Valores de limite de detecção (LOD_i e LOD_m) e quantificação (LOQ_i e LOQ_m) para cada agrotóxico na matriz de pimentão.

Compostos	LOD_i (µg L⁻¹)	LOQ_i (µg L⁻¹)	LOD_m (µg kg⁻¹)	LOQ_m (µg kg⁻¹)
3-OH Carbofurano	0,30	1,00	3,00	10,00
Acetamiprido	0,15	0,50	3,00	10,00
Ametrina	0,15	0,50	3,00	10,00
Atrazina	0,15	0,50	3,00	10,00
Azaconazol	0,15	0,50	3,00	10,00
Azoxistrobina	0,15	0,50	3,00	10,00
Boscalida	0,15	0,50	3,00	10,00
Bromuconazol	0,15	0,50	3,00	10,00
Buprofezina	0,15	0,50	3,00	10,00
Butóxido de piperonil	0,15	0,50	3,00	10,00
Carbaril	0,15	0,50	3,00	10,00
Carbendazim	0,15	0,50	3,00	10,00
Carbofurano	0,15	0,50	3,00	10,00
Cianazina	0,30	1,00	3,00	10,00
Ciproconazol	0,15	0,50	7,50	25,00
Clomazone	0,15	0,50	3,00	10,00
Clorantraniliprole	0,15	0,50	3,00	10,00
Clorbromurom	0,15	0,50	3,00	10,00
Clorpirifós etílico	0,15	0,50	3,00	10,00
Clotianidina	0,60	2,00	7,50	25,00
Diazinona	0,15	0,50	3,00	10,00
Difenoconazol	0,60	2,00	7,50	25,00
Dimetoato	0,15	0,50	3,00	10,00
Dimoxistrobina	0,15	0,50	7,50	25,00
Diuron	0,15	0,50	3,00	10,00
Dodemorfe	0,15	0,50	3,00	10,00
Epoxiconazol	0,30	1,00	3,00	10,00
Etiofencarbe sulfona	0,15	0,50	3,00	10,00
Etiofencarbe sulfóxido	0,15	0,50	3,00	10,00
Etoprofós	0,15	0,50	3,00	10,00
Fembuconazol	0,15	0,50	7,50	25,00
Fempropatrina	0,15	0,50	3,00	10,00
Fempropimorfe	0,15	0,50	7,50	25,00
Fluasifope-P-butílico	0,15	0,50	3,00	10,00
Flusilazole	0,15	0,50	7,50	25,00
Flutolanil	0,15	0,50	7,50	25,00
Flutriafol	0,15	0,50	3,00	10,00
Furatiocarbe	0,60	2,00	3,00	10,00
Imazalil	0,15	0,50	3,00	10,00
Iprovalicarbe	0,15	0,50	7,50	25,00
Linurom	0,15	0,50	3,00	10,00
Linurom d6 (PC)	0,15	0,50	3,00	10,00
Mefosfolan	0,15	0,50	3,00	10,00
Mepronil	0,15	0,50	3,00	10,00

(continuação)

Compostos	LOD_i (µg L⁻¹)	LOQ_i (µg L⁻¹)	LOD_m (µg kg⁻¹)	LOQ_m (µg kg⁻¹)
Metalaxil-M	0,15	0,50	7,50	25,00
Metobromuron	0,15	0,50	3,00	10,00
Metolacloro	0,15	0,50	7,50	25,00
Metoxurom	0,15	0,50	3,00	10,00
Mevinfós	0,15	0,50	3,00	10,00
Monocrotofós	0,15	0,50	3,00	10,00
Monolinurom	0,15	0,50	3,00	10,00
Ometoato	0,15	0,50	3,00	10,00
Paraoxom etílico	0,15	0,50	3,00	10,00
Pencicurom	0,15	0,50	3,00	10,00
Penconazol	0,15	0,50	3,00	10,00
Picoxistrobina	0,15	0,50	3,00	10,00
Piraclostrobina	0,15	0,50	3,00	10,00
Pirazofós	0,15	0,50	7,50	25,00
Piridafentiona	0,15	0,50	3,00	10,00
Pirifenox	0,15	0,50	3,00	10,00
Primetanil	0,15	0,50	3,00	10,00
Pirimifós etílico	0,15	0,50	3,00	10,00
Pirimifós metílico	0,15	0,50	3,00	10,00
Profenofós	0,15	0,50	7,50	25,00
Propanil	0,15	0,50	3,00	10,00
Propiconazol	0,15	0,50	7,50	25,00
Simazina	0,15	0,50	3,00	10,00
Tebuconazol	0,30	1,00	7,50	25,00
Tebufenozida	0,30	1,00	7,50	25,00
Tebufenpirade	0,15	0,50	3,00	10,00
Terbufós	0,60	2,00	3,00	10,00
Terbutilazina	0,15	0,50	3,00	10,00
Tetraconazol	0,15	0,50	7,50	25,00
Tiabendazol	0,15	0,50	3,00	10,00
Tiacloprido	0,15	0,50	3,00	10,00
Tiametoxam	0,30	1,00	3,00	10,00
Tiobencarbe	0,15	0,50	3,00	10,00
Triazofós	0,15	0,50	3,00	10,00
Trifloxistrobina	0,15	0,50	3,00	10,00
Triflumizol	0,15	0,50	3,00	10,00

Tiofanato metílico e benomil são determinados na forma de carbendazim, apresentando desta forma, valores de LOD e LOQ idênticos. PC: padrão de controle.

4.4.5 Exatidão (Ensaio de Recuperação) e Precisão (Repetitividade)

Na Tabela 13 estão apresentados os valores das médias dos percentuais de recuperação (n=7) e RSD_r (repetitividade) para os agrotóxicos avaliados em pimentão, nos níveis de concentração de 10, 25, 50 e 100 µg kg⁻¹, utilizando o método QuEChERS modificado otimizado. A recuperação foi calculada utilizando a curva analítica preparada no extrato da matriz de pimentão, aceitando o critério de recuperação entre 70 e 120% e RSD ≤ 20%, conforme a recomendação de validação de métodos cromatográficos (RIBANI *et al.*, 2004).

Tabela 13 - Percentuais de recuperação e RSD_r para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos em pimentão.

Compostos	Nível de Fortificação (µg kg ⁻¹)							
	10,0		25,0		50,0		100,0	
	R(%)	RSD _r (%)	R(%)	RSD _r (%)	R(%)	RSD _r (%)	R(%)	RSD _r (%)
3-OH Carbofurano	88,3	16,2	-	-	84,8	9,3	87,1	5,3
Acetamiprido	98,4	9,3	-	-	91,5	6,0	90,1	4,8
Ametrina	90,2	7,4	-	-	86,0	8,1	84,9	2,9
Atrazina	101,1	12,0	-	-	84,1	4,1	80,0	5,3
Azaconazol	90,7	7,8	-	-	96,1	6,4	99,0	3,0
Azoxistrobina	82,6	13,9	-	-	84,2	8,7	81,6	4,6
Boscalida	82,5	15,9	-	-	70,0	16,2	77,1	11,8
Bromuconazol	-	-	90,8	17,7	86,4	18,7	83,1	14,1
Buprofezina	88,1	8,2	-	-	93,1	8,1	98,4	9,0
Butóxido de piperonil	102,3	12,3	-	-	102,5	7,8	106,8	9,8
Carbaril	78,9	13,8	-	-	75,0	7,3	83,3	5,8
Carbendazim	104,8	10,6	-	-	101,9	4,5	101,5	7,4
Carbofurano	109,8	7,3	-	-	100,0	6,3	109,9	1,4
Cianazina	84,9	13,6	-	-	73,5	16,4	84,9	12,9
Ciproconazol	-	-	72,1	14,7	74,4	14,9	74,1	9,1
Clomazone	96,0	15,9	-	-	87,4	8,9	92,2	9,9
Clorantraniliprole	84,5	14,0	-	-	73,2	7,9	81,0	5,7
Clorbromurom	80,0	14,8	-	-	89,0	13,4	77,3	10,3
Clorpirifós etílico	75,2	15,0	-	-	106,9	11,4	97,8	4,8
Clotianidina	-	-	106,0	16,8	91,0	16,9	99,8	13,9
Diazinona	91,6	15,0	-	-	79,3	9,5	82,1	10,3
Difenoconazol	-	-	95,6	17,6	93,0	10,4	107,7	10,6
Dimetoato	93,1	9,4	-	-	94,3	11,3	89,6	4,7
Dimoxistrobina	-	-	94,9	11,7	85,5	15,4	83,3	5,8
Diuron	88,6	13,8	-	-	88,4	11,2	86,6	10,2
Dodemorfe	95,3	14,4	-	-	82,2	11,2	84,8	8,7
Epoxiconazol	117,4	19,3	-	-	100,0	10,7	89,9	6,1
Etiofencarbe sulfona	73,1	15,4	-	-	78,2	14,3	90,8	5,6
Etiofencarbe sulfóxido	93,7	18,0	-	-	70,1	18,4	77,7	8,1

