

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

Gabrieli Bernardi

**AGROTÓXICOS EM VINHO: AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS E DA
MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA NA DETERMINAÇÃO
MULTIRRESÍDUO POR UHPLC-MS/MS**

**Santa Maria, RS,
2017**

Gabrieli Bernardi

**AGROTÓXICOS EM VINHO: AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS E DA
MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA NA DETERMINAÇÃO
MULTIRRESÍDUO POR UHPLC-MS/MS**

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado 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 a
obtenção do grau de **DOUTORA EM QUÍMICA**.

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

**Santa Maria, RS
2017**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bernardi, Gabrieli
AGROTÓXICOS EM VINHO: AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS E DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA NA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO POR UHPLC-MS/MS / Gabrieli Bernardi.- 2017.

127 p.; 30 cm

Orientador: Renato Zanella
Coorientador: Osmar Damian Prestes
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2017

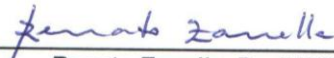
1. QuEChERS 2. Agrotóxicos 3. Vinho 4. UHPLC-MS/MS 5. DLiME I. Zanella, Renato II. Damian Prestes, Osmar III. Título.

Gabrieli Bernardi

**AGROTÓXICOS EM VINHO: AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS E DA
MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA NA DETERMINAÇÃO
MULTIRRESÍDUO POR UHPLC-MS/MS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado
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 a obtenção do título
de **DOUTORA EM QUÍMICA**

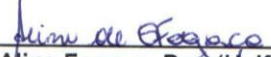
Aprovada em 10 de março de 2017



Renato Zanella, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



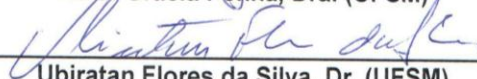
Manoel Leonardo Martins, Dr. (FURG)



Aline Fogaça, Dra. (Unifra)



Neidi Gracia Penna, Dra. (UFSM)



Ubiratan Flores da Silva, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todas as pessoas importantes que fazem parte minha vida e ajudam a contruir a minha história.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Renato Zanella, agradeço pela orientação, amizade e principalmente por ter me proporcionado a oportunidade maravilhosa de fazer parte da equipe LARP durante esses anos.

Ao Prof. Osmar Damian Prestes, co-orientador desse trabalho, agradeço acima de tudo pela amizade, disponibilidade em ajudar e em dividir o conhecimento, virtude essa, que desempenha de maneira excepcional. És uma pessoa diferenciada com seu otimismo e alegria. Como muitas vezes dito durante esses anos, obrigada Osmar!!

À Profa. Martha Bohrer Adaime, agradeço a amizade, a oportunidade de fazer parte do LARP e a disponibilidade em ajudar sempre a todos.

Aos membros da banca Prof. Manoel Leonardo Martins, Profa. Aline Fogaça, Profa. Neidi Garcia Penna e Dr. Ubiratan Flores da Silva pelas excelentes contribuições e comentários na banca examinadora da defesa desta Tese.

Ao Harry, meu amor, que fez parte desse trabalho, sempre ao meu lado me apoiando com muita paciência. Agradeço acima de tudo pelo seu companheirismo e por me ensinar a ser uma pessoa melhor a cada dia que passa. Te amo!

Aos meus pais, Raul e Ocirilde e ao meu irmão Guilherme, vocês são o alicerce dessa caminhada. Agradeço pela ajuda, compreensão e desprendimento que fizeram com que eu pudesse sair de casa e realizar meus objetivos. Vocês são meus exemplos e esse trabalho é para vocês!

A todos os meus colegas do LARP, agradeço a ajuda, o apoio e aos momentos de descontração que fizeram esses anos tão maravilhosos. Agradeço de maneira especial a Magali por ser mais que

uma colega, sua amizade e dedicação tornaram esses anos melhores, você é uma pessoa especial. Obrigada Filipe, Nelson e Lucila, os trapalhões jamais serão esquecidos!! Vocês são demais!

À UFSM e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) pela contribuição essencial na minha formação.

Ao Ademir e Valéria, funcionários do PPGQ, pela gentileza, simpatia e atenção no atendimento de suas tarefas.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

RESUMO

AGROTÓXICOS EM VINHO: AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS E DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA NA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO POR UHPLC-MS/MS

AUTORA: Gabrieli Bernardi
ORIENTADOR: Prof. Dr. Renato Zanella

O uso generalizado de agrotóxicos na agricultura trouxe muitos benefícios em relação ao aumento da quantidade e qualidade das culturas produzidas. Entretanto, existe uma preocupação com relação à presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos e produtos comerciais consumidos. Devido a isso, torna-se necessário o monitoramento de agrotóxicos nesses produtos a fim de verificar a observância dos limites máximos de resíduos. O vinho é uma bebida obtida a partir do mosto da uva, porém as uvas cultivadas para esse fim são suscetíveis ao ataque de pragas e a ocorrência de doenças fúngicas. Uma vez que a qualidade do vinho depende fortemente da qualidade das uvas, a sua produção é dependente do uso de agrotóxicos. Atualmente, a maneira mais útil para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos é a aplicação de métodos multirresíduo que permitam a determinação de inúmeros compostos, de diversas classes, em um único processo analítico. Pensando nisso, esse trabalho teve como objetivo a avaliação de dois métodos de extração multirresíduo de agrotóxicos em vinho, sendo um deles baseado no método QuEChERS e outro na técnica de extração denominada microextração líquido-líquido dispersiva com uso de solvente demulsificante (SD-DLLME). Os parâmetros que afetam a eficiência de extração foram estudados para ambos e depois de encontradas as melhores condições de extração os mesmos foram validados. A determinação por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS) permitiu a realização das análises com alta seletividade e sensibilidade. Para o método QuEChERS foram validados 97 compostos sendo que o limite de quantificação do método (LOQm) variou de 10 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para a SD-DLLME, 74 compostos foram validados e o LOQm entre 0,1 e 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$. Dentre os compostos que não foram validados pela SD-DLLME estão compostos com características polares, não adequados para essa técnica. Os métodos validados foram utilizados para a determinação de agrotóxicos em amostras de vinho. Foram encontrados resíduos de agrotóxicos de diferentes classes nas concentrações de 0,8 a 55,3 $\mu\text{g L}^{-1}$. Tendo em vista os resultados obtidos, a utilização da SD-DLLME demonstrou ser uma alternativa viável ao método QuEChERS para determinação multirresíduo de agrotóxicos em vinho.

Palavras-chave: QuEChERS, DLLME, agrotóxicos, UHPLC-MS/MS

ABSTRACT

PESTICIDES IN WINE: EVALUATION OF QuEChERS METHOD AND DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION FOR THE MULTIRESIDUE DETERMINATION BY UHPLC-MS/MS

AUTHOR: Gabrieli Bernardi
ADVISOR: Prof. Dr. Renato Zanella

The widespread use of pesticides in agriculture has brought many benefits such as, increasing quantity and quality of crops grown. However, there is a concern regarding to the presence of pesticide residues in the consumed manufactured food products. Due to this, it is necessary to monitor pesticides in these products in order to verify compliance with maximum residue limits. Wine is a beverage obtained from grape must, but the grapes grown for this purpose are susceptible to pest attack and the occurrence of fungal diseases. Since the wine quality is related to the grapes quality, its production is dependent on the use of pesticides. Currently, the most useful way to determine the pesticides residues in food is the application of multiresidue methods that allow the determination of several compounds from different classes in a single analytical process. Based on that, the aim of this work was to evaluate two multiresidue methods for the extraction of pesticides in wine, one of them being based on the QuEChERS method and the dispersive liquid-liquid microextraction with the use of demulsifying solvent (SD-DLLME). Parameters that affect the extraction efficiency of both methods were studied and after established the best extraction conditions the methods were validated. The use of ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) allowed to perform the determination with high selectivity and sensitivity. For the QuEChERS method, 97 compounds were validated and the limit of quantification of the method (LOQ) ranged from 10 to 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. For SD-DLLME, 74 compounds were validated and LOQ were between 0.1 and 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$. Among the compounds not validated by SD-DLLME are compounds with polar characteristics, not suitable for this technique. Pesticides residues of different classes were found in the samples the concentrations of 0.8 to 55.3 $\mu\text{g L}^{-1}$. In view of the results obtained, the use of SD-DLLME proved to be a viable alternative to the QuEChERS method for the multiresidue determination of pesticides in wine.

Keywords: QuEChERS, DLLME, pesticides, UHPLC-MS/MS

Lista de Figuras

Figura 1 - Composição química do vinho.....	20
Figura 2 - Representação da extração por SD-DLLME (Adaptada de CHEN et al., 2010)	41
Figura 3 - Principais etapas do processo de extração por SD-DLLME.....	59
Figura 4 - a) Cromatograma de íons totais obtido por UHPLC-MS/MS a partir de uma solução 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ preparado no solvente acetonitrila, b) transições SRM para alguns compostos do método.....	66
Figura 5 - Número de compostos que apresentaram recuperações médias entre 70 e 120% e RSD \leq 20% (n= 3) para os testes avaliados no nível de fortificação de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.	67
Figura 6 – Comparação visual dos extratos em acetonitrila obtidos a partir dos métodos QuEChERS original (T1), citrato (T2), acetato (T3) e acetato modificado (T4).....	69
Figura 7 - Avaliação do efeito matriz por UHPLC-MS/MS para os compostos extraídos pelos métodos QuEChERS acetato (T3) e modificado (T4).	70
Figura 8 - A) Avaliação visual dos extratos após evaporação; B) Resultado em massa (g) da análise gravimétrica para os diferentes sorventes avaliados neste trabalho. T5-Florisil (125 mg), T6-Strata-X (125 mg), T7-Quitosan (125 mg), T8-C18 e PSA (350 e 125 mg), T9-Florisil e PSA (350 e 125 mg), T10-PSA (125 mg), T11-PSA e GCB (125 e 20 mg), T12-PSA, C18 e GCB (100, 200 e 20 mg).....	72
Figura 9 - Número de compostos recuperados na faixa de 70-120% com RSD \leq 20% para cada teste realizado no nível de fortificação de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n= 3) analisados por UHPLC-MS/MS.....	72
Figura 10 - Cromatograma no modo fullscan obtido por GC-MS/MS do extrato de vinho após a etapa de limpeza com a utilização de a) PSA, b) PSA e Florisil e c) PSA e C18...	74
Figura 11 - Procedimento do método QuEChERS miniaturizado	75
Figura 12 - A) Composto tebuconazol e B) amostra branco de vinho extraídos pelo método QuEChERS.....	76
Figura 13 - Efeito matriz para os compostos extraídos pelo método QuEChERS miniaturizado	79
Figura 14 - Número de compostos com RSD \leq 20% para os modos de agitação avaliados nesse trabalho no nível de fortificação de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n= 6).....	84
Figura 15 - Comparação entre os tipos de agitação avaliados para alguns compostos que apresentaram RSD adequado (\leq 20%).....	84

Figura 16 - Área média obtida por UHPLC-MS/MS para alguns compostos avaliados mediante a combinação dos solventes de extração (100 μL) e dispersão (500 μL) no nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (n= 6).....	87
Figura 17 - Relação existente entre a área e o valor do log de Kow para alguns compostos selecionados independente da combinação de solventes utilizados.	88
Figura 18 - Área média obtida por UHPLC-MS/MS para alguns compostos durante a avaliação do volume de solvente extrator utilizando 1-octanol e 500 μL de acetonitrila como dispersor no nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (n= 6).	91
Figura 19 - Área média obtida por UHPLC-MS/MS para alguns compostos durante a avaliação do volume de solvente dispersor utilizando acetonitrila e 100 μL 1-octanol como extrator no nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (n= 6).....	93
Figura 20 - Área média obtida por UHPLC-MS/MS para alguns compostos durante a avaliação do pH da amostra na eficiência de extração utilizando 600 μL de acetonitrila como dispersor e 100 μL 1-octanol como extrator no nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (n= 6).	95
Figura 21 - Área média obtida por UHPLC-MS/MS para alguns compostos durante a avaliação de diferentes sais na eficiência de extração utilizando 600 μL de acetonitrila como dispersor e 100 μL 1-octanol como extrator no nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (n= 6).	97
Figura 22 - A) Composto dimetomorfe e B) branco de vinho extraídos pela SD-DLLME ..	99
Figura 23 - Efeito matriz para os compostos extraídos SD-DLLME.....	101

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Tabela de agrotóxicos monitorados pelo PARA com os LMRs para a uva pela União Europeia e Codex alimentarius.....	25
Tabela 2 - Diferentes aplicações empregando o método QuEChERS e DLLME para determinação de resíduos de agrotóxicos em vinho por técnicas cromatográficas.	42
Tabela 3 - Relação dos compostos em estudo, com informações de pKa, Log Kow, classe e grupo químico.	51
Tabela 4 - Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de agrotóxicos em vinho no sistema UHPLC-MS/MS.	55
Tabela 5 - Parâmetros utilizados no sistema UHPLC-MS/MS para análise de resíduos de agrotóxicos em vinho	56
Tabela 6 - Relação dos testes de extração e limpeza realizados para análise dos compostos selecionados em amostras de vinho	57
Tabela 7 - Propriedades físico-químicas dos solventes de extração e dispersão utilizados	60
Tabela 8 - Parâmetros avaliados na etapa de validação dos métodos descritos nesse trabalho.....	62
Tabela 9 - Agrotóxicos analisados por UHPLC- MS/MS, utilizando o modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção (t_R), íons precursores e produtos para a quantificação e identificação.....	63
Tabela 10 - Resultados obtidos na etapa de validação do método QuEChERS para os parâmetros de validação LOQ, LOD, exatidão, precisão, precisão intermediária e efeito matriz.....	80
Tabela 11 - Resultados obtidos na etapa de validação do método SD-DLLME para os parâmetros de validação LOQ, LOD, exatidão, precisão, precisão intermediária e efeito matriz.....	102
Tabela 12 - Resultados em $\mu\text{g L}^{-1}$ das 22 amostras analisadas utilizando o método QuEChERS miniaturizado e SD-DLLME e determinação por UHPLC-MS/MS.....	107
Tabela 13 - Comparação entre os métodos QuEChERS miniaturizado e SD-DLLME para extração de agrotóxicos em vinho.	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APCI – Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*
- APPI – Fotoionização a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*
- BEH – Sílica híbrida do inglês *Ethylene Bridged Hybrid*
- CI – Ionização Química, do inglês *Chemical Ionization*
- CID – Dissociação Induzida por Colisão, do inglês *Collision-Induced Dissociation*
- CV – Coeficiente de Variação
- DAD – Detector por Arranjo de Diodos, do inglês *Diode Array Detector*
- DC – Corrente Direta, do inglês *Direct Current*
- d. i. – Diâmetro interno
- d. p. – Diâmetro de partícula
- d-SPE – Extração em Fase Solida Dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*
- ECD – Detector por Captura de Elétrons, do inglês *Electron Capture Detector*
- EI – Ionização por Elétrons, do inglês *Electron Ionization*
- ESI – Ionização por Eletro nebulização, do inglês *Electrospray Ionization*
- FD – Detector de Fluorescência, do inglês *Fluorescence Detector*
- FE – Fase Estacionária
- FM – Fase Móvel
- GCB – Carvão grafiteado, do inglês *Graphitized Carbon Black*
- GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do Inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*
- GC-MS/MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em série, do ingles *Gas Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*
- HAc – Ácido acético
- HCl – Ácido clorídrico
- HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*
- IDA – Ingestão Diária Aceitável
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- LARP – Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas
- LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em série, do inglês *Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*
- LMR – Limite Máximo de Resíduo
- LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*
- LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*
- m/z – Razão massa carga
- MAE – Extração Assistida por Micro-ondas, do inglês *Microwave Assisted Extraction*

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*
MS/MS – Espectrometria de Massas em série, do inglês *Tandem Mass Spectrometry*
MSPD – Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*
NPD – Detector de Nitrogênio e Fósforo, do inglês *Nitrogen Phosphorus Detector*
pH – Potencial Hidrognônico
PI – Padrão Interno
PLE – Extração Líquida Pressurizada, do inglês *Pressurised-Liquid Extraction*
PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PSA – Amina Primária Secundária, do inglês *Primary Secondary Amine*
QuEChERS – Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*
 r^2 – Coeficiente de Determinação
RF – Rádio Frequência
RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*
RSD_{pi} – Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária
RSD_r – Desvio Padrão Relativo para Repetitividade
SANTE – Saúde e Proteção do Consumidor, do francês *Santé et protection des consommateurs*
SBSE – Extração sortiva em barra de agitação, do inglês *Stir-Bar Sorptive Extraction*
SIM – Monitoramento do Íon Selecionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*
SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*
SPME – Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Microextraction*
SRM – Monitoramento Seletivo de Reações, do inglês *Selected Reaction Monitoring*
TIC – Cromatograma do Íon Total, do inglês *Total Ion Chromatogram*
TPP – Trifenilfosfato
 t_R – Tempo de retenção
UE – União Europeia
UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra-alta Eficiência, do inglês *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*
UV – Ultravioleta
UV-vis – Detecção por absorção molecular na região do ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVO GERAL	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 VITIVINICULTURA NO BRASIL	17
2.2 O VINHO	18
2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO VINHO	19
2.3.1 Compostos fenólicos	21
2.4 FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE DO VINHO	21
2.5 AGROTÓXICOS	22
2.5.1 Monitoramento de resíduos de agrotóxicos no Brasil	24
2.5.2 Ocorrência de agrotóxicos em vinhos	27
2.6 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS	29
2.6.1 Cromatografia líquida acoplada à Espectrometria de Massas para determinação de resíduos de agrotóxicos	31
2.7 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS	34
2.7.1 Método QuEChERS	35
2.7.2 Modificações do método QuEChERS	36
2.7.3 Microextração Líquido – Líquido Dispersiva (DLLME)	37
2.7.4 Modificações da DLLME	39
2.8 VALIDAÇÃO	44
2.8.1 Seletividade	45
2.8.2 Curva analítica e linearidade	45
2.8.3 Efeito matriz	45
2.8.4 Limites de detecção e quantificação	46
2.8.5 Precisão	48
2.8.6 Exatidão	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 INSTRUMENTAÇÃO	49
3.2 REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS UTILIZADOS	49
3.3 AMOSTRAS DE VINHO	50
3.4 COMPOSTOS SELECIONADOS E PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS ...	51
3.4.1 Utilização do Padrão interno (PI) e Padrão de controle (PC)	54
3.5 CONDIÇÕES DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM VINHO	54

3.6 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS PARA EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM VINHO	56
3.6.1 Etapa de extração/partição.....	54
3.6.2 Etapa de limpeza (<i>clean-up</i>) dos extratos	57
3.6.3 Miniaturização do método QuEChERS.....	58
3.7 AVALIAÇÃO DA SD-DLLME PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM VINHO POR UHPLC-MS/MS	58
3.7.1 Avaliação do modo de agitação	60
3.7.2 Seleção do solvente extrator e dispersor.....	60
3.7.3 Escolha do volume do solvente de extração e dispersão	61
3.7.4 Efeito do pH	61
3.7.5 Adição de sal	61
3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS E DA SD-DLLME PARA EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM VINHO.....	61
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM VINHO	63
4.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM VINHO.....	67
4.2.1 Etapa de extração	67
4.2.2 Etapa de limpeza (<i>clean-up</i>)	71
4.2.3 Método QuEChERS miniaturizado para extração de agrotóxicos em amostras de vinho.....	74
4.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS E DA SD-DLLME PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE VINHO	76
4.3.1 Seletividade e Linearidade.....	76
4.3.2 Limites de detecção e quantificação	77
4.3.3 Exatidão, Precisão e Precisão Intermediária	77
4.3.4 Efeito Matriz	77
4.4. AVALIAÇÃO DO MÉTODO SD-DLLME PARA EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS AGROTÓXICOS EM VINHO POR UHPLC-MS/MS	83
4.4.1 Avaliação do modo de agitação do método.....	83
4.4.2 Seleção do solvente extrator e dispersor.....	85
4.4.3 Avaliação do volume de solvente extrator	89
4.4.4 Avaliação do volume de solvente dispersor	92
4.4.5 Influência da variação de pH da amostra	94
4.4.6 Adição de sal	96
4.5 CONDIÇÕES DA SD-DLLME AVALIADA	98

4.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO SD-DLLME PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE VINHO	98
4.6.1 Seletividade e linearidade	98
4.6.2 Limites de detecção e quantificação	99
4.6.3 Exatidão, Precisão e Precisão Intermediária	99
4.6.4 Efeito Matriz	100
5 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS.....	105
5.1 APLICAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS MINIATURIZADO PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE VINHO	105
5.2 APLICAÇÃO DA SD-DLLME PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE VINHO	105
6 AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO UTILIZADOS.....	108
7 CONCLUSÕES	110
8 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS	111
9 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
APÊNDICE A – Área média obtida por UHPLC-MS/MS para alguns compostos avaliados mediante a combinação dos solventes de extração (100 µL) e dispersão (500 µL) no nível de fortificação de 0,5 µg L ⁻¹ (n=6).....	125
APÊNDICE B - Área média obtida por UHPLC-MS/MS para alguns compostos durante a avaliação do volume de solvente extrator utilizando 1-octanol e 500 µL de acetonitrila como dispersor no nível de fortificação de 0,5 µg L ⁻¹ (n=6).	126
APÊNDICE C - Área média obtida por UHPLC-MS/MS para alguns compostos durante a avaliação do volume de solvente dispersor utilizando acetonitrila e 100 µL 1-octanol como extrator no nível de fortificação de 0,5 µg L ⁻¹ (n=6)	127
APÊNDICE D - Área média obtida por UHPLC-MS/MS para alguns compostos durante a avaliação do pH da amostra na eficiência de extração utilizando 600 µL de acetonitrila como dispersor e 100 µL 1-octanol como extrator no nível de fortificação de 0,5 µg L ⁻¹ (n=6).....	128
APÊNDICE E - Área média obtida por UHPLC-MS/MS para alguns compostos durante a avaliação de diferentes sais na eficiência de extração utilizando 600 µL de acetonitrila como dispersor e 100 µL 1-octanol como extrator no nível de fortificação de 0,5 µg L ⁻¹ (n=6).....	130

1 INTRODUÇÃO

O Rio Grande do Sul é o maior produtor brasileiro de vinhos, suco de uva e derivados. No estado, são elaborados, em média, 300 milhões de litros de vinhos e mostos por ano (IBRAVIN, 2017a). Entretanto, a videira está sujeita a uma série de doenças, que tornam a uva imprópria para a produção de vinhos de qualidade, acarretando prejuízos na produção. Para solucionar esse problema, muitos produtores fazem uso da aplicação de agrotóxicos. A legislação brasileira não estabelece limites máximos de resíduos (LMR) de agrotóxicos para o vinho. Porém, estabelece LMR para 49 compostos que possuem o uso na cultura da uva (ANVISA, 2017). Estudos realizados por diferentes pesquisadores reportam que, mesmo após o processo de vinificação, os agrotóxicos que foram aplicados durante o cultivo da uva podem ser transferidos para o vinho. (CABRAS & ANGIONE, 2000; WALORCZYK et al., 2011).