(continuação)

Compostos	Nível de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	10,0		25,0		50,0		100,0	
	R(%)	RSD _r (%)	R(%)	RSD _r (%)	R(%)	RSD _r (%)	R(%)	RSD _r (%)
Etoprofós	88,7	17,6	-	-	86,3	10,3	86,0	11,1
Fembuconazol	-	-	73,4	19,7	90,0	8,2	91,2	9,6
Fempropatrina	-	-	104,7	17,4	97,8	9,5	94,4	6,6
Fempropimorfe	-	-	79,6	17,7	86,1	9,6	81,0	4,3
Fluasifope-P-butílico	89,3	12,7	-	-	94,8	6,3	90,9	7,7
Flusilazole	-	-	96,1	17,8	84,4	10,2	94,0	7,7
Flutolanil	-	-	100,9	13,8	99,4	10,6	86,0	7,6
Flutriafol	77,8	18,0	-	-	88,1	8,5	85,8	11,3
Furatiocarbe	-	-	99,2	15,9	98,9	11,3	96,2	8,1
Imazalil	-	-	73,7	6,3	73,3	9,7	79,4	8,0
Iprovalicarbe	-	-	99,2	16,5	87,7	19,6	95,3	18,5
Linurom	80,0	19,2	-	-	93,8	8,5	87,8	7,7
Linurom d6 d (PC)	86,4	9,1	-	-	79,4	8,6	84,9	6,7
Mefosfolan	92,8	10,7	-	-	90,8	6,1	90,5	3,2
Mepronil	81,8	4,8	-	-	99,7	6,8	94,4	4,6
Metalaxil-M	-	-	92,3	9,9	80,8	7,7	82,7	4,1
Metobromuron	89,0	10,1	-	-	83,8	6,6	85,2	3,9
Metolacloro	-	-	83,1	16,6	99,0	8,0	91,8	8,4
Metoxurom	95,1	8,3	-	-	86,3	7,1	81,8	5,7
Mevinfós	75,5	9,1	-	-	92,7	4,6	95,3	4,3
Monocrotofós	90,7	13,9	-	-	85,3	12,8	86,0	6,4
Monolinurom	84,2	13,6	-	-	89,1	6,9	87,0	5,5
Ometoato	73,0	14,2	-	-	70,0	6,4	70,3	8,6
Paraoxom etílico	84,9	8,4	-	-	89,3	11,0	91,1	4,9
Pencicurom	92,8	11,3	-	-	102,1	3,2	103,5	4,6
Penconazol	88,5	10,3	-	-	102,4	8,5	102,3	2,3
Picoxistrobina	86,1	17,8	-	-	81,2	14,1	91,3	14,8
Piraclostrobina	96,7	17,5	-	-	87,5	13,2	95,4	8,3
Pirazofós	-	-	79,1	11,0	82,6	8,4	81,7	7,8
Piridafentiona	87,3	9,9	-	-	81,9	12,1	73,1	3,9
Pirifenox	74,8	6,3	-	-	81,0	11,8	72,2	15,7
Pirimetanil	87,6	4,0	-	-	84,1	3,2	85,4	1,0
Pirimifós etílico	96,1	16,1	-	-	98,2	5,8	95,0	5,7
Pirimifós metílico	106,0	14,7	-	-	98,9	15,4	90,6	7,9
Profenofós	-	-	94,0	16,6	93,8	9,9	85,7	3,7
Propanil	108,3	12,4	-	-	101,5	7,1	94,9	10,5
Propiconazol	-	-	102,4	9,0	91,5	8,0	93,9	11,0
Simazina	97,6	15,0	-	-	96,6	6,9	96,5	4,4
Tebuconazol	-	-	77,3	16,8	96,5	10,9	90,5	7,3
Tebufenozida	-	-	86,1	16,6	74,2	19,8	83,1	7,1
Tebufenpirade	94,2	16,4	-	-	113,9	6,1	111,9	3,8
Terbufós	116,9	2,3	-	-	80,8	17,3	83,8	16,0
Terbutilazina	95,1	14,6	-	-	94,3	15,0	85,5	6,1
Tetraconazol	-	-	95,0	19,8	89,0	10,8	91,9	11,7

(continuação)

Compostos	Nível de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	10,0		25,0		50,0		100,0	
	R(%)	RSD _r (%)	R(%)	RSD _r (%)	R(%)	RSD _r (%)	R(%)	RSD _r (%)
Tiabendazol	89,8	6,0	-	-	82,5	5,5	77,8	4,0
Tiacloprido	85,2	5,2	-	-	96,0	11,7	89,0	6,6
Tiametoxam	99,1	11,7	-	-	86,1	10,8	86,0	9,9
Tiobencarbe	98,7	14,7	-	-	96,7	7,8	103,4	6,1
Tiofanato metílico	49,6	0,9	15,9	1,8	10,1	1,9	5,0	3,2
Triazofós	102,6	18,2	-	-	86,0	10,9	89,9	11,9
Trifloxistrobina	99,1	11,9	-	-	95,5	15,3	97,1	11,8
Triflumizol	107,5	12,8	-	-	98,2	12,9	90,0	8,0

R: recuperação; PC: padrão de controle.

Observa-se que a recuperação média do PC, linurom d6, manteve-se praticamente constante nos três níveis, demonstrando desse modo que não houve alterações drásticas do procedimento de extração. A precisão, para todos os analitos nos níveis de concentração avaliados foi satisfatória, com valores de $\text{RSD}_r \leq 20\%$.

A maioria dos compostos apresentaram valores de recuperação em três níveis de concentração entre 70,0 a 120,0%, exceto o composto tiofanato metílico, conforme descrito por Lehotay *et al.* (2005b), pode se degradar parcialmente em carbendazim, diminuindo resultados de recuperação quando analisado em amostras de frutas e hortaliças. Dessa forma, assim como para o benomil, as recuperações de tiofanato metílico são calculadas como carbendazim.

4.4.6 Precisão Intermediária

Na avaliação da precisão intermediária os valores de recuperação variaram na faixa de 70 a 120% para a maioria dos compostos. Apenas o composto tiofanato metílico continuou a apresentar valores de recuperação inferiores ao recomendado (entre 70 e 120%), assim como na avaliação da repetitividade, como era esperado. Uma boa precisão pode ser observada, com valores de $\text{RSD}_{pi} \leq 20\%$.

Na Tabela 14 estão descritos os valores de recuperação e a precisão intermediária avaliada em pimentão utilizando o método QuEChERS modificado, na concentração intermediária de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabela 14 - Percentuais de recuperação e RSD_{pi} do método de extração de agrotóxicos em pimentão, correspondente a precisão intermediária.