Diante disso, resíduos de agrotóxicos podem ser encontrados no vinho normalmente em baixas concentrações. Além disso, o vinho possui uma grande quantidade de substâncias presentes naturalmente na sua composição. Devido a isto, a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de vinho é um desafio. Neste sentido, a etapa de preparo de amostra é fundamental para garantir a eficiência das determinações analíticas, especialmente na análise de resíduos de compostos orgânicos em alimentos. Nos últimos anos, diferentes métodos de preparo de amostra foram amplamente utilizados para a análise de resíduos de agrotóxicos em vinho, como a extração em fase sólida (SPE) e a extração líquido-líquido (LLE). Entretanto, face às desvantagens, novos métodos foram introduzidos, buscando aliar a eficiência de extração a questões como, redução da utilização de solventes orgânicos e da geração de resíduos (TOMASINI *et al.*, 2011).

Dentro deste contexto, o método QuEChERS (acrônimo do inglês para *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*), proposto por Anastassiades *et al.*, (2003) tornou-se uma alternativa e, atualmente é o método mais utilizado para determinação de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais, juntamente com as modificações propostas por LEHOTAY e colaboradores (2005) e Anastassiades e colaboradores (2007). A Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) é uma técnica de extração desenvolvida para a análise de compostos orgânicos em amostras aquosas (REZAEI *et al.*, 2006). Atualmente, diversas modificações foram introduzidas a esta técnica, proporcionando a extração de

agrotóxicos em diferentes matrizes. Do ponto de vista comercial, econômico e ambiental, as vantagens da DLLME em relação aos métodos convencionais estão baseadas na rapidez, baixo custo e o uso de menores quantidades de solventes orgânicos na etapa de extração.

Além das técnicas de preparo de amostra, o avanço na área cromatográfica com a utilização da cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry*), tem possibilitado análises mais rápidas e com maior seletividade, podendo-se atingir limites mais baixos de resíduos nas amostras. (MALDANER & JARDIM, 2012).

1.1 OBJETIVO GERAL

Considerando a importância da etapa de preparo de amostra, este trabalho teve como objetivo avaliar e validar os métodos de extração QuEChERS e a SD-DLLME para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em vinho por UHPLC-MS/MS. Para avaliar e validar os métodos, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Avaliar as melhores condições do método QuEChERS para extração dos analitos selecionados e reduzir as quantidades de reagentes e solventes utilizados;
- ✓ Avaliar as condições de extração da SD-DLLME com enfoque no efeito de alguns parâmetros como o solvente extrator, solvente dispersor, pH e adição de sal;
- ✓ Validar os métodos, avaliando: curva analítica, linearidade, efeito matriz, limites de quantificação e detecção, precisão e exatidão;
- ✓ Traçar um comparativo entre os métodos avaliados QuEChERS e SD-DLLME;
- ✓ Aplicar os métodos validados para verificar a ocorrência de resíduos de agrotóxicos em diferentes amostras de vinho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 VITIVINICULTURA NO BRASIL

A vitivinicultura é a atividade que envolve o cultivo de uvas para a fabricação de vinho. A produção de vinho no Brasil começou a ganhar importância econômica a partir de 1875 com a vinda de imigrantes europeus para o Brasil. Com a chegada dos imigrantes e estabelecimento em regiões como a Serra Gaúcha, foram introduzidas uma série de melhorias na produção da bebida o que significou um grande impulso na produção de vinho no estado do Rio Grande do Sul (IBRAVIN, 2017b).

Na década de 90 a abertura econômica do Brasil propiciou a melhoria das vinícolas através do acesso a diferentes cultivares de uvas e a incorporação de novas técnicas enológicas, além disso, o aumento da concorrência estimulou os produtores na busca de um produto cada vez mais competitivo.

Atualmente, a vitivinicultura é uma atividade consolidada e economicamente importante para o Brasil tanto no âmbito do mercado interno quanto para as exportações. No primeiro semestre de 2013, o mercado interno brasileiro comercializou 107,9 milhões de litros de vinhos finos, de mesa e espumantes. Este resultado representou um incremento de 2,54% com relação ao mesmo período de 2012. De janeiro a junho de 2016, o país comercializou para o exterior 835,5 mil litros de vinhos engarrafados.

No ano de 2002, o Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN) em parceria com a Agência Brasileira de Promoção de Exportações e Investimentos (APEX-BRASIL) criaram o projeto *Wines of Brasil* que tem como missão promover a qualidade dos vinhos brasileiros no mercado internacional. Dentre os países alvo do projeto, cinco mercados internacionais são considerados prioritários: Alemanha, China / Hong Kong, Estados Unidos, Países Baixos e Reino Unido. Dados das exportações no primeiro semestre de 2014 apontaram o Reino Unido como o principal destino dos vinhos engarrafados brasileiros, representando 19,6% em volume de vinho exportado pelo Brasil (IBRAVIN, 2017b).

A viticultura brasileira ocupa, atualmente, uma área de 81 mil hectares, com vinhedos desde o extremo Sul até regiões próximas à Linha do Equador. Dentre as regiões produtoras, destacam-se: Serra Gaúcha, Campanha, Serra do Sudeste e Campos de Cima da Serra, todas situadas no RS. Além dessas, o Planalto

Catarinense, em Santa Catarina, e o Vale do São Francisco, no Nordeste do país. O Rio Grande do Sul aparece como o principal produtor brasileiro de uvas para vinificação contribuindo, em média, com 777 milhões de quilos de uva por ano sendo responsável por mais de 90% do total de uvas processadas no país. Outra região de destaque são os polos frutíferos de Petrolina/PE e de Juazeiro/BA no Submédio do Vale do São Francisco, essa região é responsável por 95% das exportações nacionais de uvas finas de mesa (MELLO, 2013; MAPA, 2015).

2.2 O VINHO

O vinho de acordo com a portaria nº 229 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) é definido como sendo a bebida obtida da fermentação alcoólica do mosto de uva sã, fresca e madura. O mosto simples de uva é o produto obtido pelo esmagamento ou prensagem da uva com a presença ou não de suas partes sólidas. Sendo assim, não se recomenda o uso do termo vinho para produtos obtidos de quaisquer outras matérias-primas (BRASIL, 1988). Ainda segundo a portaria n.º 229, o vinho pode ser classificado quanto a Classe, (Vinho de mesa, Vinho espumante, Vinho licoroso e Vinho composto) e quanto ao Tipo, (Vinho tinto, rosado e branco). No Brasil, os vinhos produzidos e consumidos em maior quantidade são os de mesa, em especial os tintos (MELLO, 2013). Os vinhos de mesa devem possuir graduação alcoólica de 8,6 a 14º GL (graus Gay Lussac), a 20°C. Vinhos de mesa finos são aqueles provenientes de uvas *Vitis Vinífera* (uvas de origem europeia destinada a produção de vinhos finos). Os vinhos de mesa são os que apresentam predominantemente características organolépticas de *Vitis Vinífera*, mas demonstram a presença de uvas híbridas e/ou americanas e os vinhos de mesa comum são os elaborados com uvas híbridas, americanas (*Vitis Labrusca*) e de outras variedades. Com relação à quantidade de açúcares totais, calculado em g L⁻¹ de glicose, o vinho de mesa poderá ser seco (< 5,0 g L⁻¹), meio seco (5,1-20 g L⁻¹) e suave (doce) (> 20,1 g L⁻¹) (BRASIL, 1988).

Com relação a vinificação, Hashizume (2001) definiu o processo como o conjunto de operações para transformar uva em vinho. Independente da classificação ou do tipo de vinho a ser produzido, a obtenção de um vinho de qualidade depende de algumas etapas que são consideradas determinantes. Dentre estas, está a fermentação alcoólica, que é definida como a transformação dos açúcares do mosto da

uva madura (glicose e frutose) em álcool etílico e outros componentes (glicerol, acetaldeído, ácido acético e lático, entre outros) (JACKSON, 2008). A fermentação dos açúcares é realizada por leveduras (principalmente as da espécie *Saccharomyces cerevisiae*) existentes na casca das uvas. Durante o processo, duas moléculas de CO₂ são liberadas e a concentração de álcool etílico vai aumentando até atingir cerca de 12% (v/v) tornando-se tóxico para as leveduras, neste ponto a fermentação termina (ZAMORA, 2009).

De acordo com Guerra (2010), o processo de fermentação alcoólica ocorre de maneira diferente para vinhos tintos, brancos e rosados. Nos vinhos tintos, ocorre simultaneamente com a maceração, ou seja, existe o contato com as partes sólidas da uva (cascas e sementes). Para os vinhos brancos, a fermentação ocorre sem a maceração, apenas com o suco da uva. Os vinhos rosados são fermentados normalmente utilizando o processo de maceração curta onde o tempo de maceração depende da cor desejada pelo enólogo. Desta forma, em termos de composição, a principal diferença entre os vinhos tintos, brancos e rosados está na quantidade de polifenóis totais presentes (flavonóides e não flavonóides), que será sempre maior nos vinhos tintos (GUERRA, 2010).

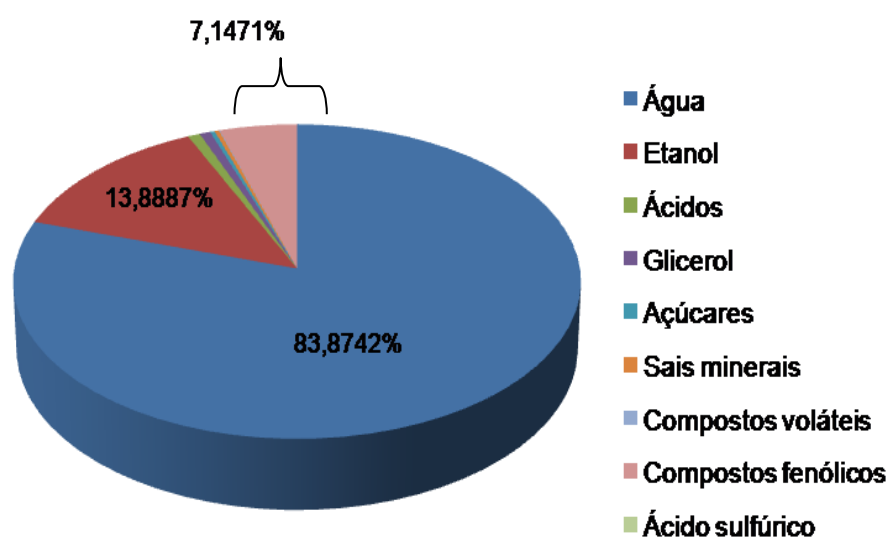
2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO VINHO

A composição química do vinho vem sendo objeto de estudo há vários anos devido à complexidade atribuída ao grande número de compostos presentes (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 2006). Apesar dos vários estudos, estima-se que o vinho possua mais de 1000 compostos químicos diferentes que contribuem para os aspectos sensoriais da bebida. Além de água e etanol, que são os constituintes principais, o vinho contém grande variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas. Esses constituintes são provenientes de 3 fontes principais: compostos provenientes da uva, compostos que são formados pela ação de microrganismos durante a fermentação e os compostos que são adicionados durante o processamento e envelhecimento do vinho (JACKSON, 2008). Apesar da grande quantidade de compostos, a água e o etanol representam aproximadamente 84% da composição total, o restante está dividido entre: açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e compostos voláteis (ésteres, aldeídos e cetonas) (Figura 1). Dos componentes adicionados os principais são:

anidrido sulfuroso, pectinas, gomas e mucilagens (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 2006; ALI *et al.*, 2010).

Do ponto de vista das determinações cromatográficas, o vinho é considerado como matriz complexa, devido ao grande número de compostos químicos presentes na sua composição. Dentre esses compostos, os ácidos de cadeia longa e os compostos fenólicos, em especial as antocianinas, possuem maior tendência a exercer influência tanto no preparo de amostra, como no sinal analítico.

Figura 1 - Composição química do vinho.



Fonte: Adaptado de RIBEREAU-GAYON e colaboradores, (2006).

No vinho, os ácidos orgânicos podem ser divididos em dois grupos, ácidos voláteis e não voláteis. Os ácidos voláteis apresentam cadeia carbônica curta sendo que, o ácido acético o componente mais representativo (90% do conteúdo de ácidos voláteis). Os principais ácidos não voláteis encontrados são os ácidos málico e tartárico. Durante a fermentação malolática o ácido málico é convertido a ácido láctico no vinho. O ácido tartárico juntamente com o ácido málico exercem papel importante na acidez do vinho e suas concentrações podem variar de 2 a 4 g L⁻¹ (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). O pH é um parâmetro importante para a qualidade do vinho, mínimas variações de pH provocam alterações na cor e nas características organolépticas do vinho.

Ácidos com cadeia carbônica variando entre C4 e C16 também estão presentes no vinho como por exemplo, o ácido dodecanóico. Estes ácidos podem ser sintetizados

pelas leveduras ou provirem do tecido das uvas. Encontram-se no vinho nas formas livre ou conjugada, normalmente na forma de ésteres etílicos (GALLART *et al.*, 1997).

2.3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são uma classe de compostos químicos que estruturalmente consistem em um grupo hidroxila ligado diretamente a um grupo hidrocarboneto aromático. Esses compostos englobam uma gama enorme de substâncias: fenóis simples, ácidos fenólicos (ácido benzóico e os derivados do ácido cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisados e ligninas. Com relação aos ácidos fenólicos podem ser divididos em ácidos benzóicos e derivados e ácidos cinâmicos e derivados. Já os flavonóides, possuem como subclasses principais os flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas e flavanóis. Dentro do grupo dos flavonóis encontra-se a classe das antocianinas que são as moléculas responsáveis por conferir cor a uva e também ao vinho (JACKSON, 2008). A coloração do vinho é uma combinação entre as antocianinas originais pertencentes à uva e seus derivados formados durante a fermentação. A forma como as antocianinas encontram-se no vinho é o que determina a estabilidade da cor da bebida. Estas moléculas apresentam diferentes estruturas em função do pH. Normalmente, as antocianinas originam soluções vermelhas quando em meio ácido, perdendo a cor com o aumento do pH (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006).

A determinação de resíduos de agrotóxicos empregando técnicas cromatográficas pode tornar-se um desafio devido a presença de pigmentos nas amostras, como previamente reportado em diferentes trabalhos (KEMMERICH *et al.*, 2015). Além da influência na determinação cromatográfica, a coloração da matriz pode gerar dificuldades também nas etapas de preparo de amostra, como reportado por WALORCZYK *et al.*, (2011) e RODRÍGUEZ-CABO *et al.*, (2011) na determinação de agrotóxicos em vinho.

2.4 FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE DO VINHO

A oferta de uvas no Brasil abrange os doze meses do ano com oscilações de períodos de maior ou menor oferta. No Vale do São Francisco, a oferta se dá em todos os meses do ano, enquanto em outras regiões há uma concentração em alguns

meses. No Rio Grande do Sul, o período de colheita das uvas coincide com o período de chuvas (janeiro/fevereiro). Um excesso de chuvas propicia a maior incidência de doenças na videira, em especial as fúngicas.

O míldio a antracnose e a glomerella são as principais doenças fúngicas da videira, podendo infectar todas as partes verdes da planta causando maiores danos quando afetam as flores e os frutos. Ao atacar as bagas, o fungo faz com que as mesmas se tornem escuras, duras, com superfícies deprimidas até que ocorra a queda. A ocorrência dessas doenças na videira causa danos ao cacho e conseqüentemente queda na produção e prejuízos econômicos. Segundo Chavarria e Santos (2009) a sanidade da uva é um aspecto extremamente importante na definição da qualidade dos vinhos. Desta forma, a quantidade de chuva durante o cultivo das uvas é um dos aspectos limitantes na produção de vinhos finos de qualidade. Algumas doenças fúngicas, além de prejudicar a produção das uvas, afetam também a qualidade dos vinhos durante o processo de vinificação e envelhecimento. Uvas com *Botrytis cinerea*, por exemplo, contêm maiores concentrações de tirosinase e lacase, que são enzimas responsáveis pela oxidação enzimática dos compostos fenólicos, prejudicando a cor, o aroma e o sabor dos vinhos (SÔNEGO *et al.*, 2005).

Tendo em vista a procura por parte das vinícolas, pela obtenção de vinhos de qualidade, a busca por alternativas que controlem o aparecimento de doenças nas uvas é constante. Nos dias atuais, a alternativa mais utilizada é a aplicação de agrotóxicos para minimizar os prejuízos causados por essas doenças. Assim, o sistema de produção de uvas praticado atualmente no Brasil é altamente dependente da aplicação de agrotóxicos.

2.5 AGROTÓXICOS

O termo agrotóxico, de acordo com 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). No Brasil, de acordo com a legislação vigente (Decreto Federal Brasileiro no. 4.074, de 4 de janeiro de 2002 que regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de Julho de 1989) agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, 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 substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento das plantas (BRASIL, 2002).

Em relação à classificação, os agrotóxicos podem ser agrupados de diferentes maneiras entre elas, quanto ao seu emprego, por exemplo: inseticidas (para o controle de insetos), herbicidas (para o controle de plantas daninhas), fungicidas (para o controle de fungos), acaricidas (para o controle de ácaros), moluscicidas (para o controle de moluscos), rodenticidas (para o controle de ratos), entre outros (BAIRD, 2002). Tais compostos também podem ser classificados em orgânicos: carbamatos (nitrogenados), clorados, organofosforados e clorofosforados e inorgânicos: compostos que apresentam em sua composição química arsênio, tálio, bário, nitrogênio, fósforo, cádmio, ferro, selênio, chumbo, cobre, mercúrio e zinco. Podem ainda ser botânicos: compostos de nicotina, piretrina, sabadina e rotenona (extraídas do timbó ou tingui - planta tóxica usada por índios brasileiros no preparo de arpões para pegar peixes). 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 arranjados (BAIRD, 2002).

O uso de agrotóxicos para a proteção de diferentes culturas representou um aumento no volume de produção, entretanto o aparecimento de resíduos destes compostos em alimentos é um dos grandes desafios para a atual saúde pública além dos órgãos ambientais, uma vez que os resíduos permanecem no meio ambiente. Em termos de toxicidade, no Brasil o Ministério da saúde classifica os agrotóxicos de acordo com a dose letal (LD_{50}), ou seja, a dose de uma substância química que provoca a morte de, pelo menos, 50% das espécies estudadas (geralmente, ratos ou camundongos), quando administrada pela mesma via, por exemplo, oral. A LD_{50} é representada em $mg\ kg^{-1}$ de massa viva (m.v.). Desta forma, compostos extremamente

tóxicos ($LD_{50} \leq 5 \text{ mg kg}^{-1}$ de m.v.) são considerados de classe I, os altamente tóxicos ($5 < LD_{50} \leq 50 \text{ mg kg}^{-1}$ de m.v.) são os de classe II e os medianamente tóxicos ($50 < LD_{50} \leq 500 \text{ mg kg}^{-1}$ de m.v.) classe III. Existem ainda os pouco ou muito pouco tóxicos, ($LD_{50} > 5000 \text{ mg kg}^{-1}$ de m.v) sendo esses considerados de classe IV (BARBOSA, 2004; ANVISA, 2014). É importante ressaltar que desde o ano de 2008 o Brasil lidera o consumo mundial de agrotóxicos com 300 mil toneladas ao ano. As razões para a grande utilização são diversas, mas incluem o fato de o Brasil ser um grande produtor mundial de grãos e também de frutas (CARNEIRO, 2015).

2.5.1 Monitoramento de resíduos de agrotóxicos no Brasil

O processo brasileiro de registro de agrotóxicos envolve entre outros órgãos, 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, 2016). 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 de uma substância, que ingerida diariamente durante toda a vida, não oferece risco apreciável a saúde, a 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. O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (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, 2016).

No ano de 2016, o PARA divulgou os resultados do monitoramento realizado entre os anos de 2013 e 2015. Foram monitoradas 12.051 amostras de alimentos de origem vegetal representativos da dieta da população brasileira, sendo que, 224 amostras eram de uva. Os resultados demonstraram que dos 73 agrotóxicos monitorados pelo programa, 51 estavam presentes nas amostras de uva entre eles, acefato (138 amostras), dimetomorfe (122 amostras) e difenoconazol (115 amostras)

foram os que apresentaram maior número de detecções nas amostras analisadas. Além disso, em 20 das amostras foi detectada a presença de resíduos acima do LMR para os compostos clotianidina, indoxacarbe, difenoconazol, dimetomorfe, ciproconazol, pirimetanil e carbendazim (ANVISA, 2016).

Em relação ao vinho, a legislação brasileira não estabelece limites individuais diferentes daqueles propostos para a cultura da uva. Segundo a portaria n.º 229 de 25 de outubro de 1988, os resíduos de defensivos agrícolas remanescentes no vinho só poderão resultar daqueles autorizados na cultura da uva, observados os limites estabelecidos pela legislação específica (BRASIL, 1988). Na União Europeia existe uma diferenciação nos limites para uvas de mesa e uvas destinadas a vinificação, entretanto, para o vinho também não existe uma regulamentação legal. Alguns países da Europa, como é o caso da Itália e da Suíça, estabeleceram limites específicos para o vinho incluindo um número limitado de compostos dos quais, boscalida (1 mg L^{-1}), fenamidona ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) e piraclostrobina ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$) fazem parte (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2009). Na tabela 1 estão listados os compostos monitorados pelo PARA e seus respectivos limites (LMR), além dos LMR estabelecidos pela União Europeia e pelo *Codex alimentarius* para esses compostos (ANVISA, 2015).

Tabela 1 - Tabela de agrotóxicos monitorados pelo PARA com os LMRs para a uva pela União Europeia e *Codex alimentarius*.

Compostos	continua		
	PARA (mg kg^{-1})	UE ¹ (mg kg^{-1})	CODEX (mg kg^{-1})
Abamectina	0,005	-	-
Ametrina	0,02	-	-
Azoxistrobina	0,5	2	-
Benalaxil	0,1	0,3	0,3
Bifentrina	0,1	0,2	-
Boscalida	3	5	-
Captana	2	0,02	-
Carbendazim	0,7	0,5	-
Carbofurano	1	0,01	-
Carbosulfano	1	0,01	-
Cimoxanil	0,2	-	-
Ciproconazol	0,1	-	-
Clorotalonil	5	3	-
Clotianidina	0,01	0,7	0,7
Cresoximetílico	0,5	-	-
Difenoconazol	0,2	0,5	0,1
Dimetomorfe	2	3	-
Ditiocarbamatos	3	-	-

Diurom	0,1	0,01	-
Etefom	0,1	2	-
Famoxadona	0,5	2	-
Fenamidona	0,2	0,5	-
Fenarimol	0,05	0,3	0,3

Compostos	PARA (mg kg ⁻¹)	UE ¹ (mg kg ⁻¹)	CODEX (mg kg ⁻¹)
Fentiona	0,5	0,01	-
Folpete	15	10	-
Imibenconazol	2	-	-
Imidacloprido	1	-	-
Indoxacarbe	0,02	2	-
Iprodiona	1	10	-
Iprovalicarbe	0,1	2	-
Lambda-cialotrina	0,3	0,2	-
Metalaxil-M	1	1	-
Metconazol	1	0,02	-
Miclobutanil	0,5	1	-
Permetrina	0,05	0,05	-
Piraclostrobina	2	0,01	-
Pirazofós	0,2	0,05	-
Pirimetanil	5	5	-
Piriproxifem	5	-	-
Procimidona	5	0,01	-
Simazina	0,02	0,01	-
Tebuconazol	2	1	-
Tetraconazol	0,3	-	-
Tiametoxam	0,5	0,9	-
Triadimefom	2	2**	-
Triadimenol	0,1	-	-
Triflumizol	0,1	3	-
Zoxamida	0,5	5	-

¹ Uvas para vinificação

**Soma dos compostos triadimenol e triadimefon

2.5.2 Ocorrência de agrotóxicos em vinhos

Apesar de grande parte dos países não estabelecer LMR para a ocorrência de agrotóxicos no vinho, nos últimos anos, alguns autores têm reportado a presença de agrotóxicos em amostras de vinhos. Em geral, a classe de compostos mais encontrados são os fungicidas. Segundo Flamini e Traldi (2010) fungicidas da classe das dicarboximidas são bastante utilizados na vitivinicultura para combater *Botrytis cinérea* sendo que, as videiras são tratadas no final do estágio vegetativo para prevenir o ataque dos fungos às frutas antes da colheita.

Entre os fungicidas mais utilizados, estão a procimidona, vincozolin e iprodiona. Apesar de serem classificados como agrotóxicos de baixa toxicidade (classe IV) o produto de degradação destes compostos é a 3,5-dicloroanilina, uma amina aromática de alta toxicidade (ČUŠ *et al.*, 2010; FLAMINI & TRALDI, 2010). Além das

dicarboximidas, os fungicidas pertencentes ao grupo químico dos triazóis também tem sido bastante utilizados para combater oídio, míldio, mofo cinzento e outras doenças fúngicas, entre os mais utilizados estão: triadimefon, penconazol, propiconazol e miclobutanil. Estes compostos são classificados como bastante tóxicos (Classes I e II) uma vez que afetam órgãos como fígado, rins, sistema urinário além de efeitos sobre o sistema nervoso central (BRIGGS, 1992). É válido ressaltar que esses compostos são tidos também como persistentes, logo, poderão estar presentes tanto nas uvas como no suco e no vinho.

Devido a vinificação a transferência dos agrotóxicos das uvas para o vinho torna-se um processo bastante complexo onde, alguns compostos tendem a permanecer mais do que outros. Os agrotóxicos que estiverem presentes na uva destinadas a vinificação irão primeiramente passar pela etapa de prensagem e desta forma entrarão em contato com o mosto que possui um pH ácido (2,7 – 3,7). O mosto consiste em um sistema bifásico contendo uma fase líquida e outra sólida. Um estudo realizado por Cabras e Angione (2000) reporta o comportamento de alguns agrotóxicos nesse sistema bifásico, compostos como miclobutanil e tetraconazol possuem mais afinidade pela parte sólida, logo deverão estar em concentrações muito baixas no mosto e por consequência no vinho. Entretanto, azoxistrobina, dimetoato e pirimetanil mantiveram a mesma concentração na uva e no mosto, logo, devem estar em concentração superior também no vinho. Ravelo-Pérez e colaboradores (2008) encontraram os fungicidas pirimetanil e procimidona nas concentrações de $1,18 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,72 \text{ mg L}^{-1}$ em amostras de vinho tinto produzidos artesanalmente (*homemade*) na Espanha. Economou e colaboradores (2009) analisaram 60 amostras de vinho produzidos na Grécia e encontraram resíduos de 8 diferentes tipos de agrotóxicos entre eles carbaril, carbendazim + benomil e metalaxil. Walorczyk e colaboradores (2011) reportaram a presença de 10 diferentes tipos de agrotóxicos em vinhos de diferentes países variando a concentração de $<0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ até $0,08 \text{ mg kg}^{-1}$ sendo que das 30 amostras avaliadas 15 estavam contaminadas. O composto prevalecente foi o iprovalicarbe (7 amostras). Chen e colaboradores (2016) realizaram a análise de 10 amostras de vinhos (5 vinhos tintos e 5 vinhos brancos) importados adquiridos em supermercados da China. Foram encontrados resíduos de molinato, difenilamina, metalaxil, miclobutanil e tebuconazol nas concentrações de 0,56 até $18,6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ sendo a maior concentração do composto metalaxil.

Nos últimos anos, poucos trabalhos reportaram a determinação de agrotóxicos em vinhos brasileiros. Em 2015, dos Anjos & Andrade determinaram agrotóxicos em vinhos dos tipos branco e rosé e encontraram resíduos de 11 agrotóxicos com concentrações de até $63 \mu\text{g L}^{-1}$. Entre os compostos detectados estão, carbofurano, molinato, diazinona, disulfotona, malationa, endosulfan, etiona, bifentrina, permetrina e azoxistrobina.

Os trabalhos anteriormente citados evidenciam a ocorrência de resíduos de agrotóxicos em vinhos. Assim, acentua-se a importância do desenvolvimento de métodos multirresíduo que possibilitem a investigação da presença destes compostos em vinho produzidos no Brasil. Devido as baixas concentrações em que os compostos são encontrados, muito por causa da diluição ocorrida no processo de vinificação, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos com baixos limites de detecção com capacidade para extrair de maneira eficiente os compostos mesmo estando estes, em baixas concentrações (FLAMINI & TRALDI, 2010).

2.6 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) e a cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) são técnicas de separação tradicionalmente empregadas nas análises de resíduos de agrotóxicos.

A cromatografia gasosa é uma técnica de separação com um poder de resolução excelente, que se baseia 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. Desde a década de 70 a GC combinada a diferentes tipos de detectores é utilizada para análise de agrotóxicos em alimentos e bebidas. Porém, com o desenvolvimento de agrotóxicos modernos, com características polares ou iônicos, que são menos persistentes e menos tóxicos ao meio ambiente, fez-se crescente a utilização da HPLC.

Na HPLC o principal requisito para a análise é a solubilidade dos compostos na fase móvel. Como a maioria dos compostos atualmente desenvolvidos não apresentam alta volatilidade para serem analisados por GC, 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). Estes detectores associados a cromatografia ainda são bastante aplicados para a análise de agrotóxicos em diferentes matrizes, especialmente quando aliados a técnicas de extração que possibilitem a concentração dos analitos (VIÑAS *et al.*, 2008; JOVANOV *et al.*, 2015). Tanto a GC quanto a HPLC passaram por diversas modificações ao longo dos anos sempre em busca de análises mais rápidas e eficientes. Assim, em meados de 2004, com a introdução da Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência (UHPLC, do inglês *Ultra-high performance Liquid Chromatography*) a cromatografia líquida passou por uma importante evolução com a utilização de partículas de fase estacionária porosas $\leq 2 \mu\text{m}$, sendo que na cromatografia líquida de alta eficiência as partículas de fase estacionária são da ordem $4 \mu\text{m}$ (MALDANER & JARDIM, 2012). A UHPLC fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da HPLC, tendo como principais diferenças as colunas cromatográficas empregadas que são de dimensões reduzidas (5-10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1 à 2,1 mm), recheadas com partículas de fase estacionária $\leq 2 \mu\text{m}$, as quais, juntamente com as altas velocidades lineares de fase móvel (FM) aumentam a resolução e a detectabilidade, diminuem o tempo das análises, porém, geram um aumento significativo na pressão cromatográfica do sistema de até 1000 bar (~ 15000 psi). Sistemas de UHPLC apresentam como características: 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) e detectores com alta taxa

de aquisição de dados. 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 diâmetros internos (d.i.) das tubulações (necessária para diminuir o volume extra coluna 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). Nos últimos anos, vários autores têm apostado no desenvolvimento de métodos multirresíduo utilizando UHPLC-MS/MS para determinação de agrotóxicos em amostras de alimentos, bebidas e de interesse ambiental (HANOT, 2015; MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ, 2015; HURTADO-SÁNCHEZ, 2013).

2.6.1 Cromatografia líquida acoplada à Espectrometria de Massas para determinação de resíduos de agrotóxicos

As técnicas cromatográficas podem ser combinadas a diferentes sistemas de detecção, como visto anteriormente. Dentre os diversos tipos de detectores a espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) tem apresentado grande destaque pela sua versatilidade de uso em ambas as técnicas (GC-MS, do inglês *gas chromatography coupled to mass spectrometry* e LC-MS do inglês, *liquid chromatography coupled to mass spectrometry*). CHIARADIA e colaboradores (2008) destacam que o acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da MS (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade).

O princípio básico da MS é a geração de íons decompostos 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 por 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). A cromatografia líquida quando acoplada à espectrometria de massas pode empregar as fontes de eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray ionization*), ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*) ou ainda fotoionização a pressão atmosférica (APPI, do inglês *atmospheric pressure photoionization*) (LANÇAS, 2009).

Atualmente, a ESI é a fonte de ionização mais utilizada. Nela o analito dissolvido na fase móvel passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (“*spray*”) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás (geralmente N_2) na região do “*spray*”. Com a dessolvatação o tamanho das gotas é reduzido até um ponto em que as forças de repulsão entre as cargas similares se tornam maiores do que as forças de

coesão da fase líquida (tensão superficial). Devido a esse efeito ocorre a chamada “explosão coulômbica” 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, os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (MALDANER & JARDIM, 2012).

Tanto na ESI como na APCI pode ocorrer a formação de adutos entre os íons moleculares e Na^+ , K^+ , NH_4^+ , HCOO^- e CH_3COO^- , que são espécies iônicas presentes nas FM provenientes dos modificadores adicionados a elas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Em todos os casos, a natureza do analito e as condições de separação tem uma forte influência sobre qual técnica de ionização (ESI, APCI ou APPI) irá promover os melhores resultados (STACHNIUK & FORMAL, 2016).

Com relação aos analisadores de massa, responsáveis pela separação dos íons de acordo com a m/z , atualmente existe uma grande variedade disponível no mercado. 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), aprisionamento de íons (do inglês, *ion trap*), tempo de voo e quadrupolo-tempo de voo.

O analisador do tipo triplo quadrupolo 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), 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). 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 CID o íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo e 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 N_2), levando a um aumento na energia potencial deste íon até ocasionar sua fragmentação, conduzindo a formação dos íons produto (LANÇAS, 2009; STASHENKO & MARTINEZ, 2010;). O analisador do tipo triplo quadruplo é um dos mais utilizados para quantificação de resíduos de agrotóxicos possuindo diversas aplicações na literatura (WALORCZYK; DROŹDŹYŃSKI; KIERZEK, 2015).

Dentre as técnicas de operação para obtenção do espectro de massas em MS/MS, estão a varredura completa (do inglês, *full scan*), monitoramento de íon selecionado (SIM, do inglês, *selected ion monitoring*), varredura do íon produto e a varredura do íon precursor e monitoramento seletivo de reações (SRM, do inglês *Selected Ion Monitoring*). O tipo de varredura *Full Scan* é muito comum quando não se sabe que componentes a amostra possui, logo se pode realizar um *screening* em uma ampla faixa de m/z . O cromatograma nestas condições é conhecido como cromatograma de íon total (TIC, do inglês *Total ion chromatogram*) (STASHENKO & MARTINEZ, 2010; STACHNIUK & FORNAL, 2016). O modo SIM é muito utilizado quando se tem apenas um quadrupolo, mas também pode ser utilizado no sistema triplo quadrupolo. 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 (STACHNIUK & FORNAL, 2016).

A varredura do íon produto consiste em selecionar um íon precursor de determinada m/z no Q1, que 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). No modo 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 detectabilidade para o monitoramento, associado ao significativo aumento na seletividade (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; STASHENKO & MARTÍNEZ, 2010). Nos dias atuais, a LC-MS/MS empregando analisadores de massa do tipo triplo quadrupolo no modo SRM é a plataforma mais utilizada na análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos e bebidas (STACHNIUK & FORNAL, 2016).

2.7 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

A etapa de preparo de amostra é uma parte essencial durante a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos e bebidas. Este processo destina-se a fornecer um extrato final representativo da amostra e que também seja adequado para as injeções nos sistemas cromatográficos. Além disso, quando possível o método de preparo de amostra deve envolver um número mínimo de etapas e fornecer resultados significativos de recuperação dos compostos que estão sendo avaliados (ZHANG *et al.*, 2012a). A determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos e bebidas apresenta certo grau de dificuldade devido à complexidade da matriz e às baixas concentrações em que estes compostos estão normalmente presentes. Assim, apesar dos avanços no desenvolvimento de instrumentação analítica a etapa de preparo de amostra continua sendo fundamental para a obtenção de resultados quantitativos precisos (REJCZAK & TUZIMSKI, 2015).

Desde o desenvolvimento do primeiro método multirresíduo para extração de agrotóxicos em 1963 (MILLS *et al.*, 1963), várias modificações foram propostas no sentido de tornar os métodos mais eficientes para um maior número de compostos. Além disso, os métodos de preparo de amostra passaram a apresentar uma tendência a menor utilização de solventes orgânicos, execução em menor tempo, porém, com sequência analítica adequada (REJCZAK & TUZIMSKI, 2015). Seguindo essa tendência, durante os anos 90, houve um grande desenvolvimento de métodos alternativos de extração como por exemplo, a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) (PRESTES *et al.*, 2009). Outros métodos surgidos durante esse período visavam também a simplificação de etapas, como por exemplo, dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *matrix solid phase dispersion*) (BARKER *et al.*, 1989) e a microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase extraction*) (ARTHUR e PAWLISZYN, 1990).

No ano de 1996 foram apresentados os primeiros trabalhos utilizando técnicas de microextração em fase líquida (LPME, do inglês *liquid phase microextraction*) (LIU & DASGUPTA 1996; JEANNOT & CANTWELL, 1996). A partir desses primeiros trabalhos, foram desenvolvidas diferentes variantes para a LPME, cada uma delas apresentando características específicas (MERIB & CARASEK, 2013). Entre esses métodos, estão a microextração com gota única (SDME, do inglês *single drop*

microextraction) (LIU & DASGUPTA, 1996) e a microextração em fase líquida suportada com membrana oca (HF-LPME, do inglês *hollow-fiber liquid phase microextraction*) (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 1999).

2.7.1 Método QuEChERS

Com o objetivo de superar as limitações práticas dos métodos multirresíduo existentes na época, Anastassiades e colaboradores (2003) introduziram um novo procedimento de preparo de amostra visando a extração de resíduos de agrotóxicos denominado QuEChERS (acrônimo do inglês para *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) (PRESTES *et al.*, 2011). Desde então diversos artigos de revisão têm sido publicados sobre o método QuEChERS trazendo diferentes abordagens como, a utilização do QuEChERS aliado as técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas (LEHOTAY, 2011), o uso do método QuEChERS para determinação de resíduos de agrotóxicos e outros contaminantes em amostras ambientais (BRUZZONITI *et al.*, 2014) e os avanços recentes do método (REJCZAK & TUZIMSKI, 2015), entre outros. Devido a sua praticidade e aos excelentes resultados obtidos para extração multirresíduo em diferentes matrizes, o método tornou-se o mais utilizado para extração de agrotóxicos em alimentos.

O método baseia-se na utilização do solvente acetonitrila, para extração de um amplo escopo de agrotóxicos com diferentes polaridades. Após a extração o procedimento segue com uma etapa de partição onde, a adição de sais promove o efeito *salting out* diminuindo a solubilidade dos analitos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa. A utilização de cloreto de sódio (NaCl) foi proposto inicialmente associada a utilização de sais secantes que tem por finalidade 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 como por exemplo Na₂SO₄. Além disso, sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares (PRESTES *et al.*, 2011).

A terceira etapa do método, consiste na limpeza do extrato através do método de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid phase*

extraction) que foi proposto juntamente com o método QuEChERS. Na d-SPE, o extrato é colocado em contato com sorventes como por exemplo, amina primária secundária (PSA, do inglês *primary secondary amine*), octadecilsilano (C18), carvão grafitizado (GCB, do inglês *graphitized carbon black*) e o sal $MgSO_4$ para remoção da água residual. A utilização dos sorventes tem a função de reter os interferentes da matriz de maneira que, depois das etapas de agitação e centrifugação, o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico (PRESTES *et al.*, 2009).

2.7.2 Modificações do método QuEChERS

Apesar da versão original do método ter fornecido excelentes resultados para diferentes tipos de amostras, algumas aplicações mostraram que alguns compostos apresentavam problemas de estabilidade e/ou recuperação de acordo com o pH da matriz (PRESTES *et al.*, 2011). Notou-se então, que a utilização de tampões (pH 5,0) promoviam recuperações satisfatórias (>70%) para compostos dependentes do pH (ex.: pimetozina, imazalil e tiabendazol). Pensando em resolver esse problema, a adição de uma etapa de tamponamento foi a primeira modificação proposta para o método QuEChERS. Lehotay e colaboradores (2005) desenvolveram, o método “QuEChERS-acetato”, no qual o efeito tamponante (pH 4,8) é promovido pela adição do sal acetato de sódio e de ácido acético à acetonitrila. Mais tarde, Anastassiades e colaboradores (2007) propuseram a segunda modificação, o método “QuEChERS-citrato”, que utiliza uma mistura dos sais citrato de sódio e de citrato de sódio sesquidratado como responsáveis pelo efeito tamponante (pH 5,0 a 5,5).

Outra modificação bastante relevante foi o uso de outros sorventes na etapa de limpeza (*clean-up*) do extrato como por exemplo, C18 juntamente com PSA para promover uma limpeza mais efetiva de algumas matrizes, em especial aquelas que contêm gordura. Para a redução do teor de clorofila nos extratos provenientes de amostras com pigmentação verde, foi efetuado na etapa de limpeza, através da adição de uma pequena quantidade de GCB. Além disso, diferentes sorventes alternativos vem sendo avaliados como é o caso da quitina, quitosana e terra diatomácea (ARIAS *et al.*, 2014; CABRERA *et al.*, 2016).

O método QuEChERS, tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. Além disso, durante o seu desenvolvimento, grande ênfase foi dada para a obtenção de um procedimento dinâmico, que pudesse ser aplicado em

qualquer laboratório, sendo, portanto, ideal para a rotina. Com relação as limitações, observa-se que a relação entre a quantidade de amostra: solvente (1:1 m/v) obtida no método QuEChERS é baixa quando comparada com métodos comumente utilizados para análise de resíduos em alimentos, esta relação pode conduzir a valores de LOQ mais elevados. (PRESTES *et al.*, 2009).

2.7.3 Microextração Líquido – Líquido Dispersiva (DLLME)

A Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*) foi introduzida no ano de 2006 (REZAEI *et al.*, 2006). Assim como outras técnicas de extração, a DLLME tem sido bastante utilizada para determinação de agrotóxicos em diferentes tipos de amostras.

A técnica de extração DLLME está baseada na injeção rápida, na amostra, de uma mistura apropriada de dois solventes, um extrator e um dispersor, na amostra com o auxílio de uma seringa. Após a injeção, uma solução turva com microgotas é formada. As microgotas consistem no solvente extrator mais o analito já extraído. Devido a elevada área superficial entre o solvente extrator e a amostra aquosa, e equilíbrio é atingido rapidamente e a extração independe do tempo. Após uma etapa de centrifugação ocorre a sedimentação das microgotas, formando uma fase sedimentada, a qual é retirada com o auxílio de uma seringa e após, é efetuada a quantificação dos analitos pelo método cromatográfico (REZAEI *et al.*, 2006; REZAEI *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2012). O sucesso da extração por DLLME está baseado no equilíbrio de distribuição do analito entre as fases aquosa e orgânica, sendo assim, essa técnica é ideal para a extração de compostos com propriedades lipofílicas moderadas a altas ou que possam ter seu coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) alterado pelo controle do pH, no caso de analitos ionizáveis (MOREIRA *et al.*, 2013; LEONG *et al.*, 2014).

Por se tratar de uma técnica de equilíbrio, alguns fatores podem afetar a eficiência de extração por DLLME, como por exemplo, o tipo e volumes dos solventes extrator e dispersor escolhido, o pH da amostra bem como a força iônica do meio (adição de sal). A seleção do solvente extrator é o principal parâmetro no processo de extração. Na técnica DLLME convencional, solventes orgânicos são escolhidos baseados na sua maior densidade que a água, capacidade de extração dos analitos e um bom comportamento cromatográfico (REZAEI *et al.*, 2010). Hidrocarbonetos

halogenados como clorobenzeno, clorofórmio, tetracloreto de carbono e diclorometano são usualmente empregados como solventes extratores devido a sua alta densidade. O solvente dispersor é escolhido baseado na sua miscibilidade no solvente extrator e na fase aquosa. Acetona, metanol e acetonitrila são usualmente empregados como solvente dispersor (REZAE *et al.*, 2006; REZAE *et al.*, 2010, AHMAD *et al.*, 2015).

O tempo de extração na DLLME é definido como o intervalo entre a injeção da mistura dos solventes dispersor e extrator, e a etapa de centrifugação. A área superficial entre o solvente extrator e a fase aquosa é infinitamente grande, por isso, a transferência dos analitos para a fase orgânica é rápida. Subsequentemente, o estágio de equilíbrio é atingido rapidamente (REZAE *et al.*, 2010). Na DLLME, o fator de pré-concentração (FC) é definido como a razão entre a concentração do analito na fase sedimentada (C_{sed}) e a concentração inicial (C_0) do analito na amostra (fase aquosa) (equação 1).

$$FC = \frac{C_{sed}}{C_0} \quad (1)$$

A recuperação (R) é definida como (equação 2):

$$R \frac{n_{sed}}{n_0} \times 100 \quad \text{ou} \quad R = \frac{C_{sed} \times V_{sed}}{C_0 \times V_{aq}} \times 100 \quad (2)$$

Em que, V_{sed} e V_{aq} são os volumes de fase sedimentada e amostra, respectivamente (REZAE *et al.*, 2010).

Desde o seu surgimento, a DLLME vem sendo utilizada, preferencialmente, para análise de agrotóxicos (AHMAD *et al.*, 2015). Além disso, a técnica analítica mais favorável para utilização com a DLLME é a GC uma vez que, apresenta maior compatibilidade com os solventes utilizados para extração (SOUSA *et al.*, 2013). Entretanto, nos últimos anos diversos trabalhos têm utilizado a DLLME juntamente com a HPLC, popularizando seu uso para determinação de agrotóxicos por DLLME (BOONCHIANGMA *et al.*, 2012). No entanto, em contraste com a GC, na maioria dos casos, o solvente de extração contendo os analitos precisa ser reconstituído num solvente compatível com as colunas de HPLC

A DLLME apresenta como vantagens ser uma técnica simples e rápida que utiliza baixos volumes de solvente (μL). Além disso, a alta área superficial entre o solvente extrator e a amostra aquosa, e o alto fator de enriquecimento geralmente obtido impacta em baixos valores de limites de detecção (KOCÚROVÁ *et al.*, 2012). As desvantagens da DLLME estão relacionadas em sua maioria com os pré-requisitos do solvente extrator e do dispersor. O solvente extrator deve ter habilidade em extrair os analitos, baixa solubilidade em água e ser compatível com a instrumentação analítica a ser utilizada. Além disso, deve formar uma solução turva quando na presença do solvente dispersor. (KOCÚROVÁ *et al.*, 2012).

Diversos trabalho de revisão tem sido publicado sobre a técnica, envolvendo aspectos gerais (REZAEI *et al.*, 2010; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK & GRZEŚKOWIAK, 2011; MARTINS *et al.*, 2012; LEONG *et al.*, 2014), aplicação de ultrassom e vortex (ANDRUCH *et al.*, 2013) e avanços recentes como o uso de solventes menos densos que a água (KOCÚROVÁ *et al.*, 2012; AHMAD *et al.*, 2015, VIÑAS *et al.*, 2015), entre outros.