Compostos	Nível de Fortificação de 50 µg kg ⁻¹	
	R (%)	RSD _{pi} (%)
3-OH Carbofurano	76,3	10,8
Acetamiprido	93,1	7,8
Ametrina	79,6	6,8
Atrazina	80,3	9,1
Azaconazol	93,6	4,6
Azoxistrobina	81,7	8,2
Boscalida	74,3	10,8
Bromuconazol	79,7	11,7
Buprofezina	91,7	11,9
Butóxido de piperonil	104,5	10,6
Carbaril	86,6	12,1
Carbendazim	98,3	6,4
Carbofurano	103,7	6,6
Cianazina	97,2	14,6
Ciproconazol	70,0	11,3
Clomazone	105,7	8,4
Clorantraniliprole	75,3	8,5
Clorbromurom	76,7	19,0
Clorpirifós etílico	105,5	10,6
Clotianidina	84,4	13,9
Diazinona	86,2	4,8
Difenoconazol	102,2	11,2
Dimetoato	95,7	7,4
Dimoxistrobina	71,0	9,9
Diuron	89,2	7,1
Dodemorfe	83,3	8,8
Epoxiconazol	95,8	15,4
Etiofencarbe sulfona	81,9	11,9
Etiofencarbe sulfóxido	73,1	13,5
Etoprofós	88,6	8,6
Fembuconazol	86,8	9,2
Fempropatrina	99,1	12,8
Fempropimorfe	77,6	10,5
Fluasifope-P-butílico	87,8	9,5
Flusilazole	80,6	10,7
Flutolanil	96,7	8,3
Flutriafol	80,9	15,8
Furatiocarbe	78,4	12,7
Imazalil	72,1	8,4
Iprovalicarbe	86,7	8,5
Linurom	88,7	17,8
Linurom d6 (PC)	83,1	8,9
Mefosfolan	81,9	2,7

(continuação)

Compostos	Nível de Fortificação de 50 µg kg ⁻¹	
	R (%)	RSD _{pi} (%)
Mepronil	99,3	6,1
Metalaxil-M	77,8	8,3
Metobromuron	80,5	10,5
Metolacloro	91,2	10,4
Metoxurom	83,6	5,9
Mevinfós	87,5	9,9
Monocrotofós	84,2	6,6
Monolinurom	90,8	5,1
Ometoato	70,0	8,9
Paraoxom etílico	87,0	6,6
Pencicuro	102,5	5,9
Penconazol	104,3	6,6
Picoxistrobina	89,6	13,3
Piraclostrobina	99,0	9,5
Pirazofós	109,5	19,7
Piridafentiona	86,4	18,4
Pirifenox	91,6	12,2
Pirimetanil	82,3	3,3
Pirimifós etílico	94,6	6,7
Pirimifós metílico	83,8	6,7
Profenofós	92,1	19,6
Propanil	100,3	11,0
Propiconazol	96,7	8,1
Simazina	89,3	6,0
Tebuconazol	94,3	6,5
Tebufenozida	91,7	17,8
Tebufenpirade	108,0	5,9
Terbufós	75,4	19,7
Terbutilazina	96,7	4,4
Tetraconazol	84,4	5,8
Tiabendazol	84,1	7,7
Tiacloprido	93,5	8,6
Tiametoxam	89,0	10,4
Tiobencarbe	92,0	12,8
Tiofanato metílico	8,1	5,4
Triazofós	95,3	9,4
Trifloxistrobina	105,5	8,0
Triflumizol	94,8	4,2

R: recuperação; PC: padrão de controle.

4.5 Aplicação do Método

A aplicação do método proposto consistiu na análise de 20 amostras de pimentão nas colorações verde, amarelo e vermelho, obtidos em supermercados e feiras de Santa Maria-RS.

Efetuiu-se a extração de três fortificações, no nível intermediário $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, a fim de verificar a robustez do método, avaliando-se a recuperação dos agrotóxicos. As recuperações obtidas foram adequadas para todos os compostos estudados (70-120%) bem como o RSD ($\leq 20\%$), demonstrando que o método proposto pode ser aplicado em amostras.

Conforme a Tabela 15, que apresenta os resultados para as amostras analisadas, foram detectados 20 compostos diferentes, sendo que 10 destes compostos puderam ser quantificados (acetamiprido, azoxistrobina, boscalida, carbendazim, clorpirifós etílico, clotianidina, difenoconazol, fempropatrina, piraclostrobina e pirimetanil).

Não foram encontradas amostras com compostos acima dos LMR estabelecidos pela legislação brasileira. Entretanto, em 9 amostras foram quantificados um ou mais de 6 compostos não autorizados: acetamiprido, boscalida, carbendazim, clorpirifós etílico etílico, clotianidina e pirimetanil. Além disso, 4 compostos que não estão nos programas de monitoramento de pimentão foram encontrados: clorantraniliprole, fempropatrina, flutolanil e metolaclo. Os resultados evidenciam que as boas práticas agrícolas não vêm sendo observadas, principalmente ao utilizar ingredientes ativos não recomendados para a cultura.

Os resultados positivos para alguns agrotóxicos evidenciam a importância da realização de monitoramentos de resíduos nos alimentos, como os que vêm sendo realizados no Brasil. Além disso, ressalta a importância da conscientização e controle do uso dessas substâncias, devido ao impacto ambiental e à saúde humana que geram.

Tabela 15 - Resultados da análise das amostras de pimentão empregando o método desenvolvido e validado neste trabalho.

Compostos	Amostras detectadas¹	Amostras quantificadas²	Concentração (mg kg⁻¹)³	LMR (mg kg⁻¹)⁴
Acetamiprido	4	2	0,050; 0,048	NA
Atrazina	1	-	-	0,02
Azoxistrobina	2	4	0,013; 0,013; 0,013; 0,011	0,5
Boscalida	3	1	0,046	NA
Carbendazim ⁵	11	5	0,265; 0,014; 0,016; 0,064; 0,294	NA
Ciproconazol	2	-	-	NA
Clorantraniliprole	3	-	-	-
Clorpirifós etílico	3	4	0,010; 0,015; 0,043; 0,030	NA
Clotianidina	2	1	0,054	NA
Difenoconazol	-	2	0,044; 0,037	0,5
Dimetoato ⁶	1	-	-	NA
Fempropatrina	1	4	0,015; 0,054; 0,012; 0,010	-
Flutolanil	3	-	-	-
Linurom	3	-	-	NA
Metalaxil-M	3	-	-	NA
Metolacloro	1	-	-	-
Piraclostrobina	3		0,046; 0,010; 0,014; 0,114; 0,061	1
Pirimetanil	-	1	0,098	NA
Tebuconazol	3	-	-	0,1
Trifloxistrobina	3	-	-	NA

¹ Amostras que atendem somente ao LOD_m e não puderam ser quantificadas.

² Amostras que foram concentrações \geq LOD_m.

³ Concentração do composto nas amostras quantificadas.

⁴ LMR para o composto na cultura de pimentão, conforme legislação brasileira.

⁵ Carbendazim é expresso na forma de carbendazim + benomil + tiofanato metílico.

⁶ Dimetoato é expresso na forma de dimetoato + ometoato.

5 CONCLUSÕES

O método QuEChERS modificado otimizado para pimentão mostrou-se eficaz na extração de 81 dos 83 agrotóxicos avaliados, sendo que benomil e tiofanato metílico são calculados como carbendazim. Utilizando-se o sistema UHPLC-MS/MS com fonte ESI (+), obteve-se valores de recuperação entre 70 e 120% e a precisão do método também demonstrou ser adequada, visto que valores de RSD inferiores a 20% foram obtidos. Além desses, o parâmetro de faixa linear foi suficientemente adequado para todos os analitos com valores de r^2 maiores de 0,99, bem como os limites de quantificação apresentados, atendendo a legislação brasileira.

A aplicação do planejamento fatorial 2^4 permitiu encontrar um procedimento de extração ótimo, com redução de tempo de realização dos testes e de custos com reagentes. A utilização do solvente de extração sem necessidade de acidificação e a adição do sal NaCl para partição, tornam esse procedimento rápido e de fácil execução, com menor número de etapas, estando sujeito a uma menor probabilidade de erros analíticos.

A etapa de limpeza mostrou-se de grande importância durante o desenvolvimento do trabalho, pois um extrato com menor quantidade de interferentes é essencial para a manutenção de todo o sistema de UHPLC-MS/MS, além de influenciar na recuperação dos analitos em estudo. A utilização de 1 mL de extrato para esta etapa reduz a geração de resíduos e tende a diminuir os custos com sorventes, porém devido a presença de altas quantidades de pigmentos e coextrativos na amostra de pimentão, uma quantidade elevada de PSA também foi necessária durante esta etapa. Cabe salientar que também é indispensável a filtração do extrato após a etapa de limpeza.

Quanto aos sorventes para limpeza do extrato, pôde-se observar que há uma gama inexplorada destes. Espera-se que o relato de bons resultados com seu emprego faça crescer o interesse nestes sorventes, tornando-os mais viáveis ao uso laboratorial, uma vez que o seu uso pode tornar-se um obstáculo para um laboratório de rotina, por questões financeiras ou de aquisição do produto.