2.7.4 Modificações da DLLME

Desde 2006, diversos artigos vêm sendo publicados (AHMAD *et al.*, 2015). Neste período, diferentes avanços foram propostos para a técnica com o objetivo de superar possíveis desvantagens do processo, levando assim, a diferentes modificações na DLLME. Assim, diferentes acrônimos, foram atribuídos pelos pesquisadores, para cada modificação realizada. De acordo com AHMAD e colaboradores (2015) é possível classificar as técnicas existentes atualmente em 4 tipos, sendo eles:

a) Extração em modo misto: Nesta modificação ocorre a combinação de dois métodos de extração, normalmente com o objetivo de aumentar o fator de pré-concentração do método (FARAJZADEH *et al.*, 2017). Exemplos: SPE-DLLME (do inglês, *solid phase extraction combined with dispersive liquid-liquid extraction*) e SBSE-DLLME (do inglês *stir bar sortive extraction combined with dispersive liquid-liquid extraction*) entre outros;

b) Extração com base na dispersão assistida: Surgiu com o objetivo de facilitar a dispersão dos solventes na amostra (JI *et al.*, 2014; CUI *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013a). Exemplos: USAEME (do inglês *ultrasound-assisted emulsification microextraction*), USVA-DLLME (do inglês *ultrasound vortex assisted dispersive liquid-*

liquid microextraction) e VA-DLLME (do inglês *vortex assisted dispersive liquid-liquid microextraction*) entre outros;

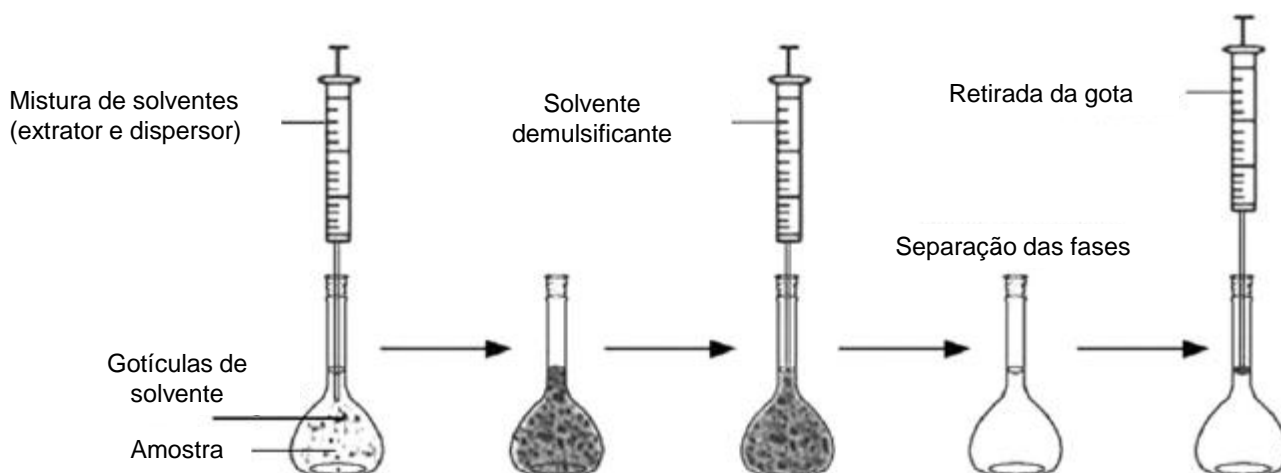
c) Extração baseada no uso de líquidos iônicos: Parrilla Vázquez e colaboradores (2014) realizaram a utilização de líquidos iônicos como solventes de extração buscando a utilização de solventes alternativos de menor toxicidade. A técnica foi denominada micoextração líquido-líquido dispersiva com a utilização de líquido iônico (IL-DLLME, do inglês *liquid ionic dispersive liquid-liquid microextraction*)

d) Extração baseada na densidade do solvente: O uso de solventes de menor densidade que a água foi sem dúvida, uma das modificações mais expressivas da DLLME e diversas variantes da técnica surgiram a partir dessa modificação (WU *et al.*, 2010). Uma das mais reconhecidas é a DLLME com solidificação da gota orgânica flutuante (DLLME-SFO, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of a floating organic drop*) onde, um solvente de baixa densidade, baixa toxicidade e ponto de fusão próximo à temperatura ambiente, são utilizados. Após a DLLME, o solvente extrator que fica localizado na região superior do tubo é resfriado pela colocação deste em um banho de gelo. O solvente solidificado é transferido para um frasco adequado e é imediatamente retornado ao estado líquido à temperatura ambiente, podendo ser diluído ou diretamente injetado em um sistema cromatográfico. A solidificação serve para auxiliar no processo de retirada da gota da solução, uma vez que, dificuldades podem surgir nessa etapa. Altos fatores de enriquecimento foram alcançados variando de 215 a 557 sendo que, os LODs ficaram no intervalo entre 0,1 e 0,3 ng mL⁻¹. (DLLME-SFO, SD-DLLME entre outros).

A técnica de microextração líquido-Líquido dispersiva com demulsificação por solvente (SD-DLLME, do inglês *solvent-based demulsification dispersive liquid-liquid microextraction*) foi proposta por Zacharis e colaboradores em 2010. No lugar da etapa de centrifugação, a demulsificação atua na separação das fases orgânica e aquosa. Isso ocorre, através da adição de um volume de solvente orgânico, após a etapa de extração. Assim, há uma alteração da aderência interfacial entre a fase aquosa e orgânica, quebrando a emulsão e facilitando o recolhimento da gota. Em comparação com a DLLME-SFO, este método melhora a separação entre as fases e tem sido aplicado com sucesso para determinação de agrotóxicos (MOREIRA *et al.*, 2013). CHEN e colaboradores (2010) utilizaram essa modificação para extração de carbamatos em amostras de água com determinação por GC-MS. A extração foi realizada em um balão volumétrico. Após a dispersão, a etapa de centrifugação foi

substituída pela adição de um solvente que atuou na quebra da emulsão favorecendo a separação das fases (demulsificante). A fase orgânica na superfície do balão foi retirada com o auxílio de uma seringa. Na Figura 2 encontra-se uma representação do procedimento realizado por Chen e colaboradores (2010).

Figura 2 - Representação da extração por SD-DLLME (Adaptada de CHEN *et al.*, 2010)



Recentemente, Caldas e colaboradores (2016) utilizaram a SD-DLLME para a extração de 26 fármacos e produtos de cuidado pessoal (PPCPs, do inglês *pharmaceuticals and personal care products*) e 32 agrotóxicos em amostras de água. Neste trabalho os autores realizaram a extração das amostras utilizando 1-octanol e acetona como solventes extrator e dispersor, respectivamente. Após, 750 μL de água foram utilizados como solvente demulsificante o que promoveu uma melhor separação das fases e propiciou a retirada da gota com o auxílio de uma seringa.

Para análise de agrotóxicos em vinhos, diferentes procedimentos de extração empregando tanto o método QuEChERS como a DLLME e suas modificações vêm sendo utilizados, sendo que, alguns então citados na Tabela 2.

Tabela 2 - Diferentes aplicações empregando o método QuEChERS e DLLME para determinação de resíduos de agrotóxicos em vinho por técnicas cromatográficas.

continua

Amostra	Extração	Clean-up	Nº de analitos	Instrumentação	Limite (LOQ)	Referência
Laranja, vinho, uva, passas e farinha de trigo	QuEChERS citrato	d-SPE - (1 mL de extrato) 0,150 g MgSO ₄ e 0,025 g de PSA	42 agrotóxicos	LC-MS/MS e GC-MS/MS	n.a.	Payá <i>et al.</i> (2007)
Vinho	QuEChERS original	d-SPE - (1 mL de extrato) 0,150 g de MgSO ₄ , 0,05 g de PSA e 0,05 g de C18	27 agrotóxicos	LP-GC/MS	LOD: < 19,0 µg L ⁻¹	Cunha <i>et al.</i> (2009)
Vinho	QuEChERS modificado (5 mL ACN), (4 g MgSO ₄) e (3 g NaCl)	d-SPE - (1 mL de extrato, 0,150 g de MgSO ₄ e 0,05g de PSA)	77 agrotóxicos	GC-MS/SIM	LOQ: < 0,05 mg L ⁻¹	Jiang <i>et al.</i> (2009)
Vinho	QuEChERS modificado (20 mL de amostras, 20 mL de ACN) e (8 g MgSO ₄ , 3,5 g de NaCl)	d-SPE - (9 mL de extrato, 300 mg PSA, 150 GCB e 900 MgSO ₄)	72 agrotóxicos	UHPLC-MS/MS	LOQ: 3 - 10 µg L ⁻¹	Zhang <i>et al.</i> (2009)
Vinho	QuEChERS citrato	d-SPE - (5 mL de extrato, 0,75 g de MgSO ₄ e 0,125 g de PSA e 0,250 g de C18)	160 agrotóxicos	GC-MS/MS	LOQ: < 0,01 mg L ⁻¹	Walorczyk <i>et al.</i> (2011)
Vinho	(DLLME) 5mL de vinho + 5 mL de água, 0,05 mL de 1-undecanol (extrator) 0,5 mL de acetona (dispersor) freezer (-18°C) por 10 min	-	10 agrotóxicos	GC-MS/MS	LOQ: 2 - 25 ng/mL	Rodríguez-Cabo <i>et al.</i> (2011)
Vinho	QuEChERS acetato	-	90 agrotóxicos e micotoxinas	UHPLC-MS/MS	LOQ: < 10 µg L ⁻¹	Romero-González <i>et al.</i> (2011)

conclusão

Amostra	Extração	Clean-up	Nº de analitos	Instrumentação	Limite (LOQ)	Referência
Vinho	QuEChERS citrato	d-SPE - (6 mL de extrato) 0,9 g de MgSO ₄ e 0,150 g de PSA	Clorpirifós e Clorpirifós-oxon	GC-ECD	LOQ: CP:0,15 µg L ⁻¹ e CPO:1,62 µg L ⁻¹	Pelit <i>et al.</i> (2012)
Vinho e amostras ambientais	(VADLLME) 10 mL de vinho + 40 µL toluene como solvente extrator, vortex (3 min)	-	12 agrotóxicos organifosforados	GC-MS/SIM	LOD: 2 - 11 ng L ⁻¹	Zacharis <i>et al.</i> (2012)
Vinho	QuEChERS modificado (4 g MgSO ₄) e (2 g NaCl)	Filtração utilizando mini cartuchos contendo PSA acoplados a uma seringa.	8 agrotóxicos	LC-MS/MS	LOQ: < 1,33 µg L ⁻¹	Wang <i>et al.</i> (2013b)
Vinho	(USVADLLME) 10 mL de amostra, 1mL of NaH ₂ PO ₄ (1M), 0,250 mL de C ₂ H ₄ Cl ₂ como solvente extrator, ultrassom (10 min)	-	7 agrotóxicos	GC-NPD	LOQ: 0,024 - 0,225 ng/mL	Cinelli <i>et al.</i> (2014)
Vinho	(VA-IL-DLLME) 2,5 mL de vinho + 2,5 mL de solução tampão acetato (pH 2) e NaCl 10%, 80 mg [C6MIM][PF6] (solvente extrator) and 700µL de metanol (solvente dispersor)	-	4 agrotóxicos	HPLC-DAD	LOQ: 10,8 - 22 µg kg ⁻¹	Gure <i>et al.</i> (2015)
Vinho	(DLLME) 5 mL de vinho 60 µL de clorofórmio (solvente extrator) 940 µL de MeCN (solvente dispersor)	-	27 agrotóxicos	GC-MS	LOD: 0.025 -0.88 µg/L LOQ: 0.082 - 2.94 µg/L	Chen <i>et al.</i> (2016)

2.8 VALIDAÇÃO

No desenvolvimento de um novo método analítico faz-se necessário a garantia de que as informações geradas através desse método sejam confiáveis e interpretáveis. Para tal, o método pode ser submetido a um processo de avaliação denominado validação. Existem diferentes definições para o termo validação e vários artigos e revisões têm sido publicadas a respeito de validação de métodos analíticos (RAMBLA ALEGRE *et al.*, 2012). RIBANI e colaboradores (2004) citam dois tipos diferentes de validação, o primeiro, chamado de validação no laboratório ("*in house validation*"), o qual consiste de etapas de validação em um mesmo laboratório e é mais aplicado para as etapas preliminares do desenvolvimento de uma nova metodologia e na publicação de artigos científicos. O segundo tipo de validação é denominado validação completa, o qual envolve um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios. Somente aplicando uma validação completa a metodologia pode ser aceita como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação.

No Brasil, há duas agências credenciadoras para a verificação da competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Os órgãos internacionais também dispõem de guias como a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002) e SANTE (2015). Independente dos parâmetros de validação a serem seguidos, é essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados. Um método para um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de traços. A frequência com que o método será utilizado (muitas vezes em um dia, uma vez em um dia para um estudo rápido, uma vez em um mês etc) também influencia o tipo de estudo de validação que é necessário.

Os parâmetros analíticos normalmente envolvidos nos processos de validação de métodos de separação são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez.

2.8.1 Seletividade

Seletividade de um método analítico é a capacidade de avaliar um analito de maneira inequívoca mesmo estando este na presença de outras substâncias que possam atuar como interferentes (RIBANI *et al.*, 2004). Uma das maneiras mais comuns de avaliar a seletividade é através da comparação da matriz isenta do analito de interesse com a matriz adicionada deste mesmo analito (padrão). Uma outra maneira de avaliar a seletividade inclui a utilização de detectores modernos como o espectrômetro de massas, nesse caso o espectro gerado pelo composto é utilizado para a identificação.

2.8.2 Curva analítica e linearidade

É a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (RIBANI *et al.*, 2004). Uma maneira de avaliar essa proporcionalidade é através da correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração do analito utilizando uma relação matemática conhecida como regressão linear. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação da reta chama de curva analítica. A equação da reta pode ser do tipo $y = ax + b$, onde: (y = resposta medida (área do pico); x = concentração, a = coeficiente angular - inclinação da curva analítica = sensibilidade e b = coeficiente linear - interseção com o eixo y , quando $x = 0$). É aceito pela ANVISA um coeficiente de correlação de 0,99 (ANVISA, 2003). Em qualquer técnica instrumental, a relação linear simples, descrita acima, só é válida em um determinado intervalo de massa ou concentração da espécie medida. Este intervalo de massas ou concentrações, no qual se pode construir uma curva analítica linear, é a faixa linear dinâmica (INMETRO, 2011).

2.8.3 Efeito matriz

De maneira geral, na cromatografia efeito matriz pode ser definido como o 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. Esse efeito pode ocorrer tanto na cromatografia líquida quando na gasosa de maneiras distintas (SOUSA *et al.*, 2013b, KWON *et al.*, 2012). Na cromatografia líquida, dois efeitos ocorrem de maneira

mais pronunciada ambos associados a eficiência da ionização por eletronebulização. O primeiro está relacionado a uma alteração nas propriedades das gotas formadas no spray devido a presença da matriz. O segundo efeito, diz respeito a perda na eficiência de ionização do analito uma vez que, compostos presentes na matriz estariam competindo pela ionização (KRUVE *et al.*, 2008). O efeito matriz na cromatografia a gás pode ocorrer em diferentes partes do sistema cromatográfico como por exemplo, no injetor, coluna ou detector. No injetor a presença da matriz pode alterar a interação entre o analito e os sítios ativos do *liner*. Além disso, compostos como pigmentos, lipídios e outros compostos de alto peso molecular causam alteração na interação do analito com o restante do sistema cromatográfico. O efeito matriz, tanto na cromatografia líquida quanto na gasosa, pode causar supressão ou aumento do sinal analítico. Um efeito muito comum na cromatografia a gás ocorre quando a matriz interage com os sítios ativos do sistema preferencialmente ao analito. Desta forma, a matriz atua como protetora do analito gerando um aumento no sinal cromatográfico do mesmo (RAHMAN *et al.*, 2013). O efeito de matriz é dependente das propriedades físico-química dos analitos e das características dos componentes da matriz e pode ser estimada por meio de cálculos. Não existem maneiras de eliminar o efeito de matriz, entretanto, a literatura reporta diversas estratégias para compensá-lo na quantificação dos analitos. Uma das estratégias mais adotadas é a construção da curva analítica de calibração no próprio extrato da matriz (ZROSTLÍKOVÁ *et al.*, 2002).

2.8.4 Limites de detecção e quantificação

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 diversas formas de se calcular o LOD e o 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).

2.8.5 Precisão

Segundo LANÇAS (2004), a precisão expressa o grau de dispersão entre uma série de medidas obtidas a partir de ensaios múltiplos para uma mesma amostra, podendo ser estabelecida através da repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermediária, ou seja, nas mesmas condições operacionais e mudando um ou mais fatores, respectivamente. 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 fornecera os mesmos resultados. 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 (SANTE, 2015).

2.8.6 Exatidão

A exatidão de método representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio é um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI *et al.*, 2004). Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão. Normalmente, na indisponibilidade de materiais de referência certificados, a exatidão pode ser avaliada através dos ensaios de fortificação e 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 $\pm 15\%$ (SANTE, 2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

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

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados abaixo:

- Sistema de purificação de água, Milli-Q Direct UV3R (Millipore, Molsheim, FR);
- Lavadora ultrassônica, linha Soniclean (Sanders do Brasil, MG, Brasil);
- Centrifuga refrigerada NT 825 (Nova técnica, Brasil);
- Centrifuga (Centribio, Brasil);
- Agitador Vortex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- Balança analítica de precisão AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- Balança analítica de precisão UX-420H (Shimadzu, Japão);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- pHmetro Cole-Parmer 500 series (Cole-Parmer, EUA)

Para as análises cromatográficas foi utilizado o sistema UHPLC-MS/MS, modelo Xevo TQ (Waters, EUA) contendo um analisador TQ MS e amostrador automático sample manager (Acquity). O sistema de aquisição de dados utilizado foi o MassLynx V 4.1. Os cromatogramas full scan foram obtidos no sistema GC-MS/MS triplo quadrupolo, modelo Varian 1200 (Varian, EUA).

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, EUA);
- Ácido acético glacial 100% (J. T. Baker, EUA);
- Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3R
- Metanol, grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- Formiato de amônio (Sigma Aldrich, EUA);
- Tubos de polipropileno, com tampas de rosca com capacidade de 50 e 15 mL

(Sarstedt, Alemanha);

- Sulfato de magnésio anidro p.a. (J.T. Baker, Japão);
- Cloreto de sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- Acetato de sódio anidro (J.T. Baker, EUA)
- Citrato de sódio diidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- Hidrogenocitrato de sódio sesquidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- Sorvente Bondesil C18 com d. p. de 40 µm (Agilent, EUA);
- Sorvente Bondesil PSA com d. p. de 40 µm (Agilent, EUA);
- Quitosana (Sigma Aldrich, EUA);
- Strata X (Phenomenex, USA);
- Florisil (Sigma Aldrich, USA);
- Carbono grafitizado (GCB) (Sigma Aldrich, USA);
- Acetona grau HPLC (Mallinckrodt, 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);
- 1-Octanol (99%) (Sigma-Aldrich, EUA);
- 1-Heptanol (99%) (Sigma-Aldrich, EUA);
- 1-Decanol (99%) (Sigma-Aldrich, EUA);
- Balão volumétrico de 10 mL de capacidade e demais vidraria comum de

laboratório.

➤ Sistema gerador de nitrogênio, modelo NM30L-MS (Peak Scientific, Escócia) e gás argônio 6.0 usado como gás de colisão no sistema UHPLC-MS/MS (White Martins, Brasil).

3.3 AMOSTRAS DE VINHO

A amostra de vinho utilizada como “branco” analítico deste trabalho foi adquirida em um mercado local, sendo essa amostra um vinho com certificação de produto orgânico. A amostra foi analisada e não foram encontrados resíduos dos agrotóxicos em estudo nesse trabalho. As demais amostras, utilizadas na etapa de aplicação do trabalho, foram adquiridas de diferentes mercados e de vinicultores.

3.4 COMPOSTOS SELECIONADOS E PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Os compostos selecionados para este estudo foram escolhidos tendo como base os compostos que são monitorados pela ANVISA para uva. Além disso, foi realizado um estudo dos compostos que são reportados com maior frequência na literatura a fim de complementar o método. Os padrões sólidos dos compostos utilizados foram adquiridos da empresa Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha) e estão listados na Tabela 3, juntamente com algumas propriedades físico-químicas, classe e grupo químico. Todos os padrões utilizados possuem pureza superior a 96%.