Em relação ao efeito matriz do pimentão, observou-se que o mesmo exerce grande influência nos agrotóxicos avaliados, sendo fundamental o preparo de curvas analíticas na matriz, a fim de diminuir o efeito de coextrativos e/ou interferentes.

Quanto aos programas de monitoramento brasileiros, o método desenvolvido neste trabalho abrange 69 agrotóxicos previstos para monitoramento em pimentão no PARA e/ou no PNCRC, e os demais princípios ativos são monitorados para outras culturas, mas também podem ser encontrados nas amostras do pimentão, como é o caso da fempropatrina, detectada e quantificada em até $0,23 \text{ mg kg}^{-1}$, nos resultados do PARA/2010.

O método proposto neste trabalho apresenta vantagens em relação ao método utilizado pelos programas de monitoramento. Estes utilizam o método multirresíduo Mini Luke (JARDIM; CALDAS, 2012), que emprega uma maior quantidade de amostra e solventes (acetona, éter de petróleo e diclorometano), tendo assim, uma maior geração de resíduos orgânicos. Solventes orgânicos clorados como é o caso do diclorometano são um risco ambiental. Além disso, o LOQ_m varia na faixa de $0,01$ a $0,07 \text{ mg kg}^{-1}$ na maioria dos casos, com exceção ao carbendazim, com o maior LOQ_m registrado ($0,4 \text{ mg kg}^{-1}$). Já para o método QuEChERS modificado validado neste trabalho, o LOQ_m obtido foi de $0,01$ ou $0,025 \text{ mg kg}^{-1}$.

A aplicação do método em amostras comerciais de pimentão possibilitou a detecção e quantificação dos compostos: acetamiprido, azoxistrobina, boscalida, carbendazim, clorpirifós etílico, clotianidina, difenoconazol, fempropatrina, piraclostrobina e pirimetanil, em concentrações que variaram de $0,01$ a $0,294 \text{ mg kg}^{-1}$, além da detecção de outros 10 compostos em níveis abaixo do LOQ_m . Alguns destes compostos não são autorizados para a cultura, demonstrando a importância do desenvolvimento de métodos para análise de resíduos em alimentos, bem como de seu monitoramento.

Dessa forma, conclui-se que o método QuEChERS modificado proposto para a determinação de agrotóxicos em pimentão, utilizando UHPLC-MS/MS, mostrou-se eficaz, podendo ser aplicado em análises de rotina e monitoramento, por atender as legislações de acordo com os parâmetros de validação de métodos cromatográficos.

Considerando-se os resultados obtidos, pode-se afirmar que os objetivos traçados para este trabalho foram atingidos.

6 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

Nas atividades laboratoriais gera-se uma quantidade significativa de resíduos líquidos e sólidos, que devem ser adequadamente tratados ou descartados.

Neste sentido, os resíduos gerados durante o desenvolvimento deste trabalho foram armazenados em recipientes adequados e encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química (DQ) da UFSM, o qual é o responsável pela destinação dos resíduos gerados que serão posteriormente tratados por uma empresa terceirizada capacitada nessa área.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Ampliar o escopo de agrotóxicos a serem avaliados no pimentão por UHPLC-MS/MS;

- Desenvolver método cromatográfico utilizando a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas para a determinação de resíduos de agrotóxicos em pimentão não passíveis de análise por UHPLC-MS/MS;

- Avaliar a aplicabilidade do método no monitoramento de outras matrizes;

- Ampliar o estudo de sorventes pouco explorados, como é o caso da fase fluorada, terra diatomácea e fases poliméricas para SPE, que apresentaram bons resultados na fase de testes preliminares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. **Consulta de ingrediente ativo – pimentão**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 22 set. 2012.

ALAN WOOD, 2013. **Compendium of pesticide common names**. Disponível em: <<http://www.alanwood.net/>>. Acesso em: 06 jan. 2013.

ALMEIDA, C.; ROSÁRIO, P.; SERÔDIO, P.; NOGUEIRA, J. M. F. **Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica**. Disponível em: <http://www.spq.pt/boletim/docs/boletimSPQ_095_069_09.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2013.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY S. J.; STAJNBAHER D.; SCHENCK F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **AOAC Inter.**, v. 86, p. 412, 2003.

ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM E.; TAŞDELENB.; ŠTAJNBAHER D. **Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis**. Crop Protection, Public Health, Environmental Safety, Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2007) 439.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**, RE nº 899, de 29/05/2003.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2011a. **Agrotóxicos e Toxicologia**. Disponível em: <<http://www.portalanvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicologia/>>. Acesso em: 26 dez. 2012.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2011b. **Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxico em Alimentos (PARA), dados da coleta e análise de alimentos de 2010**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b380fe004965d38ab6abf74ed75891ae/Relat%C3%B3rio+PARA+2010+-+Vers%C3%A3o+Final.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 25 dez. 2012.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2012. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>>. Acesso em: 20 jan. 2013.

BAIRD, C. **Química Ambiental**, 2ª ed., Bookman: Porto Alegre, 2002, cap. 6 e 7.

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

BRASIL, 2002. **Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002**. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. <<http://www.inpev.org.br/responsabilidades/legislacao/images/Decreto.PDF>>. Acesso em: 26 dez. 2012.

CABRERA, L. C.; MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 227-240, 2012.

CABRERA, L. C. Estudo do efeito matriz na determinação de agrotóxicos em diferentes tipos de arroz pelo método QuEChERS modificado e LC-MS/MS. **Tese de doutorado em Química**, UFSM, Santa Maria, 2012.

CABRERA, L. C.; CALDAS, S. S.; COSTA, P.; GUILHERME, J. R.; PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R. **Estudo do efeito matriz e validação de método para determinação de agrotóxicos em diferentes tipos de arroz**. 2011. Disponível em: <www.brmass.com.br/congresso/resumos/2P11111.doc>. Acesso em: 22 jan.2013.

CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; RIZOLLO, A.; MULLER, N. M.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C. **Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. ABRASCO, Rio de Janeiro, abril de 2012. 1ª Parte. 98 p.

CHEMBLINK, 2013. **Online Database of Chemicals from Around the World**. Disponível em: <<http://www.chemblink.com>>. Acesso em: 06 jan. 2013.

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. **Quim. Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

CHROMEDIA, 2013. **Chromatography knowledge base**. Disponível em: <<http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=thcseDsHqnOxmOIIcCvB&subNav=nibelDsHqnOxmOIIcCvBE>>. Acesso em: 12 jan. 2013.

CODEX ALIMENTARIUS. **Recommended methods of sampling for the determination of pesticide residues for compliance with MRLs CAC/GL 33-1999**. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.org/>>. Acesso em: 12 ago. 2012.

CODEX ALIMENTARIUS. **Portion of commodities to which codex maximum residue limits apply and which is analyzed CAC/GL 41-1993**. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.org/>>. Acesso em: 12 ago. 2012.

CODEX ALIMENTARIUS. **Method validation, joint FAO/WHO food standards programme**. Codex on Methods of Analysis and Sampling, Budapeste, 2001.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**, 2ª ed, Unicamp: Campinas, 2009, cap: 8 e 9.

CORILO, Y. E., 2009. **Quadrupolos**. Disponível em: <<http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=8&codassunto=17&numero=3>>. Acesso em: 20 jan. 2013.

CUNICO, M. W. M. *et al.* Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, v. 9, p. 23, 2008.

DONATO, F. F. Resíduos de agrotóxicos em água potável usando SPE e determinação rápida por LC-MS/MS e GC-MS/MS. **Dissertação de mestrado em Química**, UFSM, Santa Maria, 2012. 166 p.

EMBRAPA. **Sistema de Produção de Pimentas (*Capsicum spp.*)**. 2012. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/index.htm>>. Acesso em: 15 set. 2012.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), 2011. **FAOStat - Food and Agricultural commodities production**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 23 jan. 2013.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), 2005. **FAOStat - Glossary search**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/379/DesktopDefault.aspx?PageID=379>> Acesso em: 26 dez. 2012.

FENIK, J.; TANKIEWICZ, M.; BIZIUK, M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. **Trends Anal. Chem.**, v. 30, p. 814, 2011.