Tabela 3 - Relação dos compostos em estudo, com informações de pKa, Log Kow, classe e grupo químico.

continua

Compostos	pKa ^a	log Kow ^b	Classe (s)	Grupo Químico
Ametrina	-	2,6	Triazina	Herbicida
Atrazina	1,6	2,6	Triazina	Herbicida
Azinfós etílico	-	3,4	Organofosforado	Inseticida
Azinfós metílico	5,0	2,5	Organofosforado	Inseticida
Azoxisrobina	0,9	2,5	Estrobilurina	Fungicida
Bentazona	-	2,8	Benzotiadiazinona	Herbicida
Bispiribaque sódico	-	1,3	Ácido pirimidiniloxibenzóico	Herbicida e Regulador de crescimento
Bitertanol	-	-	Triazol	Fungicida
Boscalida	-	4,0	Anilida	Fungicida
Bromuconazol	-	3,2	Triazol	Fungicida
Buprofezina	-	4,3	Tiadiazinona	Inseticida e acaricida
Carbaril	10,4	2,4	Metilcarbamato de naftila	Fungicida
Carbendazim	4,2	1,6	Benzimidazol	Fungicida
Carbofurano	-	2,3	Metilcarbamato de benzofuranila	Inseticida, acaricida e nematocida
Carbofurano-3-hidroxi	3,6	0,8	Carbamato (precursor de)	Inseticida
Carbosulfano	-	5,4	Metilcarbamato de benzofuranila	Inseticida, acaricida e nematocida
Carboxina	0,5	2,1	Carboxanilida	Fungicida
Cianazina	12,9	2,2	Triazina	Herbicida
Cimoxanil	9,3	4,2	Acetamida	Fungicida
Ciproconazol	-	2,9	Triazol	Fungicida
Clomazone	-	2,5	Isoxazolidinona	Herbicida
Clorimuron etílico	4,2	-	Sulfoniluréia	Herbicida
Clorpirifós etílico	4,6	5,0	Organofosforado	Acaricida
Clorpirifós metílico	-	4,3	Organofosforado	Inseticida, formicida e acaricida
Clorprofam	14,5	3,5	Carbamato	Herbicida
Clotianidina	11,1	0,6	Neonicotinóide	Inseticida
Cresoxim metílico	-	3,4	Estrobilurina	Fungicida

continuação

Compostos	pKa ^a	log Kow ^b	Classe (s)	Grupo Químico
Deltametrina	-	4,6	Piretróide	Inseticida e formicida
Diazinona	2,6	3,8	Organofosforado	Inseticida
Diclofuanida	-	3,7	Sulfamida, clorada, fluorada	Fungicida
Difenoconazol	1,1	4,3	Triazol	Fungicida
Dimetoato	2,0	0,3	Organofosforado	Inseticida e acaricida
Dimetomorfe	-	2,6	Morfolina	Fungicida
Diuron	7,8	-	Uréia	Herbicida
Epoxiconazol	-	-	Triazol	Fungicida
Etefom	-	-	Etileno (precursor de)	Regulador de crescimento
Famoxadona	-	4,9	Oxazolidinadiona	Fungicida
Fenarimol	-	3,6	Pirimidinilcarbinol	Fungicida
Fenpropratrina	-	5,6	Piretróide	Inseticida e acaricida
Fenpropimorfe	-	-	Morfolina	Fungicida
Fentiona	-	4,1	Organofosforado	Inseticida, formicida, acaricida e cupinicida
Fipronil	-	-	Pirazol	Inseticida, formicida e cupinicida
Fluquiconazol	-	-	Triazol	Fungicida
Fluroxipir	2,9	-	Ácido piridiniloxialcanóico	Herbicida
Flutolanil	-	3,7	Carboxamida	Fungicida
Imazalil	6,5	-	Imidazol	Fungicida
Imidacloprido	11,1	0,8	Neonicotinóide	Inseticida
Indoxacarbe	-	-	Oxadiazina	Inseticida, cupinicida e formicida
Iprodiona	12,7	3,0	Dicarboximida	Fungicida
Iprovalicarbe	-	3,2	Carbamato	Fungicida
Linuron	12,1	3,2	Uréia	Herbicida
Malationa	-	2,7	Organofosforado	Inseticida e acaricida
Mecarbam	-	-	Organofosforado	Inseticida
Mefosfolam	-	1,1	Fosforamidato	Inseticida
Mepronil	-	3,7	Carboxamida	Fungicida
Metalaxil	-	1,7	Acilalaninato	Fungicida
Metamidofós	-	3,9	Organofosforado	Inseticida
Metconazol	11,4	-	Triazol	Fungicida
Metiocarbe sulfona	-	-	Metilcarbamato de fenila	Inseticida
Metiocarbe sulfóxido	-	-	Metilcarbamato de fenila	Inseticida
Metsulfurom metílico	3,3	-	Sulfoniluréia	Herbicida
Mevinfós	-	0,1	Organofosforado	Inseticida e acaricida
Miclobutanil	-	2,9	Triazol	Fungicida
Monocrotofós	-	-0,2	Organofosforado	Inseticida
Monolinuron	-	2,2	Uréia	Herbicida
Oxamil	12,4	-0,4	Carbamato	Inseticida e nematocida
Paraoxona etílica	7,1	4,5	Organofosforado	Inseticida
Pendimetalina	-	5,2	Dinitroanilina	Herbicida
Piraclostrobina	-	4,0	Estrobilurina	Fungicida
Pirazofós	-	3,8	Fosforotioato de heterociclo	Fungicida e inseticida

Compostos	pKa ^a	log Kow ^b	Classe (s)	Grupo Químico
Piridaben	-	6,4	Piridazinona	Acaricida e inseticida
Piridafentiona	-	3,2	Organofosforado	Inseticida e acaricida
Piridato	-	4,0	Fenilpiradazina	Herbicida
Pirimetanil	3,5	2,8	Anilino pirimidina	Fungicida
Pirimicarbe	4,4	1,7	Dimetilcarbamato	Inseticida
Pirimifós metílico	4,3	4,2	Organofosforado	Inseticida e acaricida
Piriproxifeno	-	5,4	Éter piridiloxipropílico	Inseticida
Procimidona	-	3,1	Dicarboximida	Fungicida
Procloraz	3,8	4,1	Imidazolilcarboxamida	Fungicida
Profenofós	-	4,4	Organofosforado	Inseticida e acaricida
Profoxidina	5,9	3,9	Oximaciclohexanodiona	Herbicida
Propargito	-	-	Sulfito de alquila	Acaricida
Propiconazol	1,1	3,7	Triazol	Fungicida
Propizamida	-	3,1	Amida	Herbicida
Propoxur	-	1,6	Metilcarbamato de fenila	Inseticida
Quincloraque	4,3	-	Ácido quinolinocarboxílico	Herbicida
Quinoxifeno	-	4,7	Quinolina	Fungicida
Simazina	1,6	2,1	Triazina	Herbicida
Tebuconazol	-	3,7	Triazol	Fungicida
Terbufós	-	2,8	Organofosforado	Inseticida e nematocida
Terbutilazina	-	3,2	Triazina	Herbicida
Tetraconazol	-	3,6	Triazol	Fungicida
Tiacloprido	-	-	Neonicotinóide	Inseticida
Tiametoxam	-	-0,1	Neonicotinóide	Inseticida
Tiodicarbe	-	1,6	Tiocarbamato	Herbicida
Tiofanato metílico	7,4	1,5	Organofosforado	Fungicida, Inseticida, acaricida
Tolcofós metílico	-	4,6	Organofosforado	Fungicida
Triadimefon	-	3,7	Azol	Fungicida
Triadimenol	-	3,1	Azol	Fungicida
Triazofós	-	3,3	Benzimidazol (precursor de)	Fungicida, Inseticida, acaricida
Triclorfom	-	0,4	Organofosforado	Inseticida
Trifloxistrobina	-	4,5	Estrobilurina	Fungicida
Triflumizol	-	5,1	Imidazol	Fungicida
Vamidotiona	-	-	Organofosforado	Inseticida

^apKa – logaritmo negativo da constante de acidez do composto (Ka) / ^blog Kow – coeficiente de partição octanol/água

A partir de cada padrão sólido, preparou-se 10 mL da solução estoque individual de cada composto, na concentração de 1000 mg L⁻¹. Para efeito de cálculo levou-se em consideração a pureza de cada padrão sólido e calculou-se a massa a ser pesada e posteriormente diluída no solvente acetonitrila. A partir destas soluções, preparou-se uma mistura contendo todos os compostos na concentração 5 mg L⁻¹ que foi utilizada para realizar a fortificação das amostras “branco” e também para a construção das curvas

analíticas no extrato da matriz e no solvente. Para injeção no sistema UHPLC-MS/MS as concentrações finais das soluções foram 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. A partir da mistura 5 mg L^{-1} preparou-se também, uma solução na concentração de 0,1 mg L^{-1} utilizada na fortificação da amostra branco na etapa de extração por SD-DLLME e na construção da curva analítica (2,0; 4,0; 10,0; 20,0; 40,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). As soluções estoque foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura $\leq 5\text{ }^\circ\text{C}$.

3.4.1 Utilização do Padrão interno (PI) e Padrão de controle (PC)

O padrão interno (PI) e o padrão de controle (PC), também chamado de padrão de substituição, podem ser adicionados em diferentes estágios do procedimento analítico. Esses padrões têm como objetivo assegurar a execução correta do procedimento de extração e de determinação para cada amostra avaliada no sistema cromatográfico, auxiliando assim, a localização de fontes de erros (SANTE, 2015). Como PI utilizou-se o composto trifenilfosfato (TPP), apenas para a avaliação do instrumento, aceitando-se valores de variação de área de 20%. A atrazina-d5 foi utilizada como PC para avaliação do procedimento de extração de todas as amostras, nas mesmas concentrações empregadas para avaliação dos ensaios de recuperação. O PI foi adicionado a amostra na concentração de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (40 μL de uma solução 5 mg L^{-1}) para o método QuEChERS e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (50 μL de uma solução 0,1 mg L^{-1}) para a SD-DLLME.

3.5 CONDIÇÕES DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM VINHO

Baseado em trabalhos previamente publicados (BOLAÑOS *et al.*, 2008; KEMMERICH *et al.*, 2015) a fase móvel utilizada neste trabalho 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 4. O tempo total de corrida foi de 10 min.

Tabela 4 - Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de agrotóxicos em vinho 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

Os parâmetros utilizados no sistema UHPLC-MS/MS foram previamente otimizados no LARP-UFSM, através de planejamento experimental (KEMMERICH *et al.*, 2015). Abaixo, na Tabela 5 estão descritas as condições utilizadas para determinação dos resíduos de agrotóxicos em amostras de vinho.

Para obtenção das condições ótimas de análise de cada um dos compostos em estudo, foram realizadas injeções diretas de soluções padrão 0,5 mg L⁻¹ de cada composto no modo combinado, ou seja, sem a coluna e na presença da fase móvel no espectrômetro de massas. Os íons característicos de cada composto em estudo 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, constatou-se que o modo de ionização por eletronebulização positiva apresentou melhor resultado para a maioria dos compostos, com exceção do fipronil (eletronebulização negativa). Além disso, voltagem do capilar, energias de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar os íons produtos também foram estudadas. Após, foram avaliadas as transições, no modo SRM a serem utilizadas para a etapa de quantificação (transição de maior intensidade) e identificação (transição de segunda maior intensidade) dos compostos estudados.

Tabela 5 - Parâmetros utilizados no sistema UHPLC-MS/MS para análise de resíduos de agrotóxicos em vinho

Parâmetros	UHPLC-MS/MS
Coluna analítica	ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 µm, 2,1 x 50 mm
Temperatura da coluna	40 °C
Voltagem do capilar	2 kV
Temperatura de solvatação	500 °C
Vazão do gás de solvatação (N ₂)	600 L h ⁻¹
Vazão do spray	80 L h ⁻¹
Vazão do gás de colisão	0,15 mL min ⁻¹
Temperatura da fonte	150 °C
Volume de injeção	10 µL
Tempo de residência (<i>dwel time</i>)	0,01 s

3.6 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM VINHO

3.6.1 Etapa de extração/partição

O método QuEChERS foi escolhido neste trabalho para a extração de resíduos de agrotóxicos em vinho tendo como base trabalhos anteriormente publicados (ZHANG *et al.*, 2009; WALORCZYK *et al.*, 2011; ROMERO-GONZÁLEZ *et al.*, 2011). Para a escolha do método de extração/partição os procedimentos relativos aos métodos QuEChERS original (Anastassiades *et al.*, 2003), QuEChERS acetato (Lehotay *et al.*, 2005) e QuEChERS citrato (Anastassiades *et al.*, 2007) foram avaliados. Além destes, testou-se um procedimento relativo a uma modificação do método QuEChERS acetato baseado em Rizzeti e colaboradores (2016). Nesta etapa, todos os ensaios foram realizados em tubos de polipropileno de 50 mL onde acondicionou-se a amostra, seguida do solvente de extração e dos sais de partição conforme descrito na Tabela 6. A etapa de limpeza dos extratos foi realizada em tubos tipo eppendorf onde 1 mL do extrato proveniente da extração foi utilizado juntamente com 125 mg de PSA. Os testes foram avaliados levando em consideração o número de compostos que obtiveram recuperação entre 70 e 120% e RSD ≤ 20% no nível de fortificação de 50 µg L⁻¹ quando realizados em triplicata (SANTE, 2015).

3.6.2 Etapa de limpeza (*clean-up*) dos extratos

Posteriormente aos testes para definir o procedimento de extração foram avaliados alguns sorventes comumente utilizados na etapa de limpeza do método QuEChERS por d-SPE. Os sorventes utilizados e as combinações entre eles estão demonstrados na Tabela 6. Oito testes foram realizados utilizando seis diferentes sorventes. Nesta etapa, a quantidade de $MgSO_4$ foi mantida constante em todos os testes uma vez que não interfere na remoção dos co-extrativos da matriz. A etapa de limpeza foi realizada como descrito no item anterior, em tubos tipo eppendorf utilizando 1 mL de extrato. Tendo em vista a existência de pigmentos no vinho que atuam como co-extrativos para esse tipo de determinação, os sorventes foram avaliados quanto a eficiência de remoção desses co-extrativos da matriz mediante uma análise gravimétrica como descrita por May *et al.*, (2017). Além disso, a eficiência de extração dos métodos foi avaliada mediante a injeção, em triplicata, dos extratos previamente fortificados no nível de $50 \mu g L^{-1}$ no sistema UHPLC-MS/MS.

Tabela 6 - Relação dos testes de extração e limpeza realizados para análise dos compostos selecionados em amostras de vinho

continua

Teste	Etapa de Extração/partição	Etapa de limpeza (<i>clean-up</i>)
T1	10 g de amostra + 10 mL acetonitrila agitação em vortex por 1 min + 4 g $MgSO_4$ + 1 g NaCl agitação manual por 1 min centrifugação 3400 rpm/8 min.	1 mL do extrato + 150 mg $MgSO_4$ + 125 mg PSA + agitação em vortex por 1 min centrifugação 3400 rpm/4 min.
T2	10 g de amostra + 10 mL acetonitrila agitação em vortex por 1 min + 4 g $MgSO_4$ + 1 g NaCl + 1 g $C_6H_5 Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$ + 0,5 g $C_6H_5 Na_3O_7$, 1,5 H_2O agitação manual por 1 min centrifugação 3400 rpm/8 min.	
T3	15 g de amostra + 15 mL acetonitrila acidificada com 1% de CH_3COOH (v/v) agitação em vortex por 1 min + 6 g $MgSO_4$ + 1,5 g CH_3COONa agitação manual por 1 min centrifugação 3400 rpm/8 min.	
T4	10 g de amostra + 10 mL acetonitrila acidificada com 1% de CH_3COOH (v/v) agitação em vortex por 1 min + 4 g $MgSO_4$ + 1,7 g CH_3COONa agitação manual por 1 min centrifugação 3400 rpm/8 min.	

conclusão

Teste	Etapa de Extração/partição	Etapa de limpeza (<i>clean-up</i>)
T5	10 g de amostra + 10 mL acetonitrila acidificada com 1% de CH ₃ COOH (v/v) agitação em vortex por 1 min + 4 g MgSO ₄ + 1,7 g CH ₃ COONa agitação manual por 1 min centrifugação 3400 rpm/8 min.	1 mL do extrato + 150 mg MgSO ₄ + 125 mg de florisil, agitação em vortex por 1 min centrifugação 3400 rpm/4 min.
T6		1 mL do extrato + 150 mg MgSO ₄ + 125 mg de quitosana, agitação em vortex por 1 min centrifugação 3400 rpm/4 min.
T7		1 mL do extrato + 150 mg MgSO ₄ + 125 mg de Strata X, agitação em vortex por 1 min centrifugação 3400 rpm/4 min.
T8		1 mL do extrato + 150 mg MgSO ₄ + 125 mg de PSA e 250 mg de C ₁₈ , agitação em vortex por 1 min centrifugação 3400 rpm/4 min.
T9		1 mL do extrato + 150 mg MgSO ₄ + 125 mg de PSA e 250 mg de florisil, agitação em vortex por 1 min centrifugação 3400 rpm/4 min.
T10		1 mL do extrato + 150 mg MgSO ₄ + 125 mg de PSA, agitação em vortex por 1 min centrifugação 3400 rpm/4 min.
T11		1 mL do extrato + 150 mg MgSO ₄ + 125 mg de PSA e 50 mg de GCB, agitação em vortex por 1 min centrifugação 3400 rpm/4 min.
T12		1 mL do extrato + 150 mg MgSO ₄ + 125 mg de PSA e 250 mg de C ₁₈ e 50 mg de GCB, agitação em vortex por 1 min centrifugação 3400 rpm/4 min.

3.6.3 Miniaturização do método QuEChERS

Visando utilizar uma menor quantidade de amostra e de reagentes, o método QuEChERS avaliado que apresentou os melhores resultados foi miniaturizado (LOZANO *et al.*, 2016). Para tal, as quantidades utilizadas de amostra, solvente e sais de partição foram reduzidas proporcionalmente às utilizadas na etapa de extração. O procedimento de extração foi realizado em tubos de polipropileno (PP) de 15 mL e o sobrenadante obtido após a centrifugação seguiu para a etapa de limpeza que foi realizado em tubos tipo eppendorf. O procedimento seguiu como descrito na Tabela 6.

3.7 AVALIAÇÃO DA SD-DLLME PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM VINHO POR UHPLC-MS/MS

Os experimentos conduzidos neste trabalho para escolha das melhores condições de extração dos agrotóxicos selecionados por SD-DLLME foram realizados como demonstrado na Figura 3. A técnica de SD-DLLME adotada foi baseada em trabalhos

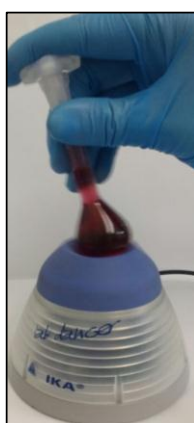
previamente publicados para extração de compostos orgânicos em água (CHEN *et al.*, 2010; CALDAS *et al.*, 2016). Porém, neste trabalho, para extração de agrotóxicos em vinhos, alguns parâmetros considerados significativos para a eficiência de extração dos compostos foram estudados. Entre os parâmetros avaliados estão: avaliação do modo de agitação, seleção do solvente extrator e dispersor, volume do solvente extrator e dispersor, efeito do pH e adição de sal (KOCÚROVÁ *et al.*, 2012; CALDAS *et al.*, 2016).

Todos os experimentos foram realizados utilizando 10 mL de amostra fortificada com a solução padrão contendo os compostos em estudo na concentração de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Os ensaios foram realizados em replicatas ($n= 6$) e a área dos compostos foi avaliada, como reportado por Rodríguez-Cabo *et al.*, (2011).

Figura 3 - Principais etapas do processo de extração por SD-DLLME



Adição do solvente extrator e dispersor



Agitação



Formação da gota (emulsão)



Adição do solvente demulsificante



Retirada da gota

3.7.1 Avaliação do modo de agitação

Levando em consideração algumas modificações realizadas na DLLME nos últimos anos (MOREIRA *et al.*, 2013; VIÑAS *et al.*, 2015), neste trabalho, alguns modos de agitação foram avaliados. Dentre eles, testou-se a agitação da mistura com o auxílio de um vortex por 1 minuto, a utilização de ultrassom por 10 minutos e de ultrassom com aplicação de temperatura, 10 minutos a 45 °C (DUARTE *et al.*, 2016). Nos testes empregando ultrassom a frequência de 40 Hz foi utilizada. Os testes foram realizados utilizando 1-octanol como solvente extrator na quantidade de 100 µL e acetonitrila como solvente dispersor na quantidade de 500 µL (CHU *et al.*, 2015, CHEN *et al.*, 2016). O mesmo volume e tipo de solvente dispersor foi utilizado como solvente demulsificante (500 µL de acetonitrila) com base nos trabalhos de Guo e colaboradores (2012) e Caldas e colaboradores (2016).

3.7.2 Seleção do solvente extrator e dispersor

Depois de encontrada a melhor configuração para a etapa de agitação, avaliou-se o tipo de solvente extrator a ser utilizado. Foram selecionados três solventes de extração, sendo eles 1-heptanol, 1-octanol e 1-decanol. Para a escolha do solvente de dispersão utilizou-se acetonitrila, metanol e acetona. A combinação entre os solventes foi avaliada de maneira univariada e os solventes foram escolhidos com base em outros trabalhos já publicados (RODRIGUEZ-CABO *et al.*, 2011; HOU *et al.*, 2014; CHU *et al.*, 2015, CHEN *et al.*, 2016). Na Tabela 7 são apresentadas a densidade, ponto de ebulição, coeficiente de partição octanol/água (Log Kow) e a solubilidade em água dos solventes extratores e dispersores avaliados.

Tabela 7 - Propriedades físico-químicas dos solventes de extração e dispersão utilizados

Solvente	Solubilidade em água (g/100 mL)	Densidade (g mL ⁻¹)	Ponto de ebulição (°C)	Log Kow
1-heptanol	0,82	0,818	175	2,6
1-octanol	0,60	0,824	196	2,8-3,15
1-decanol	0,37	0,829	233	4,57
acetonitrila	Solúvel	0,786	82	-0,34
metanol	Solúvel	0,790	64	-0,77
acetona	Solúvel	0,791	56	-0,24

3.7.3 Escolha do volume do solvente de extração e dispersão

Durante a escolha do volume de solvente extrator, foram avaliados os volumes de 70, 80, 100 e 120 μL de 1-octanol utilizando 500 μL de acetonitrila como solvente dispersor e demulsificante. Para a escolha do volume de solvente dispersor foram avaliados os volumes de 400, 500, 600 e 700 μL de acetonitrila. Nesta avaliação, foi utilizado 1-octanol como solvente extrator na quantidade de 100 μL .

3.7.4 Efeito do pH

O efeito do pH na extração foi avaliado na faixa de pH entre 2 e 6. O pH das amostras foi ajustado com ácido clorídrico 25% (v/v) quando necessária acidificação, ou com hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} quando necessário aumento no valor de pH (CALDAS *et al.*, 2016). Nesta avaliação utilizou-se 1-octanol como solvente extrator (100 μL) e acetonitrila como solvente dispersor (600 μL).

3.7.5 Adição de sal

Para avaliar a influência da adição de um sal na eficiência de extração, foram avaliados os seguintes sais: sulfato de magnésio, cloreto de sódio e sulfato de amônio (CALDAS *et al.*, 2016). Os sais foram adicionados em 10 mL de amostra na proporção de 10 % (m/v). Nesta avaliação, utilizou-se, 1-octanol como solvente extrator (100 μL) e acetonitrila como solvente dispersor (600 μL).

3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS E DA SD-DLLME PARA EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM VINHO

Tanto o método QuEChERS miniaturizado quando SD-DLLME avaliados neste trabalho foram validados de acordo com os parâmetros descritos na tabela 8.

Tabela 8 - Parâmetros avaliados na etapa de validação dos métodos descritos nesse trabalho

Parâmetro	Aplicação	Referência
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.	SANTE, 2015
Curva analítica e faixa linear	Avaliação da linearidade das curvas analíticas do tipo $y=ax+b$ obtidas pela correlação entre a resposta analítica e a concentração de cada composto injetado no equipamento.	SANTE, 2015
Efeito Matriz	<p>Comparação entre as curvas preparadas em solvente e no extrato "branco" da matriz através da fórmula:</p> $EM = \frac{x_1 - x_2}{x_2} \times 100$ <p>x_1 = média das áreas da solução analítica de cada composto, preparado no extrato da matriz x_2 = média das áreas da solução analítica de cada composto, preparado no solvente</p>	SANTE, 2015
Limite de quantificação e detecção	Calculou-se LOD e LOQ 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.	INMETRO, 2011
Exatidão	<p>A exatidão do método foi avaliada através dos ensaios de recuperação, fortificando as amostras “branco” em quatro níveis de concentração em replicatas (n=7). Para o método QuEChERS os níveis foram 10, 20, 50 e 100 e para VA-DDLME 0,5, 1, 2, 5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para o cálculo utilizou-se a fórmula: $\text{Rec}\% = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$</p> <p>C1= Concentração determinada na amostra fortificada; C2= Concentração determinada na amostra não fortificada; C3 = Concentração usada para fortificação</p>	SANTE, 2015
Precisão e Precisão intermediária	A precisão do método, em termos de repetitividade (RSDr) foi avaliada através da fórmula do desvio padrão relativo (RSD) para as 7 replicatas injetada uma única vez. A precisão intermediária (RSDpi) do método foi avaliada realizando o mesmo procedimento analítico em dias diferentes	SANTE, 2015

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM VINHO

De acordo com as condições descritas nos itens 3.5 e 3.5.1 foram monitorados 104 agrotóxicos por UHPLC/MS-MS. A Tabela 9 apresenta o tempo de retenção (t_R) bem como, as transições utilizadas nas etapas de quantificação e identificação para cada composto avaliado. As mesmas condições foram utilizadas para avaliar os extratos provenientes dos dois métodos empregados neste trabalho. Apesar da co-eluição existente para alguns compostos, ainda assim, o emprego da espectrometria de massas permitiu a identificação inequívoca dos mesmos através da escolha do uso de diferentes transições. O uso de aditivos na fase móvel permite melhora na separação cromatográfica, além de favorecer o processo de ionização dos compostos. Recomenda-se a utilização de aditivos com baixas concentrações salinas ($<10 \text{ mmol L}^{-1}$) e elevada volatilidade para que não ocorra contaminação da fonte de ionização e supressão de sinal. A utilização de ácido fórmico em modo positivo forma $[M + H]^+$ e com formiato de amônio ocorre a formação de adutos de amônio $[M + NH_4]$. A formação desses adutos pode ser observada na Tabela 9 para os compostos oxamil, bispiribaque sódico, azinfós etílico e famoxadona observando-se a massa molecular dos compostos e o íon precursor utilizado no método cromatográfico.