FENOLL, J. *et al.* Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and citrus fruits by LC-MS-MS. **Chromatographia**, v. 72, p. 857-866, 2010.

FERMAM, R. K. S.; ANTUNES, A. M. de S. Uso de defensivos agrícolas, Limites Máximos de Resíduos e impacto no comércio internacional: estudo de caso. **Economia e Agronegócio**, v.7, n. 2, 197-214 p, 2009.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. **Chromatographic - Mass Spectrometry Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues**, Elsevier: Amsterdam, 2005.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2a ed. Viçosa, UFV, 2003. 412 p.

GOSETTI, F.; MAZZUCCO, E.; ZAMPIERI, D.; GENNARO, M. C. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Chromatogr. A**, v. 1217, p. 3929, 2010.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry. A textbook**. 1a ed. Springer, Alemanha, 2004.

HACKBART, H. C. S.; SOUZA, M. M. de; SCAGLIONI, P. T.; PRIMEL, E. G.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Método QuEChERS para determinação de Ocratoxina A e Citrinina em arroz e farelo de arroz. **Quim. Nova**, v. 35, n. 9, p. 1733-1737, 2012.

HYÖTYLÄINEN, T. Critical evaluation of sample pretreatment techniques. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 394, p. 743-758, 2009.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**, DOQ-CGCRE-008, ver. 4, 2011.

JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food – Results from 2001 to 2010. **Food Control**, v. 25, p. 607-616, 2012.

KRUBE, A.; KÜNNAPAS, A.; HERODES, K.; LEITO, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Chromatogr. A**, v. 1187, p. 58-66, 2008.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 35-61, 2009.

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

LE COUTEUR, P.; BURRESON, J. **Os Botões de Napoleão: as 17 moléculas que mudaram a história**. Tradução, Maria Luiza X. de A. Borges. Rio de Janeiro: Zahar, 2006. 343 p.

LEHOTAY, S. J., MASTOVSKÁ, 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. **AOAC Inter.**, v. 88, p. 615, 2005a.

LEHOTAY, S. J.; KOK, A. DE; HIEMSTRA, M.; VAN BODEGRAVEN, P. Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. **AOAC Inter.**, v. 88, n. 2, (2005b).

LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. **Doenças do pimentão: diagnose e controle**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2003. 96 p.

MALDANER, L.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Quim. Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 197-207, 2012.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). 2011. **Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes - Resíduos e Contaminantes**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/qualidade-seguranca-alimentos-bebidas/alimentos/residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 20 jan. 2013.

MARTINS, M. L. Determinação de resíduos de compostos orgânicos em água por microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e GC-(TQ)-MS/MS. **Tese de doutorado em Química**, UFSM, Santa Maria, 2010. 161 p.

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S.J. Determination of photoirradiated high polar benzoylureas in tomato by HPLC with luminol chemiluminescence detection. **Chromatogr. A**, v. 1040, p. 259, 2004a.

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

MDT. **Estrutura e apresentação de Monografias, Dissertações e Teses**. Universidade Federal de Santa Maria, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Biblioteca Central. 8ª ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2012, 72 p.

NETO, B. de B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4ª ed., Bookman, 2010, cap: 6.

NÚÑEZ, O., MOYANO, E., GALCERAN, M. T., LC–MS/MS analysis of organic toxics in food. **Trends Anal. Chem.**, v. 24, p. 683, 2005.

NÚÑEZ, O.; GALLART-AYALA, H.; FERRER, I.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. Strategies for the multi-residue analysis of 100 pesticides by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Chromatogr. A**, v. 1249, p. 164-180, 2012.

PINHO, G. P.; NEVESII, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Análise de resíduos de agrotóxicos em tomates empregando dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa. **Quim. Nova**, v. 32, n. 1, p. 92-98, 2009.

PIZZUTTI, I. R.; KOK, A. de; ZANELLA, R.; ADAIME, M. B.; HIEMSTRA, M.; WICKERT, C.; PRESTES, O. D. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. **Chromatogr. A**, v. 1142, p. 123, 2007.

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

PRESTES, O. Método rápido para determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por LC-MS/MS. **Tese de doutorado em Química**, UFSM, Santa Maria, 2011. 130 p.

PRIMER, A. **Food Safety – Applications in Mass Spectrometry**. Agilent Technologies, USA, 2004.

QUEIROZ, S. C. N. *et al.* Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando QuEChERS e UHPLC-MS/MS. **Quim. Nova**, v. 35, n. 1, p. 185-192, 2012.

RAMBLA-ALEGRE, M.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **Chromatogr. A**, v. 1232, p. 101-109, 2012.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Org). **Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia: EMBRAPA-CNPB, 2000. 113 p.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; HENZ, G. P.; RIBEIRO, C. S. C. *Capsicums*: Early History and Future Prospects. **Chronica Horticulture**, v. 49, n. 3, p. 19-21, 2009.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; RIBEIRO, C. S. C. **Sistema de produção de pimentas (*Capsicum spp.*)**. 2004. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/index.htm>>. Acesso em: 10 out. 2012.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, p. 771, 2004.

RODRIGUES, S. A. Otimização e validação de métodos empregando MSPD, QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola. **Dissertação de mestrado em Química**, FURG, Rio Grande, 2010. 119 p.

SANCO (EUROPEAN COMMISSION). **Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis**. Documento N° SANCO/12495/2011, 22 de dezembro de 2011, Bruxelas, Bélgica. 2011.

SINHA, S. N.; RAO, M. V. V.; VASUDEV, K. Distribution of pesticides in different commonly used vegetables from Hyderabad, India. **Food Research International**, v. 45, p. 161-169, 2012.

SOUSA, V. F. de; MAROUELLI, W. A.; COELHO, E. F.; PINTO, J. M.; COELHO FILHO, M. A. **Irrigação e fertirrigação em fruteira e hortaliças**. Brasília, DF, Embrapa Informação Tecnológica, p. 721-736, 2011.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. GC-MS: Más de un Analizador de Masas, ¿para qué? **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 25, 2010.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Quim. Nova**, v. 29, p. 338, 2006.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis. (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem.**, v. 74, p. 835, 2002.

UFCG (Universidade Federal de Campina Grande). **Ajuste de curvas**. Disponível em: <<http://dee.ufcg.edu.br/~afernandes/CN/CAP4.PDF>>. Acesso em: 12 jan. 2013.

USDA (United States Department of Agricultural). **Nutrient data for 11333, Peppers, sweet, green, raw**. Disponível em: <<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3136>>. Acesso em: 24 set. 2012.

VENTOCILLA, R. & LUCAS, O. **Multi-residue determination of 75 pesticides in asparagus and sweet pepper by QhEChERS method and LC-MS/MS detection**. AOEC – International Paris, 2009.

WATERS (CORPORATION). 2013a. **UHPLC - Why All the Hype?** Disponível em: <<http://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=10067386>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

WATERS (CORPORATION). 2013b. **BEH (Ethylene Bridged Hybrid) Technology.** Disponível em: <<http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134618172>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

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

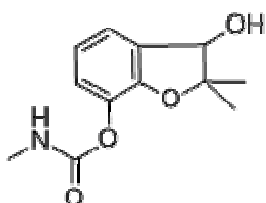
ZAFRA-GÓMEZ, A. TEJEDOR, A.; AGÜERA, A.; CONTRERAS, M.; GARRIDO, J. Determination of Imidacloprid and Benzimidazole Residues in Fruits and Vegetables by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry after Ethyl Acetate Multiresidue Extraction. **AOAC Inter.**, v. 83, n. 3, 2000.

ZAFRA-GÓMEZ, A.; CAMINO-SÁNCHEZ, F. J.; OLIVER-RODRÍGUEZ, B.; BALLESTEROS, O.; NAVALÓN, A.; CROVETTO, G.; VÍLCHEZ, J. L. UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 accredited method for the determination of 121 pesticide residues in fruits and vegetables by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 427-440, 2011.

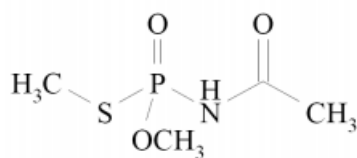
ZHANG, K. *et al.* Multiresidue Pesticide Analysis of Agricultural Commodities Using Acetonitrile Salt-Out Extraction, Dispersive Solid-Phase Sample Clean-Up, and High-Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry. **Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 7636-7646, 2011.

ANEXOS

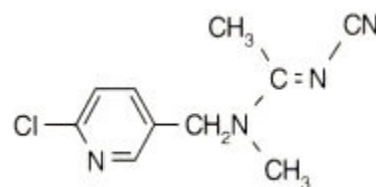
Anexo A – Fórmulas estruturais dos agrotóxicos em estudo nesse trabalho.



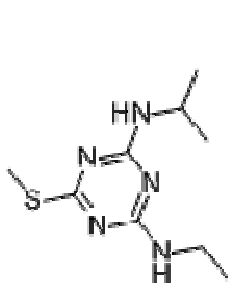
3-OH Carbofurano



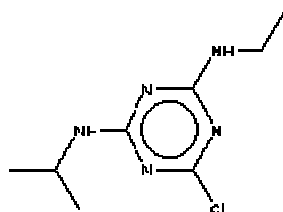
Acefato



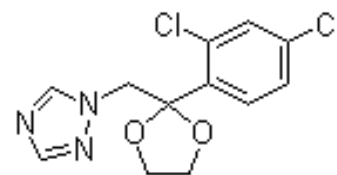
Acetamiprido



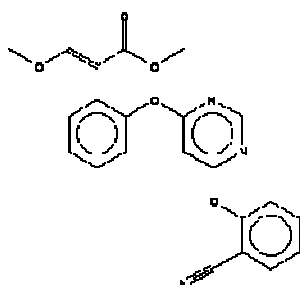
Ametrina



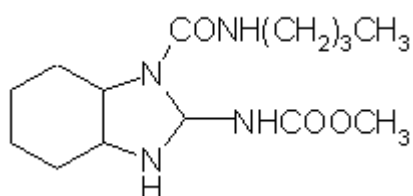
Atrazina



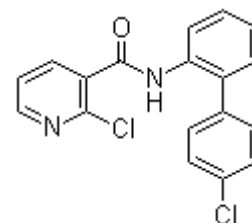
Azaconazol



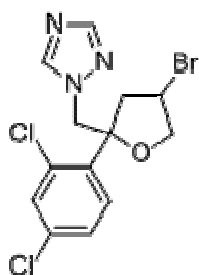
Azoxistrobina



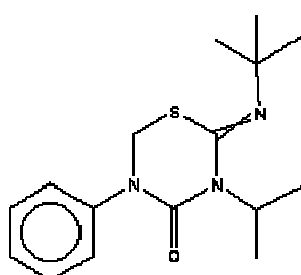
Benomil



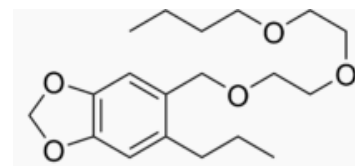
Boscalida



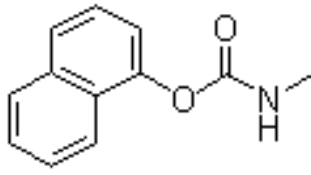
Bromuconazol



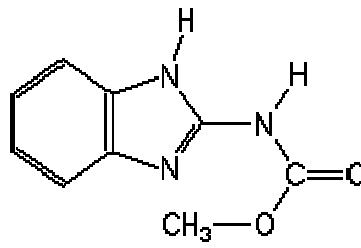
Buprofezina



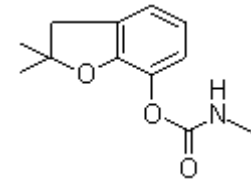
Butóxido de piperonil



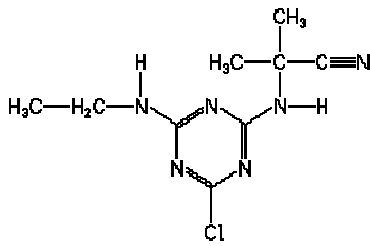
Carbaril



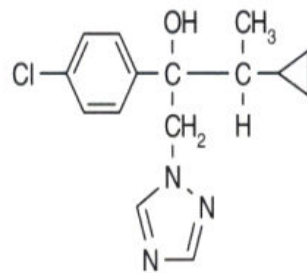
Carbendazim



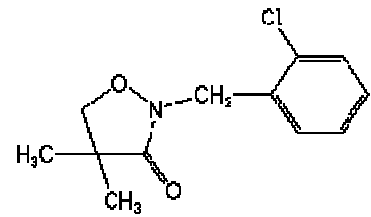
Carbofurano



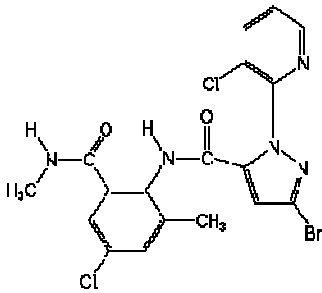
Cianazina



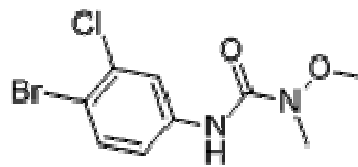
Ciproconazol



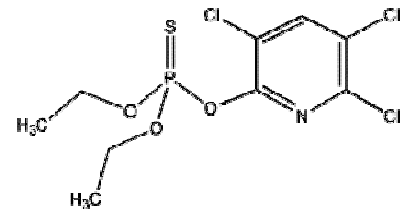
Clomazone



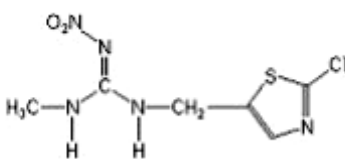
Clorantriprole



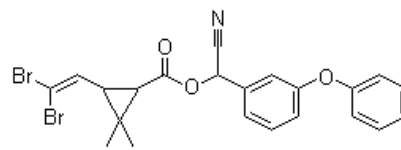
Clorbromurom



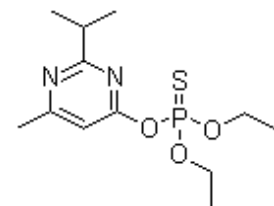
Clorpirifós etílico



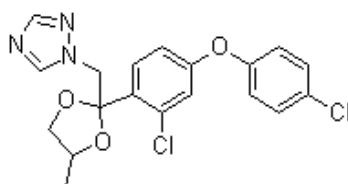
Clotianidina



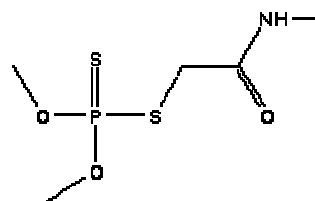
Deltametrina



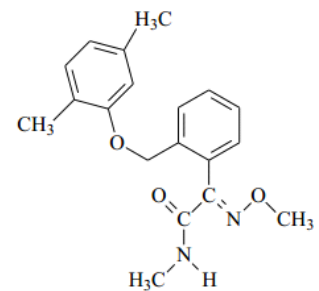
Diazinona

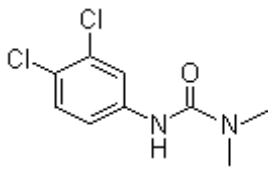


Difenconazol

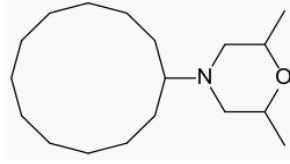


Dimetoato