Tabela 9 - Agrotóxicos analisados por UHPLC- MS/MS, utilizando o modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção (t_R), íons precursores e produtos para a quantificação e identificação.

continua

Compostos	MM ⁺	t_R (min)	Íon precursor (m/z)	Voltagem do cone (mV)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
					Íon produto	Energia de colisão (mV)	Íon produto	Energia de colisão (mV)
Metamidofós	141	1,4	141	17	94	17	125	17
Oxamil	219	2,5	237	12	72	10	90	10
Carbendazim	191	2,9	191	24	160	18	132	28
Tiametoxam	292	2,9	292	19	132	22	211	12
Monocrotofós	223	3	223	15	127	16	98	12
Imidacloprido	256	3,4	256	23	175	20	209	15
Clotianidina	250	3,4	250	15	169	18	132	12

continuação

Compostos	MM*	t _R (min)	Íon precursor (m/z)	Voltagem do cone (mV)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
					Íon produto	Energia de colisão (mV)	Íon produto	Energia de colisão (mV)
Metiocarbe sulfóxido	241	3,6	242	17	185	14	122	28
Triclorfom	257	3,7	257	20	127	17	257	5
Dimetoato	229	3,7	230	12	199	20	125	10
Vamidotiona	287	3,7	288	17	118	28	146	10
Mevinfós	224	3,7	225	13	127	15	193	8
Carbofurano-3-hidroxi	237	3,7	238	25	163	16	181	10
Metiocarbe sulfona	257	3,9	258	22	107	38	122	19
Tiacloprido	253	4,1	253	32	126	20	90	40
Cimoxanil	198	4,1	199	14	128	8	111	18
Quincloraque	242	4,3	242	20	196	28	161	36
Pirimicarbe	238	4,6	239	25	72	18	182	18
Fluroxipir	255	4,7	255	19	209	16	181	22
Cianazina	241	4,7	241	28	214	17	96	25
Bentazona	240	4,8	241	12	107	26	199	12
Mefosfolam	269	4,9	270	25	140	24	75	22
Mepronil	269	4,9	270	27	91	44	119	28
Tiofanato metílico	342	4,9	343	23	151	21	311	11
Simazina	202	4,9	202	34	124	22	96	16
Metsulfurom metílico	382	4,9	382	22	167	16	199	22
Propoxur	209	4,9	210	12	111	16	168	10
Etefom	145	5	145	10	113	8	73	8
Carbofurano	222	5	222	25	165	16	123	16
Carboxina	235	5,1	236	25	143	16	87	22
Carbaril	201	5,2	202	19	145	22	117	28
Monolinuron	215	5,3	215	23	126	34	99	32
Tiodicarbe	354	5,3	355	17	108	16	88	16
Paraoxona etílica	275	5,5	276	16	220	17	248	16
Atrazina	216	5,6	219	30	161	18	125	23
Imazalil	297	5,6	297	31	159	22	69	22
Metalaxil	279	5,7	280	15	192	17	220	13
Pendimetalina	281	5,7	282	12	194	17	212	10
Atrazina-d5 (PC)	221	5,7	221	26	179	18	101	23
Ametrina	227	5,7	228	32	186	18	68	36
Diuron	233	5,7	233	27	72	18	46	14
Pirimetanil	200	5,9	200	42	107	24	82	24
Azinfós metílico	317	5,9	318	12	261	8	160	8
Clomazone	240	6,0	240	23	89	18	125	46
Azoxisrobina	403	6	404	17	329	30	372	15
Linuron	249	6,1	249	25	181	18	160	16
Fenpropimorfe	303	6,1	304	41	147	34	57	14
Bispiribaque sódico	452	6,2	431	23	275	20	196	14
Terbutilazina	230	6,2	230	28	174	16	96	28

continuação

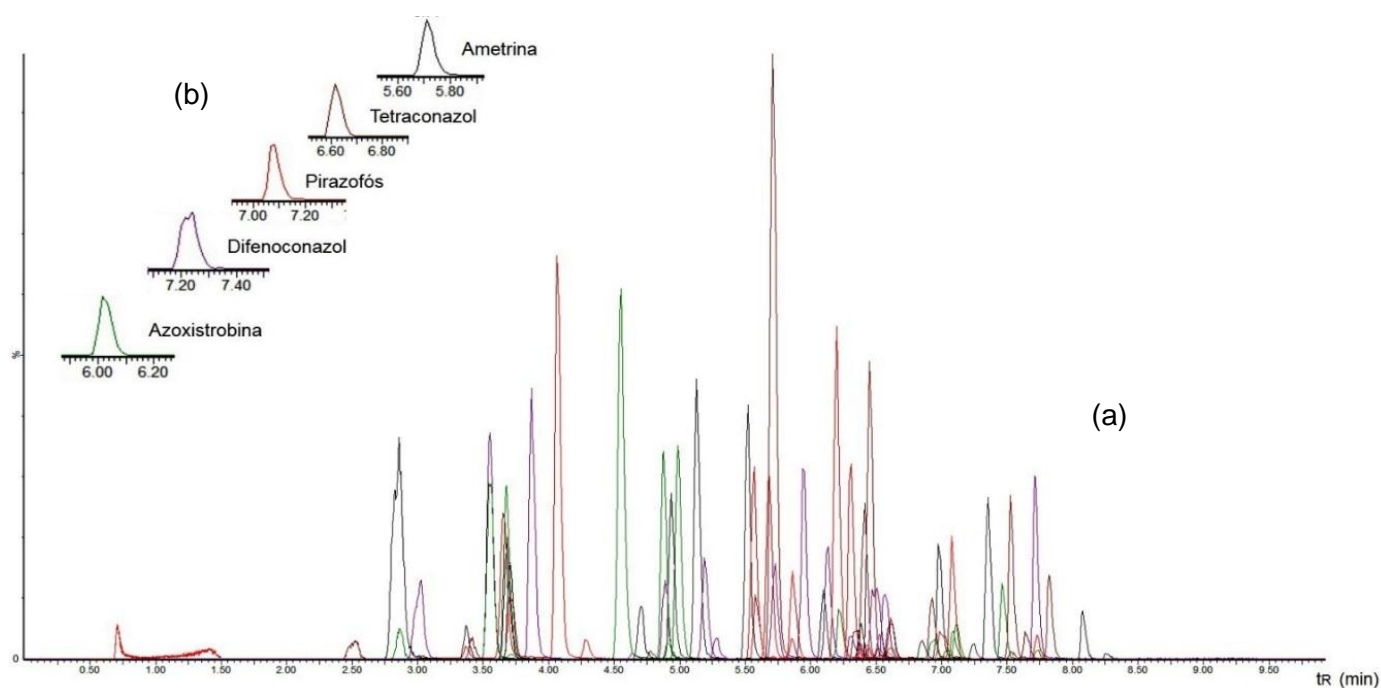
Compostos	MM*	t _R (min)	Íon precursor (m/z)	Voltagem do cone (mV)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
					Íon produto	Energia de colisão (mV)	Íon produto	Energia de colisão (mV)
Boscalida	343	6,2	343	32	307	20	140	20
Clorimuron etílico	415	6,3	415	25	83	40	186	15
Flutolanil	323	6,3	324	23	65	40	262	18
Malationa	330	6,3	331	12	99	24	127	12
Dimetomorfe	388	6,3	388	30	301	21	165	28
Propizamida	256	6,3	256	27	190	15	156	15
Clorprofam	213	6,4	214	49	154	18	172	8
Triadimefon	294	6,4	294	22	197	15	69	20
Piridafentiona	340	6,4	341	31	189	22	92	34
Miclobutanil	289	6,4	289	25	70	18	125	32
Bromuconazol	377	6,4	376	32	159	35	70	25
Procloraz	377	6,5	376	13	70	34	307	16
Triazofós	313	6,5	314	22	119	35	162	18
Fluquiconazol	376	6,5	376	37	307	30	349	18
Iprovalicarbe	320	6,5	321	19	119	16	203	10
Ciproconazol	291	6,5	292	27	70	24	125	18
Azinfós etílico	317	6,5	346	10	77	36	132	16
Triadimenol	296	6,5	296	12	70	10	99	15
Mecarbam	329	6,6	330	12	97	35	227	8
Procimidona	284	6,6	284	33	256	17	67	28
Fenarimol	331	6,6	331	37	268	22	81	34
Diclofuanida	333	6,6	330	30	123	17	141	18
Epoxiconazol	330	6,6	330	25	101	50	121	22
Tetraconazol	372	6,6	372	32	159	30	70.1	20
Iprodiona	330	6,8	330	12	245	16	288	15
Fipronil	437	6,8	435	25	250	26	330	16
Cresoxim metílico	313	6,9	314	15	116	12	206	7
Fentiona	278	6,9	279	25	169	16	247	13
Tebuconazol	308	7	308	31	70	22	125	40
Diazinona	304	7	305	20	97	35	169	22
Trifenilfosfato (PI)	326	7	372	40	215	28	152	37
Famoxadona	374	7	392	12	238	20	392	10
Propiconazol	342	7	342	37	159	34	69	22
Piraclostrobina	388	7	388	20	163	25	194	12
Pirazofós	373	7,1	374	33	194	32	222	22
Pirimifós metílico	305	7,1	306	25	108	32	164	22
Metconazol	320	7,1	320	29	125	36	70	22
Bitertanol	337	7,1	338	12	99	16	70	8
Tolcofós metílico	301	7,1	301	30	175	29	125	27
Difenoconazol	406	7,2	406	37	251	25	111	60
Clorpirifós metílico	322	7,3	322	23	290	16	125	20
Indoxacarbe	528	7,3	528	25	203	40	150	22

Compostos	MM*	t _R (min)	Íon precursor (m/z)	Voltagem do cone (mV)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
					Íon produto	Energia de colisão (mV)	Íon produto	Energia de colisão (mV)
Trifloxistrobina	408	7,3	409	25	145	40	186	16
Triflumizol	346	7,4	346	13	278	10	60	10
Profenofós	374	7,5	373	25	128	40	303	20
Buprofezina	305	7,5	306	22	57	12	201	20
Terbufós	288	7,6	289	12	57	22	103	8
Piriproxifeno	321	7,7	322	23	96	14	227	14
Quinoxifeno	308	7,7	308	52	162	44	197	32
Clorpirifós etílico	350	7,7	350	27	97	32	198	20
Fenpropatrina	349	7,7	350	15	97	36	125	20
Propargito	350	7,8	368	15	175	15	231	15
Profoxidina	466	8,0	466	28	280	16	238	19
Deltametrina	505	8,0	506	16	281	18	93	11
Carbosulfano	380	8,1	381	31	118	29	76	34
Piridaben	365	8,1	365	19	147	24	309	12
Piridato	379	8,3	379	19	207	18	351	10

* MM – Massa Molar (g mol⁻¹)/PC – padrão de controle/PI – padrão interno

A Figura 4 apresenta um cromatograma de íons totais (TIC) obtidos para os compostos avaliados e as transições SRM de alguns compostos analisados neste trabalho, na concentração de 20 µg L⁻¹ no solvente acetonitrila.

Figura 4 - a) Cromatograma de íons totais obtido por UHPLC-MS/MS a partir de uma solução 20 µg L⁻¹ preparado no solvente acetonitrila, b) transições SRM para alguns compostos do método.

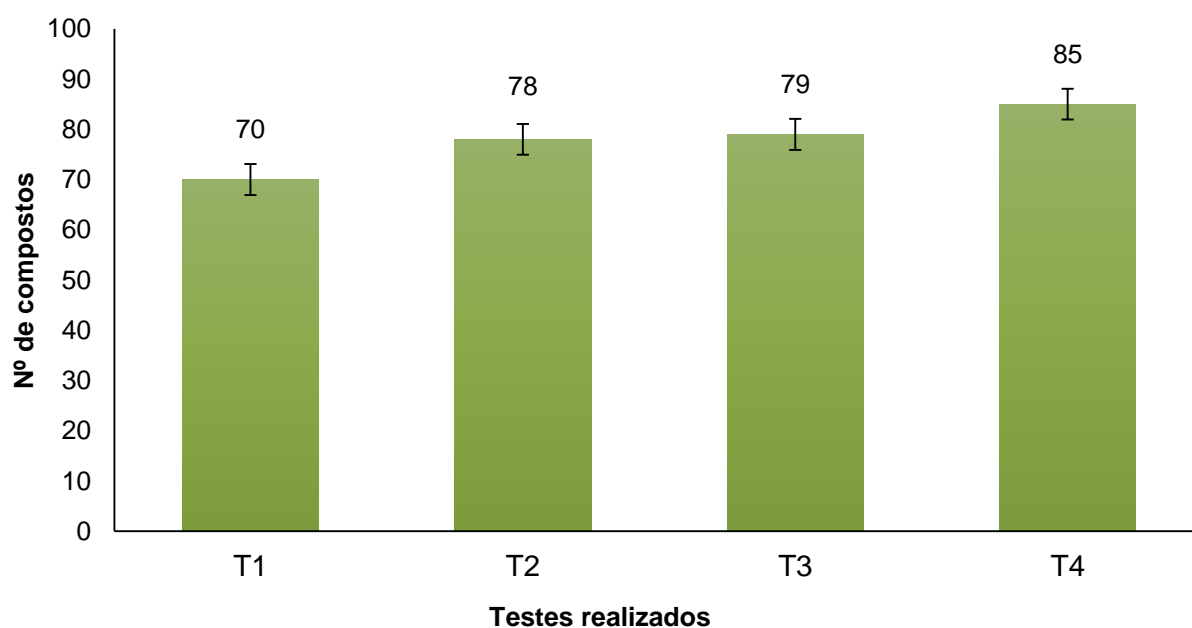


4.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM VINHO

4.2.1 Etapa de extração

O preparo de amostra é uma etapa complexa no desenvolvimento de um método multirresíduo devido às diferentes propriedades físico-químicas dos compostos a serem extraídos simultaneamente da matriz. Como visto anteriormente, o vinho contém quantidades significativas de componentes, tais como ácidos graxos e seus ésteres, compostos fenólicos, álcoois, açúcares, entre outros. Esses compostos são co-extraídos juntamente com os analitos de interesse e podem ocasionar interferência na determinação cromatográfica. Assim, um estudo de diferentes parâmetros que afetam a etapa de extração foi realizado nesse trabalho. Os testes realizados para avaliação da etapa de extração/partição do método QuEChERS estão representados na Tabela 6. Os extratos provenientes destes experimentos foram avaliados através de ensaios de fortificação no nível de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ e posterior injeção no sistema UHPLC-MS. A Figura 5 apresenta os resultados obtidos em número de compostos que obtiveram recuperação entre 70 e 120% com $\text{RSD} \leq 20\%$ para todos os testes realizados (T1, T2, T3 e T4).

Figura 5 - Número de compostos que apresentaram recuperações médias entre 70 e 120% e $\text{RSD} \leq 20\%$ ($n=3$) para os testes avaliados no nível de fortificação de $50 \mu\text{g L}^{-1}$.



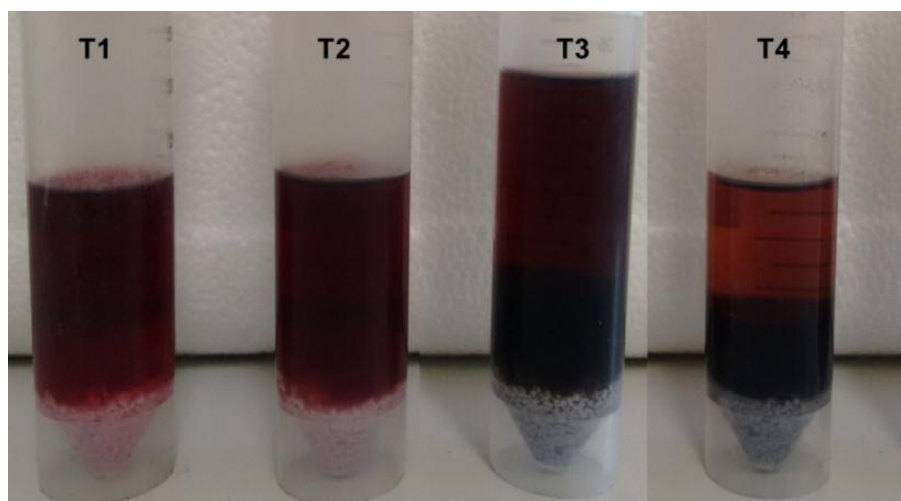
Ao compararmos os resultados, é possível observar que o número de compostos recuperados, dentro dos parâmetros de recuperação e RSD estabelecidos, não apresentou grande variação entre os diferentes testes realizados. Porém, o teste T4, que representa o método QuEChERS acetato modificado demonstrou os melhores resultados. Este experimento possibilitou um maior número de compostos recuperados (85), seguido dos testes T3 (79) e T2 (78) que representam a utilização do tampão acetato e citrato, respectivamente. O teste T1 com 70 compostos, corresponde ao método original e teve o menor número de compostos recuperados. Resultados semelhantes foram obtidos por Lehotay e colaboradores (2010) quando realizaram uma comparação entre os métodos QuEChERS original, citrato e acetato em diferentes matrizes. A utilização de tampões de pH através da adição dos sais acetato de sódio (pH 4,8) e mistura de sais citrato (faixa de pH 5,0 a 5,5) promoveu recuperações satisfatórias para um maior número de compostos, incluindo aqueles dependentes do pH. Uma comparação recente dos métodos QuEChERS (tampão citrato e tampão acetato) em diferentes frutas demonstrou que, o método QuEChERS acetato foi o mais eficiente e apropriado para extração de agrotóxicos em uvas (CHRISTIA *et al.*, 2015). Diferentes autores reportam a utilização do método QuEChERS para extração de agrotóxicos em vinho sendo que, mais de uma versão do método QuEChERS vem sendo utilizada.

No trabalho realizado por Walorczyk e colaboradores (2011) uma comparação entre os métodos QuEChERS original, acetato modificado e citrato foi realizada para extração de resíduos de 160 agrotóxicos em vinho. Os autores reportaram através de análise dos extratos por GC-MS modo *full scan* que o uso do tampão acetato apresentou maior quantidade de co-extrativos. Além disso, houve dificuldade de visualização da etapa de partição quando o método QuEChERS acetato foi utilizado. Os melhores resultados foram obtidos com a utilização do método QuEChERS citrato e limpeza por d-SPE utilizando 0,75 g de MgSO₄, 0,125 g de PSA e 0,250 g de C18. Os compostos foram analisados por GC-MS/MS e o LOQ do método foi de 0,01 a 0,05 mg L⁻¹ para os compostos selecionados. Romero-González e colaboradores (2011) realizaram uma comparação utilizando o método QuEChERS acetato, extração com auxílio de ultrassom e extração líquido-líquido com acetonitrila. Neste trabalho, os métodos foram avaliados para determinação de mais de 90 compostos (micotoxinas e agrotóxicos) em alimentos e bebidas, incluindo vinho, por UHPLC-MS/MS. Os melhores resultados foram obtidos com a utilização do método QuEChERS acetato. Os valores de LOQ do método para vinho variaram entre 3,0 e 8,0 µg L⁻¹. No presente trabalho, o experimento T4 além de

apresentar o maior número de compostos dentro dos parâmetros de recuperação e RSD adequados apresentou uma diferença em termos de visual (mais claro) em termos de coloração em relação aos demais extratos obtidos pelos outros métodos avaliados (Figura 6).

O método modificado resultou em um extrato mais claro, facilitando a visualização da etapa de partição. Essa diferença na coloração pode estar relacionada à mudança de pH do extrato a qual pode levar a uma alteração na estrutura de compostos como as antocianinas, principais pigmentos do vinho e que apresentam diferentes colorações de acordo com o pH da solução em que estão contidas (WROLSTAD *et al.*, 2005). A fim de investigar se essa diferença de coloração teria reflexo na quantidade de co-extrativos, avaliou-se efeito matriz dos extratos que apresentaram coloração mais clara, sendo esses o acetato (T3) e acetato modificado (T4).

Figura 6 – Comparação visual dos extratos em acetonitrila obtidos a partir dos métodos QuEChERS original (T1), citrato (T2), acetato (T3) e acetato modificado (T4).



A comparação do efeito matriz está demonstrada na Figura 7. É possível observar que os valores de efeito matriz entre os dois métodos apresentaram uma variação discreta para a maioria dos compostos avaliados. Porém, para alguns compostos como clomazone, clorimuron etílico e indoxacarbe houve uma redução mais pronunciada no efeito matriz quando o experimento T4 foi utilizado. Além disso, em uma avaliação geral, foi possível observar uma redução nos valores de EM para a maioria dos compostos quando o método T4 foi empregado.

Tendo em vista os resultados apresentados e também a melhor a visualização da etapa de partição proporcionada com método o QuEChERS acetato modificado (T4), o mesmo foi escolhido para dar prosseguimento ao estudo do método.

Figura 7 – Avaliação do efeito matriz por UHPLC-MS/MS para os compostos extraídos pelos métodos QuEChERS acetato (T3) e modificado (T4).



4.2.2 Etapa de limpeza (*clean-up*)

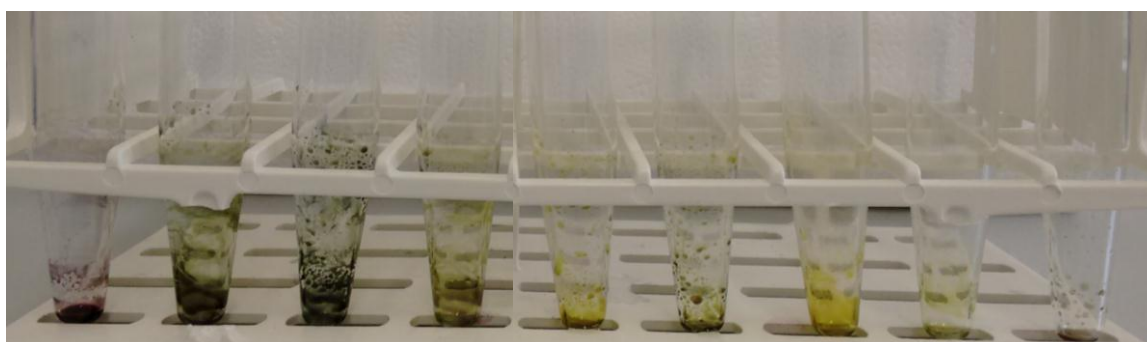
A etapa de limpeza dos extratos de um método de extração é uma das mais importantes e também uma das mais onerosas tendo em vista os materiais adsorventes utilizados (ARIAS *et al.*, 2014). Neste sentido e visando a obtenção de um método com o maior número possível de compostos, a etapa de limpeza foi estudada. Assim, diferentes tipos de sorventes foram avaliados de acordo com os testes descritos na Tabela 6. Nesta etapa, a análise gravimétrica auxiliou na avaliação inicial da eficiência de limpeza dos sorventes utilizados. Esta avaliação foi realizada através da quantificação da massa de resíduo remanescente em cada extrato após a realização da evaporação dos mesmos. Além disso, os extratos fortificados no nível de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada teste foram injetados no sistema UHPLC-MS/MS e os compostos selecionados foram quantificados de maneira a avaliar a eficiência de extração do método. Os extratos relativos aos testes sem *clean-up* e com utilização de Florisil® (T5) não foram injetados uma vez que, apresentaram um alto conteúdo de co-extrativos podendo trazer danos ao equipamento.