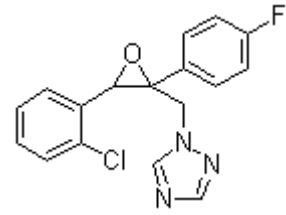




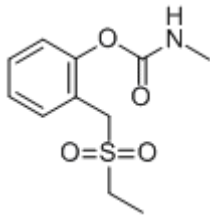
Diuron



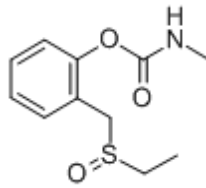
Dodemorfe



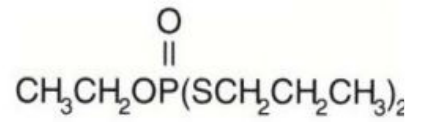
Epoxiconazol



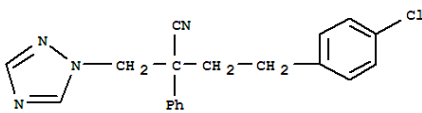
Etiofencarbe sulfona



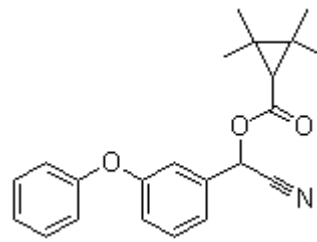
Etiofencarbe sulfóxido



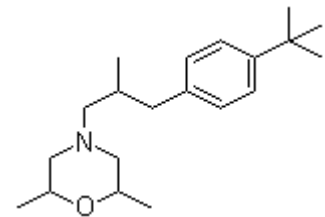
Etoprofós



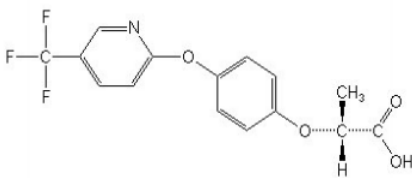
Fembuconazol



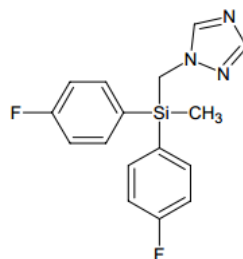
Fempropatrina



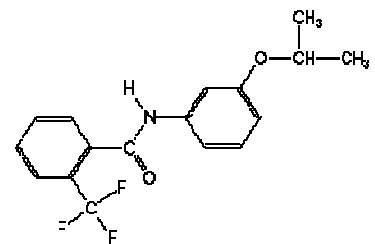
Fempropimorfe



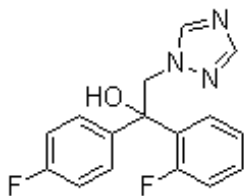
Fluazifope-P-butílico



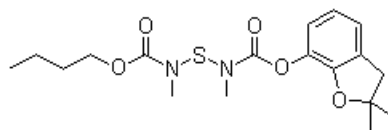
Flusilazole



Flutolonil



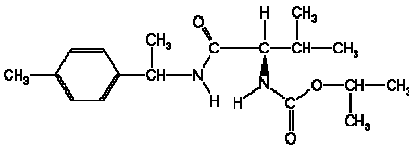
Furatiocarbe



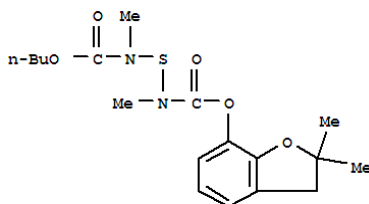
Imazalil



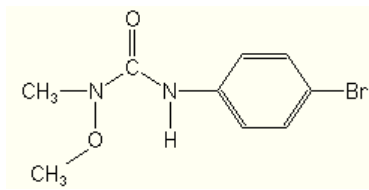
Flutriafol



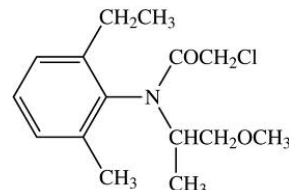
Iprovalicarbe



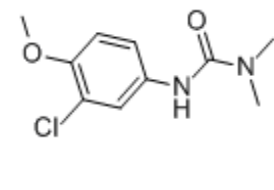
Mefosfolam



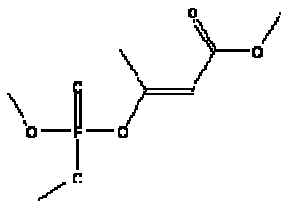
Metobromuron



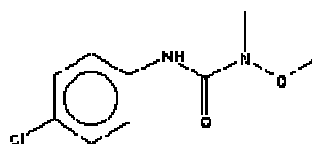
Metolacoloro



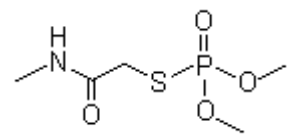
Metoxurom



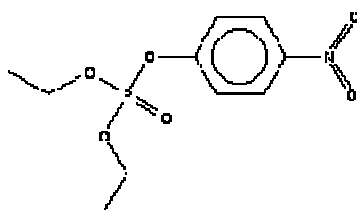
Mevinfós



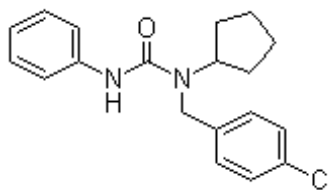
Monolinurom



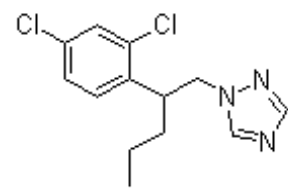
Ometoato



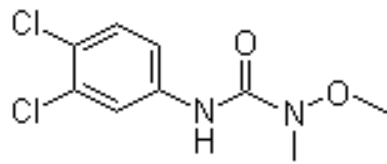
Paraoxom etílico



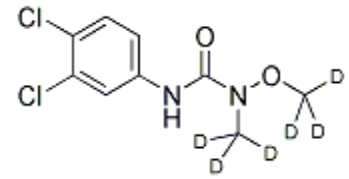
Pencicurom



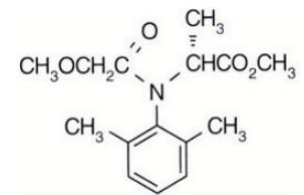
Penconazol



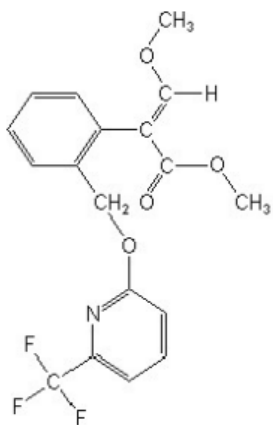
Linurom



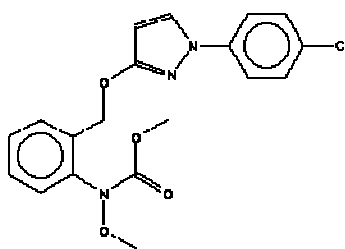
Linurom d-6 (PC)



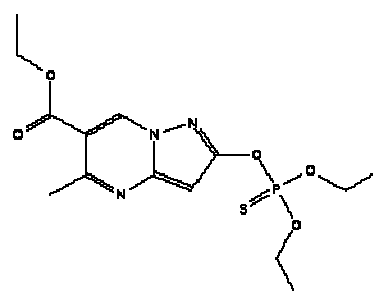
Metalaxil-M



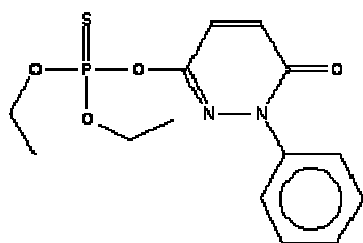
Picoxistrobina



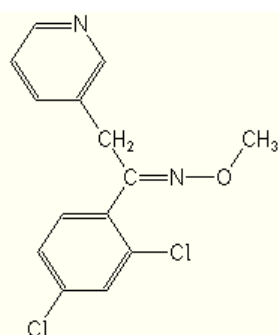
Piraclostrobina



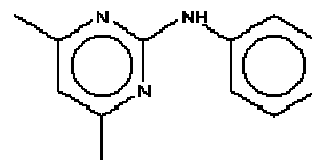
Pirazofós



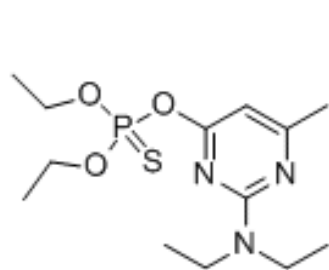
Piridafentiona



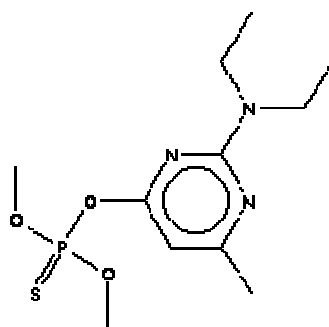
Pirifeno



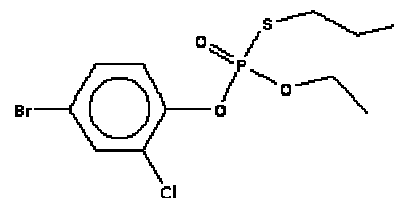
Pirimetanil



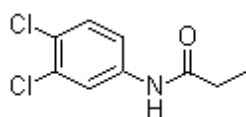
Pirimifós etílico



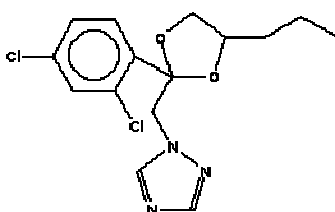
Pirimifós metílico



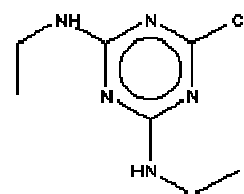
Profenofós



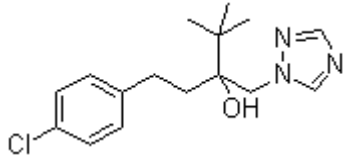
Propanil



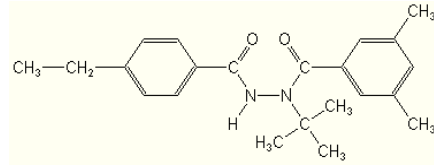
Propiconazol



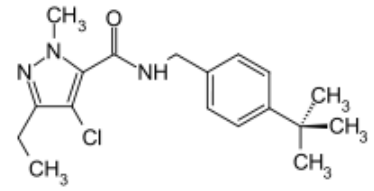
Simazina



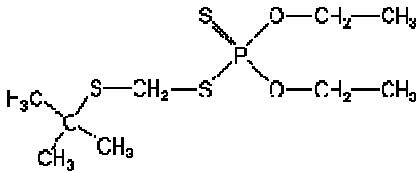
Tebuconazol



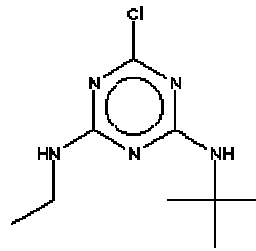
Tebufenozida



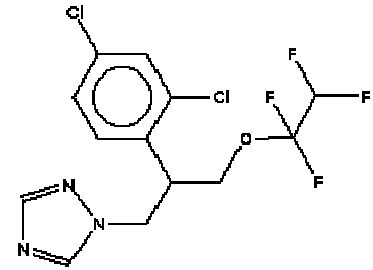
Tebufenpirade



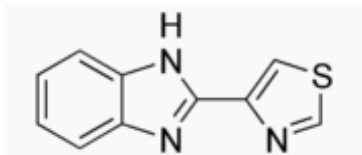
Terbufós



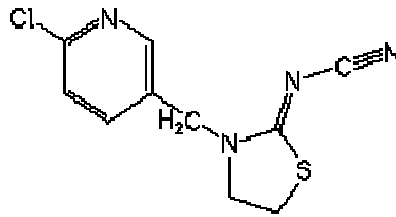
Terbutilazina



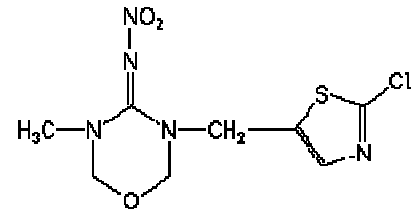
Tetraconazol



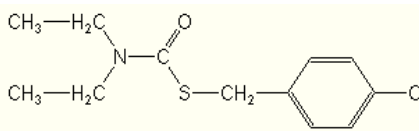
Tiabendazol



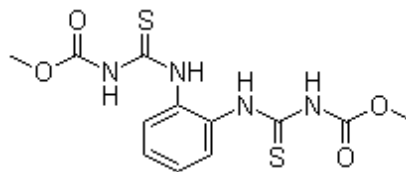
Tiacloprido



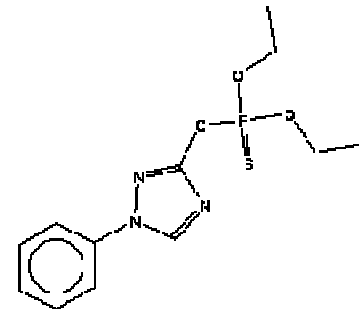
Tiametoxam



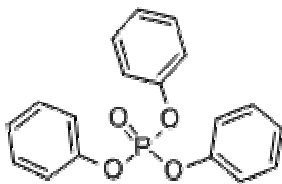
Tiobencarbe



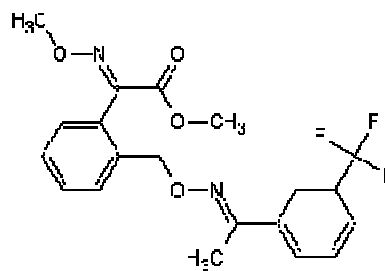
Tiofanato metílico



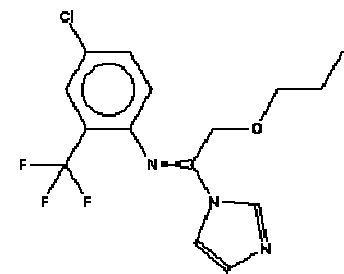
Triazofós



Trifenilfosfato (PI)

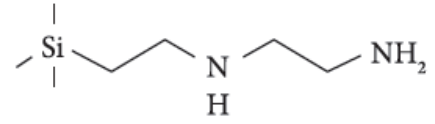
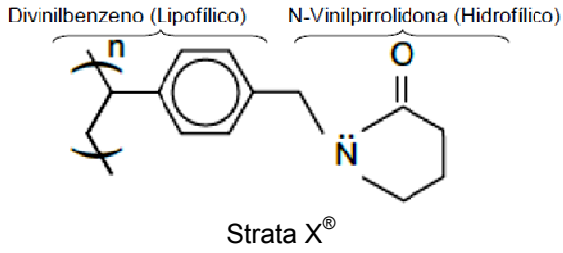


Trifloxistrobina

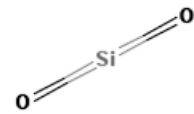
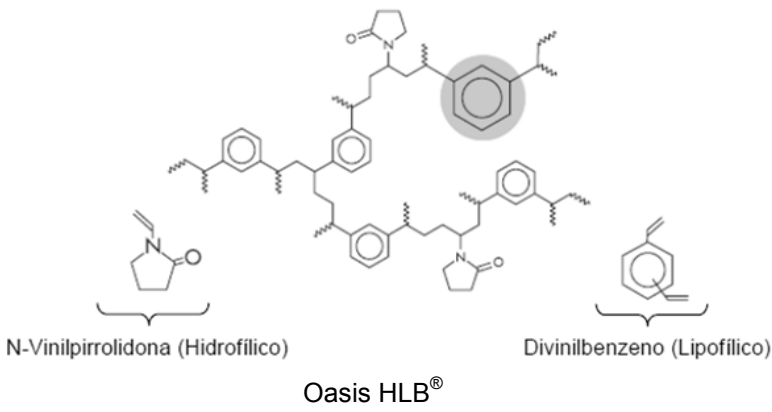


Triflumizol

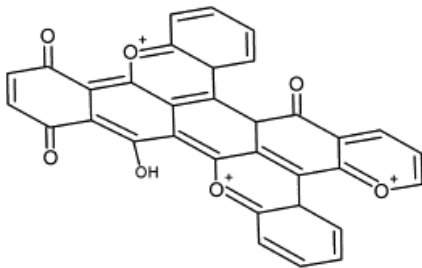
Anexo B – Estruturas dos sorventes utilizados para limpeza do extrato.



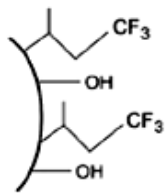
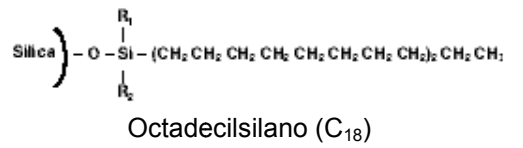
Etilenodiamino-N-Propil (PSA)



Terra diatomácea



Carvão grafitizado



Fase Fluorada

Anexo C – Cromatogramas UHPLC-MS/MS, no modo SRM, a partir de solução preparada no extrato “branco” de pimentão, na concentração de 20 µg L⁻¹.