As Figuras 8 e 9 apresentam os resultados obtidos na análise gravimétrica bem como, o número de compostos com recuperação entre 70 e 120% e $\text{RSD} \leq 20\%$ para cada teste realizado, respectivamente.

Tendo em vista os resultados da análise gravimétrica (Figura 9), pode-se observar que os testes onde o sorvente GCB foi utilizado foram os que demonstraram melhor eficiência de limpeza do extrato (T11 e T12). Por outro lado, estes experimentos apresentaram o menor número de compostos recuperados dentro dos parâmetros estabelecido no item 3.6.2 (Figura 9). O GCB apresenta excelente poder de remoção de pigmentos, este sorvente já foi empregado em diferentes aplicações do método QuEChERS. Entretanto, o GCB possui como característica a forte retenção de alguns compostos, em especial aqueles que apresentam estruturas planares, como tiabendazol, hexaclobenzeno e terbufós, entre outros (MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ *et al.*, 2015).

Figura 8 - A) Avaliação visual dos extratos após evaporação; B) Resultado em massa (g) da análise gravimétrica para os diferentes sorventes avaliados neste trabalho. T5-Florisil (125 mg), T6-Strata-X (125 mg), T7-Quitossan (125 mg), T8-C18 e PSA (350 e 125 mg), T9-Florisil e PSA (350 e 125 mg), T10-PSA (125 mg), T11-PSA e GCB (125 e 20 mg), T12-PSA, C18 e GCB (100, 200 e 20 mg).

A)



B)

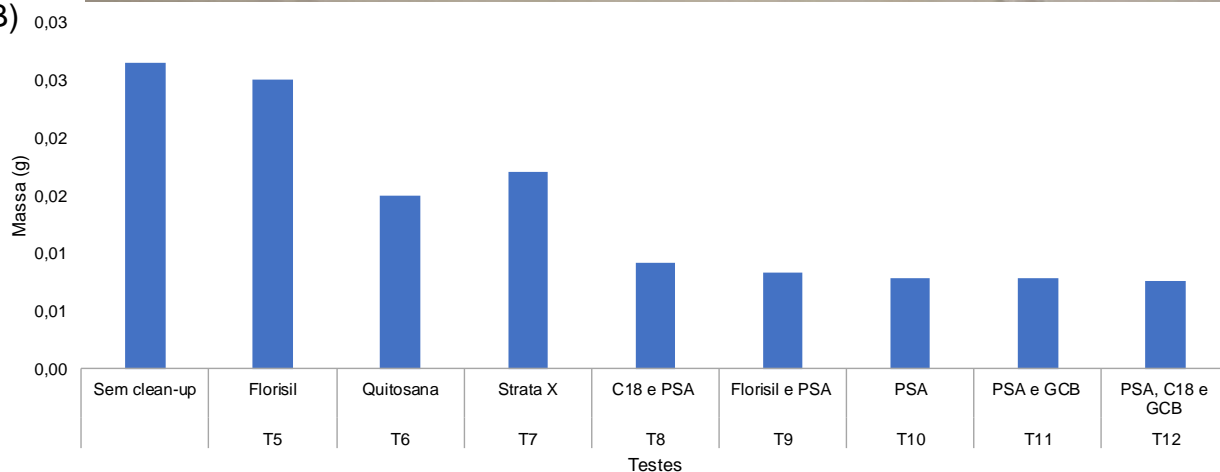
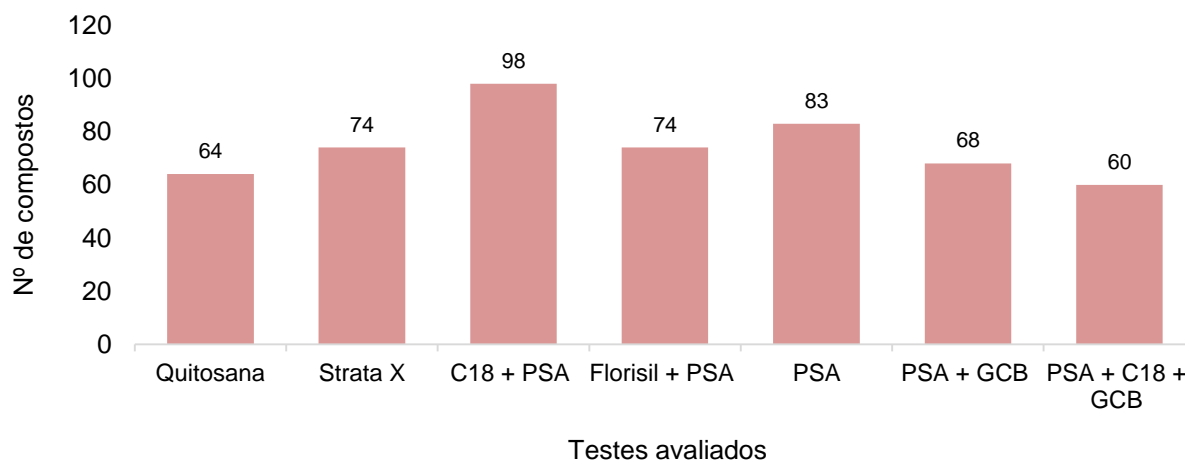


Figura 9 - Número de compostos recuperados na faixa de 70-120% com RSD \leq 20% para cada teste realizado no nível de fortificação de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (n=3) analisados por UHPLC-MS/MS.



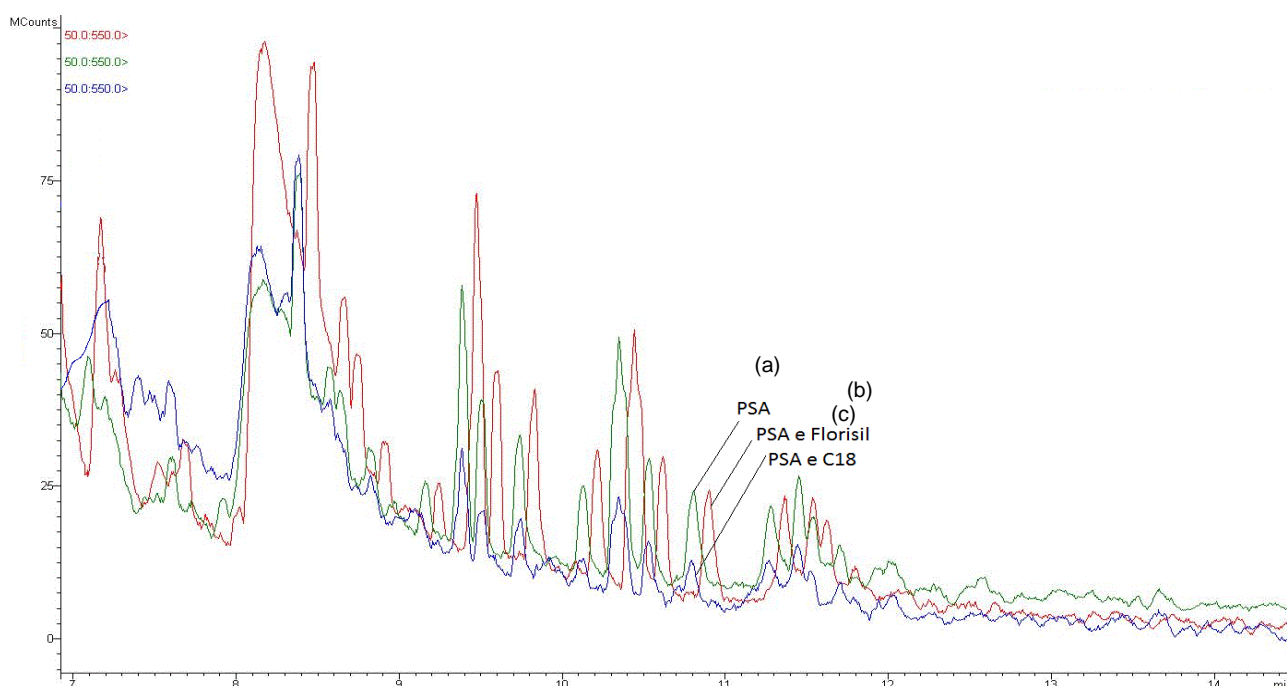
No presente trabalho, compostos como tiametoxam e pirazofós obtiveram recuperação inferior a 50% nos testes com o uso de GCB. Walorczyk e colaboradores (2011) reportam que a utilização de GCB proporcionou uma excelente remoção de co-extrativos dos extratos do método QuEChERS para extração de agrotóxicos em vinhos, porém baixos valores de recuperação foram encontrados para os compostos clorotalonil, tiametoxam, tiabendazol, ciprodinil, diniconazol, diflufenican, pirazofós, procloraz e imibenconazol.

Os testes empregando o sorvente PSA também demonstraram boa eficiência de limpeza dos extratos como é o caso dos experimentos T8, T9 e T10. Porém, a combinação dos sorventes PSA e C18 proporcionou a recuperação de um maior número de compostos recuperados. O sorvente C18 é bastante utilizado para extratos provenientes de amostras com teor de gordura maior que 2%, pois remove com boa eficiência interferentes apolares, tais como substâncias graxas e lipídios. No entanto, o C18 tem sido utilizado de maneira vantajosa em conjunto com PSA para diferentes tipos de matrizes e analitos (WALORCZYK *et al.*, 2011). Com a utilização da combinação entre os sorventes PSA e C18 dos 104 compostos para o método, apenas 6 não apresentaram recuperação dentro da faixa adequada.

Com relação aos demais testes, o uso de sorventes como Florisil e Quitosana justifica-se pelo menor custo de aquisição dos mesmos e pelo seu emprego na etapa de limpeza em diferentes matrizes (ARIAS *et al.*, 2014). Porém, neste trabalho, quando estes sorventes foram utilizados os resultados obtidos tanto em termos de limpeza do extrato, bem como, em eficiência de recuperação não foram considerados satisfatórios. Tanto Florisil quanto Quitosana, possuem estruturas com características apolares o que pode explicar a fraca interação que ambos tiveram pelos co-extrativos do vinho que são em sua maioria polares (JACKSON, 2008). O sorvente Strata X é um sorvente que possui características poliméricas e é bastante utilizado para a análise de resíduos de agrotóxicos em diferentes matrizes, na maioria das vezes, na forma de cartuchos de SPE (GERVAIS *et al.*, 2008). Apesar de suas características poliméricas, o Strata X não apresentou eficiência de limpeza para os extratos avaliados conforme pode ser observado na Figura 9. De maneira geral, os sorventes GCB e PSA demonstraram a melhor eficiência de remoção dos co-extrativos do extrato. Porém, o GCB proporcionou baixos valores de recuperação para muitos compostos. Desta forma, os testes que utilizaram somente PSA ou em combinação com C18 e Florisil tiveram seus extratos injetados no sistema GC-MS/MS no modo *full scan*. Esta etapa possibilitou avaliar se adição de Florisil e C18

significaram redução no sinal cromatográfico. A partir da avaliação dos cromatogramas da Figura 10 foi possível observar que a utilização do C18 promoveu uma redução no sinal cromatográfico em comparação ao uso do sorvente PSA ou da combinação deste com Florisil. Tendo em vista a composição dos vinho, atribui-se a redução do sinal cromatográfico à remoção, pelo C18, de compostos como os ácidos graxos de cadeia longa. O mesmo não foi observado quando Florisil foi utilizado em combinação com o PSA. Sendo assim, a utilização de PSA e C18 foi escolhida para a etapa de clean-up neste trabalho, juntamente com a extração utilizando o método QuEChERS acetato modificado.

Figura 10 - Cromatograma no modo *fullscan* obtido por GC-MS/MS do extrato de vinho após a etapa de limpeza com a utilização de a) PSA, b) PSA e Florisil e c) PSA e C18

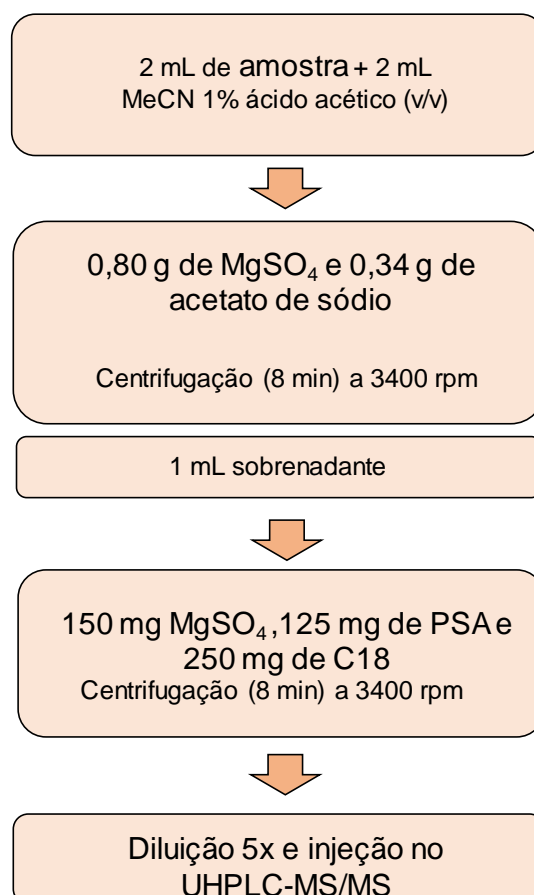


4.2.3 Método QuEChERS miniaturizado para extração de agrotóxicos em amostras de vinho

Com base na atual tendência de redução no consumo dos reagentes, seja devido ao custo ou a geração de resíduos, a miniaturização de métodos de extração tem sido tema de algumas publicações nos últimos anos (MOLINER-MARTINEZ *et al.*, 2009; STENZLER *et al.*, 2014; LOZANO *et al.*, 2016). Com base nisso, nesse trabalho, o

método de extração selecionado a partir dos testes preliminares foi miniaturizado proporcionando uma redução de 80% no consumo de amostra e reagentes (Figura 11). Desta forma, o método de extração miniaturizado consistiu na transferência de 2 mL de amostra adicionados a um tubo de PP de 15 mL seguidos da adição de 2 mL de acetonitrila acidificada (1% ácido acético v/v). O tubo foi agitado por 1 min com o auxílio de um vortex e após foi realizada a adição dos sais de partição nas seguintes quantidades: 0,80 g de MgSO_4 e 0,34 g de acetato de sódio. O tubo foi agitado novamente em vortex e centrifugado por 8 minutos a 3400 rpm. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi retirado e adicionado a um tubo de eppendorf contendo 125 mg de PSA e 250 mg de C18. Os tubos foram agitados novamente por 1 minuto em vortex, centrifugados por 8 min a 3400 rpm. O extrato sobrenadante foi filtrado com filtros de nylon de 0,2 μm de porosidade, acondicionado em vials de 2 mL e injetado no sistema UHPLC-MS/MS após uma diluição de 5x em água ultrapura.

Figura 11 - Procedimento do método QuEChERS miniaturizado



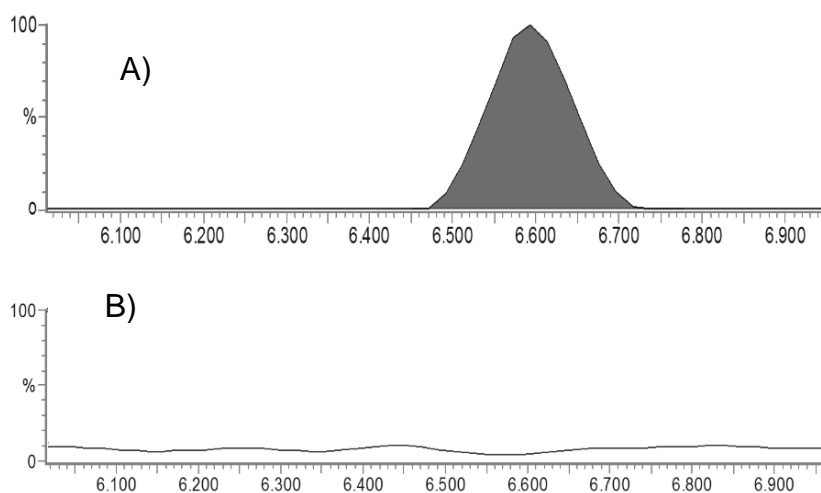
4.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS E DA SD-DLLME PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE VINHO

A validação do método QuEChERS miniaturizado foi realizada utilizando o sistema UHPLC-MS/MS nas condições descritas no item 3.8. Todas as soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz (vinho) obtidos a partir das amostras “branco”. Dessa maneira, foi possível avaliar os parâmetros de validação de métodos cromatográficos e os resultados estão apresentados na Tabela 10 para os 97 compostos validados pelo método QuEChERS miniaturizado.

4.3.1 Seletividade e Linearidade

A seletividade 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” como pode ser observado na Figura 12. Na matriz não foi verificada a presença dos analitos em estudo acima do LOD do método, utilizando-se, dessa forma, a amostra avaliada para confecção da curva analítica e ensaios de fortificação. A linearidade do método proposto foi avaliada pela aplicação da regressão linear aos pontos da curva analítica e obtenção do coeficiente de determinação (r^2). A faixa linear do método foi de 0,5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, com $r^2 \geq 0,990$ para a maioria dos compostos exceto para bentazona, bromuconazol e fentiona que obtiveram $r^2 \geq 0,98$.

Figura 12 - A) Composto tebuconazol e B) amostra branco de vinho extraídos pelo método QuEChERS.



4.3.2 Limites de detecção e quantificação

Os valores de limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para o método QuEChERS miniaturizado foram obtidos como descrito no item 3.8 e os resultados estão apresentados na Tabela 10. O LOQ foi de 10,0 e o LOD de 3,0, exceto para os compostos azinfós etílico, clorpirifós etílico, ciproconazol, deltametrina, imidacloprido, indoxacarbe e pendimetalina que obtiveram LOQ de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ e LOD de 6,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Não havendo legislação vigente que estabeleça valores de LMR para amostras de vinho, os limites encontrados foram comparados aos estabelecidos para uva (ANVISA, 2015) sendo que os valores atendem a legislação estabelecida. Além disso, quando comparados a outros trabalhos publicados na literatura para determinação de agrotóxicos em vinho (CUNHA *et al.*, 2009; WALORCZYK *et al.* 2011) os limites encontrados neste trabalho demonstram estar adequados.

4.3.3 Exatidão, Precisão e Precisão Intermediária

A exatidão do método foi avaliada em termos de recuperação dos compostos nos níveis de fortificação de 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e os resultados são apresentados na Tabela 10. Através dos resultados obtidos é possível observar que a precisão do método atende aos parâmetros estabelecidos uma vez que, os valores de RSDr estão $\leq 20\%$ (SANTE, 2015). A recuperação foi calculada utilizando a curva analítica preparada no extrato da matriz, aceitando o critério de recuperação entre 70 e 120% e RSD $\leq 20\%$, conforme a recomendação (SANTE, 2015). No nível de fortificação de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ os compostos azinfós etílico, clorpirifós etílico, ciproconazol, deltametrina, imidacloprido, indoxacarbe e pendimetalina não apresentaram valores de recuperação adequados de acordo com o critério. Esses compostos foram mantidos no método, porém os valores de LOQ para os mesmos foi estabelecido como 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.3.4 Efeito Matriz

Neste trabalho, o efeito matriz (EM) foi calculado através da comparação da inclinação das curvas analíticas obtidas no solvente e no extrato da matriz (vinho) para os compostos selecionados, conforme a Tabela 9. De acordo com Oshita & Jardim (2015) o EM é utilizado para verificar a eficiência de ionização do analito no detector, que pode

causar alterações negativas ou positivas no sinal do cromatográfico, devido à supressão iônica ou acréscimo de sinal, respectivamente. Além disso, considera-se que quando essas variações nas respostas do detector forem menores que $\pm 20\%$ não há efeito matriz. Valores superiores a $\pm 20\%$ podem influenciar de maneira significativa na análise cromatográfica levando, entre outras coisas, a erros de quantificação (FERRER *et al.*, 2011).

Os valores obtidos de EM para o método QuEChERS miniaturizado estão demonstrados na Tabela 10. Os valores obtidos foram prioritariamente negativos, ou seja, indicam o efeito de supressão do sinal cromatográfico. De acordo com Oshita & Jardim (2015), quando ocorre supressão do sinal cromatográfico é comum assumir que os compostos co-eluídos, oriundos da matriz, competem com os analitos pela ionização. Neste caso, a ionização será favorecida para as moléculas que são mais ionizáveis e estão em maiores concentrações na amostra, provocando uma diminuição do sinal dos analitos. Pode-se observar também, que os valores de EM obtidos ficaram na faixa entre -30 e -80% ou seja, exercem influência significativa na análise cromatográfica uma vez que estão acima do limite de $\pm 20\%$.

O efeito matriz depende da complexidade das amostras, ou seja, do número e quantidade de substâncias que estão na sua composição e que podem vir a interferir na determinação analítica. O preparo de amostra, principalmente a etapa de limpeza, é essencial para reduzir o efeito matriz pela remoção dos interferentes (OSHITA & JARDIM, 2015). Apesar de o vinho ser uma matriz com grande quantidade de água (> 80% da composição), existem também na sua composição pigmentos, açúcares e ácidos graxos de cadeia longa. No caso do método QuEChERS, mesmo com a utilização da etapa de limpeza por d-SPE, presume-se que esses compostos estejam relacionados com os valores de EM obtidos. Para a maioria dos compostos validados, o EM ficou entre -40 e -60% como pode ser observado na Figura 13, sendo que, o maior valor foi encontrado para o composto propoxur (-80%). Os valores estão de acordo aos reportados por Wang e colaboradores (2016) para a determinação de 187 agrotóxicos em amostras de vinho utilizando QuEChERS e UHPLC-MS/MS. Onde, na avaliação do EM, mais de 89% dos compostos obtiveram valores negativos de EM estando estes acima de $\pm 20\%$.

Além do preparo de amostra, algumas alternativas são propostas para diminuição do efeito matriz como, por exemplo, construção da curva analítica na própria matriz, diluição da amostra, otimização da separação cromatográfica e alterações nas condições do detector, como modo de ionização, tipo de fonte ou transições SRM não interferentes

(OSHITA & JARDIM, 2015). Dentre essas alternativas, a construção da curva analítica no extrato da matriz e a diluição dos extratos vêm sendo amplamente utilizadas assegurando a atenuação do EM e garantindo a confiabilidade dos resultados de quantificação (KRUIVE *et al.*, 2008; FERRER *et al.*, 2011).

No presente trabalho, tendo em vista os resultados obtidos de EM e para atenuar esse problema, as curvas analíticas utilizadas para quantificação dos compostos foram construídas no extrato da matriz (branco).

Figura 13 - Efeito matriz para os compostos extraídos pelo método QuEChERS miniaturizado

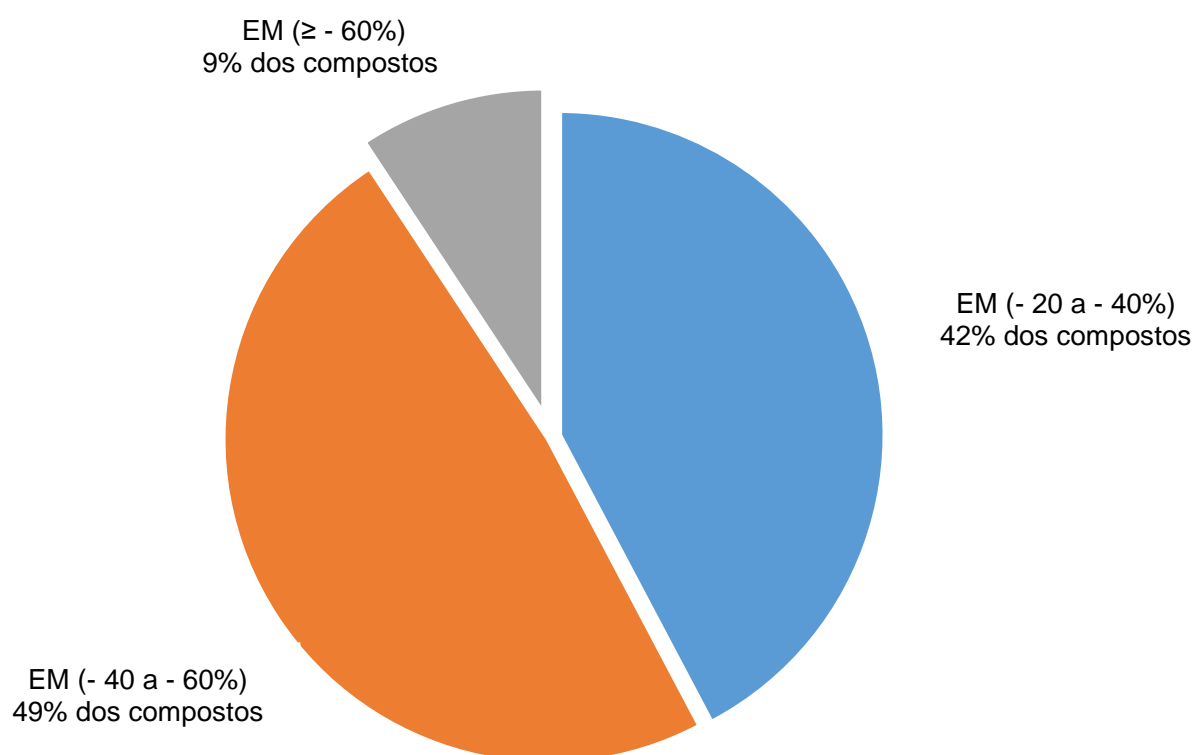


Tabela 10 - Resultados obtidos na etapa de validação do método QuEChERS para os parâmetros de validação LOQ, LOD, exatidão, precisão, precisão intermediária e efeito matriz.

Compostos	r ²	LODm (µg L ⁻¹)	LOQm (µg L ⁻¹)	Exatidão, Recuperação % (Precisão, RSDr %)				Precisão Inter., Recuperação % (Precisão, RSDip %)				EM (%)
				10	20	50	100	0,01	0,02	0,05	0,10	
				(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	
Ametrina	0,99	3,0	10,0	82 (16)	82 (04)	102 (29)	110 (08)	95 (02)	114 (04)	107 (07)	103(04)	-31
Atrazina	0,99	3,0	10,0	89 (24)	77 (08)	89 (36)	90 (09)	85 (15)	115 (10)	116 (14)	104 (17)	-49
Azinfós etílico	0,99	6,0	20,0	63 (20)	71 (17)	73 (18)	77 (20)	68 (16)	120 (11)	92 (13)	76 (21)	-31
Azinfós metilílico	0,99	6,0	20,0	87 (17)	75 (17)	90 (12)	110 (11)	120 (14)	98 (20)	114 (20)	105 (20)	-49
Azoxistrobina	0,99	3,0	10,0	83 (16)	80 (13)	97 (10)	119 (07)	87 (20)	92 (11)	78 (12)	85 (04)	-42
Bentazona	0,98	3,0	10,0	74 (19)	93 (14)	99 (16)	117 (15)	71 (17)	94 (19)	106 (16)	109 (19)	-36
Bispiribaque	0,99	3,0	10,0	80 (16)	96 (15)	78 (10)	109 (14)	117 (20)	119 (20)	111 (14)	102 (12)	-53
Bitertanol	0,99	3,0	10,0	71 (14)	77 (15)	87 (15)	78 (12)	110 (18)	79 (12)	85 (14)	100 (20)	-46
Boscalida	0,99	3,0	10,0	71 (11)	77 (19)	83 (10)	119 (06)	102 (28)	88 (13)	105 (12)	118(18)	-32
Bromuconazol	0,98	3,0	10,0	77 (16)	73 (14)	70 (12)	71 (16)	78 (19)	75 (13)	70 (20)	75(20)	-30
Buprofezina	0,99	3,0	10,0	104 (13)	103 (06)	76 (10)	95 (08)	98 (07)	95 (10)	109 (16)	105 (08)	-31
Carbaril	0,99	3,0	10,0	90 (13)	84 (20)	87 (12)	116 (10)	101 (18)	90 (22)	70 (20)	114 (14)	-59
Carbendazim	0,99	3,0	10,0	74 (11)	73 (12)	80 (20)	120 (09)	98 (20)	85 (18)	104 (16)	120 (18)	-45
Carbofurano	1,00	3,0	10,0	88 (20)	94 (13)	87 (12)	118 (09)	80 (07)	85 (11)	78 (12)	91 (10)	-48
Carbofurano-3-hidroxi	0,99	3,0	10,0	114 (16)	99 (20)	83 (11)	116 (12)	95 (20)	83 (20)	95 (18)	85 (12)	-47
Carboxina	0,99	3,0	10,0	97 (12)	98 (08)	80 (13)	85 (08)	96 (16)	82 (10)	83 (11)	93 (09)	-35
Clorprofam	0,99	6,0	10,0	76 (11)	76 (12)	74 (20)	75 (20)	80 (14)	117 (19)	89 (11)	92 (20)	-31
Clorpirifós	0,99	6,0	20,0	63 (15)	82 (20)	98 (20)	103 (19)	63 (19)	83 (11)	114 (20)	87 (20)	-30
Clorpirifós-metilico	0,99	3,0	10,0	76 (12)	79 (18)	70 (17)	116 (19)	92 (17)	93 (11)	111 (20)	105 (18)	-32
Clomazone	0,99	3,0	10,0	84 (18)	94 (09)	77 (15)	71 (09)	101 (19)	106 (08)	103(07)	90 (08)	-37
Clorimurom etilílico	0,99	3,0	10,0	80 (11)	76 (18)	70 (17)	103 (07)	112 (19)	89 (14)	118 (18)	113 (09)	-30
Clotianidina	0,98	3,0	20,0	68 (11)	75 (20)	70 (14)	110 (14)	103 (20)	103 (17)	86 (16)	109 (20)	-30
Cianazina	0,99	3,0	0,01	85 (16)	78 (18)	100 (15)	115 (11)	101 (16)	106 (12)	109 (12)	105 (06)	-49
Ciproconazol	0,99	6,0	20,0	64 (16)	71 (17)	75 (20)	74 (12)	66 (20)	105 (12)	112 (16)	117 (11)	-32
Deltametrina	0,99	6,0	20,0	65 (11)	76 (16)	72 (17)	72 (16)	68 (16)	81 (18)	79 (13)	92 (10)	35
Diazinona	0,99	3,0	10,0	107 (19)	84 (12)	76 (10)	112 (15)	120 (10)	108 (18)	115 (14)	109 (18)	-36
Diclofluanida	0,99	3,0	10,0	112 (17)	99 (16)	73 (15)	109 (18)	80 (49)	70 (39)	78 (17)	73 (21)	-48
Difenconazol	0,99	3,0	10,0	87 (20)	84 (16)	74 (20)	101 (08)	102 (19)	104 (10)	106 (12)	105 (14)	-34
Dimetoato	0,99	3,0	10,0	83 (16)	78 (13)	85 (14)	105 (09)	89 (19)	120 (20)	112 (12)	104 (14)	-30
Dimetomorfe	0,99	3,0	10,0	89 (11)	97 (20)	83 (14)	90 (10)	71 (20)	81 (18)	86 (10)	90 (06)	-44

continua
continuação

Compostos	r^2	LODm ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQm ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Exatidão, Recuperação % (Precisão, RSDr %)				Precisão Inter., Recuperação % (Precisão, RSDip %)				EM (%)
				10	20	50	100	0,01	0,02	0,05	0,10	
				($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	(mg L^{-1})	(mg L^{-1})	(mg L^{-1})	(mg L^{-1})	
Diuron	0,99	3,0	10,0	107 (15)	99 (17)	77 (14)	76 (07)	91 (19)	108 (10)	98 (07)	88 (09)	-46
Epoxiconazol	0,99	3,0	10,0	78 (15)	72 (11)	70 (14)	88 (10)	114 (20)	103 (12)	111 (17)	101 (15)	-56
Fenarimol	0,99	3,0	10,0	71(14)	77 (19)	73 (18)	111 (20)	99 (15)	120(14)	102 (17)	87 (12)	-42
Fenpropatrina	0,99	3,0	10,0	78 (11)	70 (10)	74 (19)	113 (12)	120 (13)	106 (16)	89 (18)	105 (19)	-58
Fenpropimorfe	0,99	3,0	10,0	82 (12)	80 (15)	78 (10)	73 (10)	102 (18)	115 (16)	117 (16)	119 (11)	-46
Fentiona	0,98	3,0	10,0	83 (15)	96 (16)	92 (18)	70 (10)	75 (20)	80 (20)	119 (20)	80 (20)	-48
Fipronil	0,99	3,0	10,0	94 (46)	105 (28)	81 (44)	126 (15)	85 (10)	107 (18)	99 (20)	101 (14)	-42
Fluquiconazol	0,99	3,0	10,0	99 (47)	95 (33)	72 (34)	121 (14)	111 (14)	102 (16)	103 (20)	102 (20)	-46
Fluroxipir	0,99	3,0	10,0	117 (52)	74 (58)	70 (56)	77 (20)	91 (13)	81 (13)	110 (19)	109 (20)	-42
Flutolanil	0,99	3,0	10,0	107 (19)	91 (12)	86 (28)	77 (08)	101(11)	118 (17)	140 (14)	98 (13)	-39
Imazalil	0,99	3,0	10,0	107 (20)	98 (12)	71 (43)	95 (11)	86 (10)	84 (18)	70 (06)	73 (07)	-37
Imidacloprido	0,99	6,0	20,0	68 (20)	95 (20)	78 (13)	94 (10)	65 (20)	102 (11)	105 (15)	76 (17)	-36
Indoxacarbe	0,99	6,0	20,0	67 (12)	87 (11)	74 (19)	73 (20)	60 (14)	102 (16)	102 (17)	102 (15)	-42
Iprodiona	0,99	3,0	10,0	84 (17)	71 (19)	71 (14)	75 (20)	108 (19)	120 (15)	108 (20)	93 (17)	-36
Iprovalicarbe	0,99	3,0	10,0	108 (12)	84 (13)	83 (33)	107 (08)	93 (19)	96 (18)	97 (16)	94 (08)	-32
Kresoxim-metílico	0,99	3,0	10,0	78 (11)	104 (19)	72 (16)	102 (12)	105 (13)	120 (16)	103 (17)	106 (20)	-41
Linuron	0,99	3,0	10,0	84 (11)	103 (13)	81 (11)	102 (09)	99 (17)	120 (15)	96 (20)	103 (11)	-49
Malationa	0,99	3,0	10,0	103 (20)	120 (14)	77 (10)	107(10)	97 (16)	95 (18)	104 (12)	109 (20)	-30
Mecarbam	0,99	3,0	10,0	95 (11)	91 (20)	94 (17)	92 (18)	100 (20)	102 (17)	106 (16)	105 (18)	-30
Mefosfolan	0,99	3,0	10,0	98 (13)	92 (09)	72 (19)	76 (08)	94 (08)	79 (06)	85 (09)	82 (08)	-36
Metalaxil	0,99	3,0	10,0	107 (20)	110 (20)	93 (12)	120 (08)	108 (13)	92 (14)	75 (12)	101 (10)	-45
Metconazol	0,99	3,0	10,0	93 (18)	100 (19)	72 (10)	97 (12)	104 (20)	97 (19)	90 (18)	99 (06)	-46
Metamidofós	0,99	3,0	10,0	87 (12)	81 (13)	98 (20)	103 (10)	74 (12)	114 (20)	105 (20)	109 (20)	-46
Metiocarbe sulfona	0,99	3,0	10,0	95 (07)	92 (06)	77 (13)	95 (09)	96 (10)	92 (12)	96 (10)	85 (11)	-43
Metiocarbe sulfóxido	0,99	3,0	10,0	90 (10)	82 (11)	78 (15)	103 (09)	83 (18)	82 (17)	106 (12)	101 (12)	-44
Metsulfuron metil	0,99	3,0	10,0	89 (20)	99 (16)	95 (19)	87 (11)	110 (19)	120 (14)	117 (09)	120 (06)	-44
Mevinfós	0,99	3,0	10,0	86 (18)	81 (10)	91 (13)	76 (09)	104 (09)	105 (07)	104 (12)	92 (12)	-40
Monocrotófós	0,99	3,0	10,0	91 (09)	88 (12)	79 (20)	74 (09)	93 (12)	85 (15)	84 (12)	93 (13)	-41
Miclobutanil	1,00	3,0	10,0	74 (15)	78 (15)	77 (12)	81 (15)	106 (11)	120 (18)	89 (17)	71 (20)	-45
Oxamil	0,99	3,0	10,0	83 (10)	84 (12)	76 (20)	77 (08)	95 (20)	89 (20)	104 (11)	86 (14)	-31
Paraoxon metílico	0,99	3,0	10,0	97 (17)	93 (13)	79 (16)	111 (07)	82 (09)	74 (09)	78 (12)	105 (10)	-34
Pendimetalina	0,99	6,0	20,0	68 (17)	75 (14)	79 (15)	77 (19)	61 (10)	79 (16)	79 (14)	77 (65)	-30
Pirimicarbe	1,00	3,0	10,0	98 (14)	94 (09)	91 (16)	120 (08)	84 (09)	100 (10)	91 (10)	95 (09)	-43
Procimidona	0,99	3,0	10,0	72 (19)	72 (11)	72 (15)	79 (18)	78 (20)	97 (15)	86 (18)	88 (15)	-42

Compostos	r^2	LODm ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQm ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Exatidão, Recuperação % (Precisão, RSDr %)				Precisão Inter., Recuperação % (Precisão, RSDip %)				EM (%)
				10	20	50	100	0,01	0,02	0,05	0,10	
				($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	(mg L^{-1})	(mg L^{-1})	(mg L^{-1})	(mg L^{-1})	
Pirimifós-metílico	0,99	3,0	10,0	84 (13)	88 (09)	77 (17)	82 (08)	105 (20)	98 (20)	120 (14)	110 (12)	-44
Procloraz	1,00	3,0	10,0	114 (10)	112 (12)	87 (13)	79 (08)	74 (18)	85 (19)	78 (10)	99 (18)	-43
Profenofós	0,99	3,0	10,0	93 (11)	84 (18)	83 (19)	120 (08)	76 (15)	77 (08)	101 (10)	97 (08)	-43
Profoxidim	1,00	3,0	10,0	85 (15)	75 (14)	72 (14)	92 (17)	70 (16)	98 (19)	120 (11)	78 (18)	-72
Propargito	0,99	3,0	10,0	94 (17)	74 (16)	78 (14)	90 (10)	105 (14)	107 (15)	77 (20)	82 (20)	-33
Propiconazol	0,99	3,0	10,0	98 (20)	84 (16)	76 (19)	103 (12)	80 (20)	86 (20)	101 (09)	103 (09)	-78
Propizamida	0,99	3,0	10,0	106 (20)	111 (09)	74 (20)	103 (12)	76 (20)	89 (17)	84 (14)	79 (15)	-78
Propoxur	0,99	3,0	10,0	109 (12)	99 (11)	76 (13)	79 (08)	106 (11)	103 (09)	108 (15)	110 (14)	-80
Piraclostrobina	0,99	3,0	10,0	103 (13)	100 (20)	72 (20)	105 (08)	120 (10)	84 (20)	105 (18)	120 (16)	-30
Pirazofós	0,99	3,0	10,0	102 (20)	93 (15)	75 (18)	80 (16)	72 (10)	85 (18)	89 (14)	86 (08)	-30
Piridaben	0,99	3,0	10,0	107 (15)	79 (13)	75 (19)	114 (14)	88 (17)	85 (18)	77 (12)	92 (11)	-27
Piridafentiona	0,99	3,0	10,0	79 (18)	86 (19)	82 (13)	84 (08)	105 (11)	105 (18)	110 (10)	108 (05)	-76
Piridato	0,99	3,0	10,0	78 (20)	74 (13)	98 (14)	102 (19)	70 (31)	79 (19)	86 (13)	95 (20)	43
Piriproxifen	0,99	3,0	10,0	72 (19)	83 (10)	96 (11)	95 (16)	105 (13)	115 (18)	116 (20)	116 (19)	-54
Pirimetanol	0,99	3,0	10,0	110 (12)	118 (07)	73 (17)	99 (10)	107 (13)	106 (16)	105 (09)	80 (09)	-77
Quincloraque	0,99	3,0	10,0	79 (16)	78 (20)	74 (11)	77 (10)	78 (14)	77 (13)	74 (13)	75 (09)	-46
Quinoxifeno	0,99	3,0	10,0	82 (17)	74 (18)	82 (15)	85 (08)	114 (20)	120 (15)	113 (13)	118 (11)	-52
Simazina	0,99	3,0	10,0	75 (18)	100 (17)	75 (18)	101 (20)	70 (20)	72 (20)	77 (14)	79 (15)	-55
Tebuconazol	0,99	3,0	10,0	120 (20)	102 (20)	90 (14)	107 (11)	102 (20)	101 (20)	107 (16)	103 (13)	-67
Terbufós	0,99	3,0	10,0	104 (19)	70 (20)	71 (18)	79 (20)	96 (18)	109 (15)	89 (20)	97 (20)	-57
Terbutilazina	0,99	3,0	10,0	95 (20)	90 (15)	80 (11)	120 (08)	87 (18)	75 (11)	105 (15)	70 (12)	-35
Tetraconazol	0,99	3,0	10,0	72 (16)	71 (13)	76 (14)	98 (15)	108 (17)	108 (14)	101 (12)	88 (18)	-59
Thiacloprido	0,99	3,0	10,0	95 (10)	92 (07)	82 (18)	73 (08)	107 (11)	104 (14)	95 (10)	96 (13)	-32
Tiametoxam	0,99	3,0	10,0	83 (13)	87 (10)	70 (20)	108 (10)	97 (13)	88 (20)	86 (19)	83 (20)	-30
Tiodicarbe	0,99	3,0	10,0	77 (19)	83 (20)	102 (17)	120 (09)	101 (16)	80 (20)	88 (14)	73 (14)	-56
Tiofanato metílico	1,00	3,0	10,0	95 (18)	87 (08)	70 (20)	96 (07)	77 (09)	87 (11)	98 (16)	120 (12)	-27
Tolcofós metílico	0,99	3,0	10,0	95 (14)	78 (15)	77 (13)	96 (12)	102 (14)	107 (20)	110 (17)	118 (20)	-33
Triadimefon	0,99	3,0	10,0	74 (17)	108 (13)	84 (16)	118 (16)	88 (16)	74 (12)	91 (16)	106 (11)	-67
Triazofós	0,99	3,0	10,0	96 (20)	84 (20)	71 (20)	87 (09)	79 (14)	121 (17)	103 (15)	116 (15)	-30
Triclorfom	0,99	3,0	10,0	91 (16)	112 (15)	70 (20)	120 (10)	95 (20)	87 (19)	83 (11)	78 (14)	-45
Trifloxistrobina	0,99	3,0	10,0	92 (19)	78 (19)	76 (20)	113 (08)	106 (10)	76 (20)	70 (09)	80 (13)	-30
Triflumizol	0,99	3,0	10,0	99 (12)	95 (07)	95 (14)	90 (09)	102 (04)	74 (09)	77 (07)	78 (08)	-61
Vamidotiona	0,99	3,0	10,0	96 (18)	90 (09)	79 (12)	82 (08)	77 (18)	80 (18)	86 (13)	99 (12)	-59

4.4. AVALIAÇÃO DO MÉTODO SD-DLLME PARA EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS AGROTÓXICOS EM VINHO POR UHPLC-MS/MS

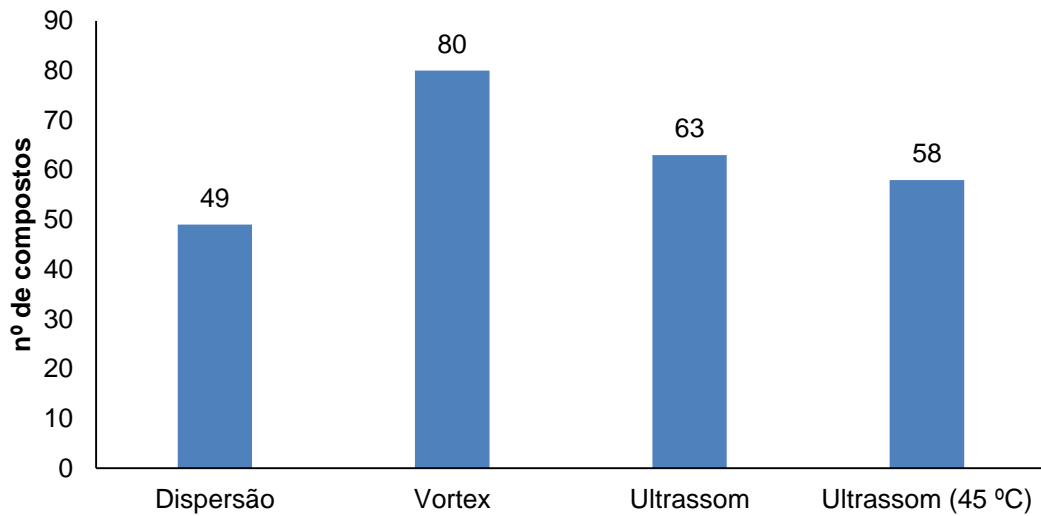
Como reportado anteriormente, o método QuEChERS possui inúmeras vantagens. A principal delas é a sua versatilidade que possibilita a extração de diferentes compostos em um mesmo procedimento. Porém, uma das desvantagens é a proporção utilizada de amostra:solvente (1:1), que não atribui fator de concentração ao método, levando a obtenção de valores de LOQ, muitas vezes, insuficientes para análise de resíduos. Neste trabalho, além do método QuEChERS, a técnica de microextração SD-DLLME foi avaliada. Procurou-se agregar as vantagens do método QuEChERS, em termos de método multirresíduo, com as vantagens das técnicas de microextração que estão baseadas na concentração dos compostos, sendo ideias para análise de resíduos.

Buscando encontrar as melhores condições para extração dos compostos selecionados, inicialmente uma avaliação de algumas modificações aplicadas a DLLME nos últimos anos foram avaliadas. Após encontrar a melhor configuração para a técnica, os principais parâmetros que influenciam na extração dos compostos (REZAEI *et al.*, 2006) foram avaliados e a discussão dos resultados será apresentada nos itens abaixo.

4.4.1 Avaliação do modo de agitação do método

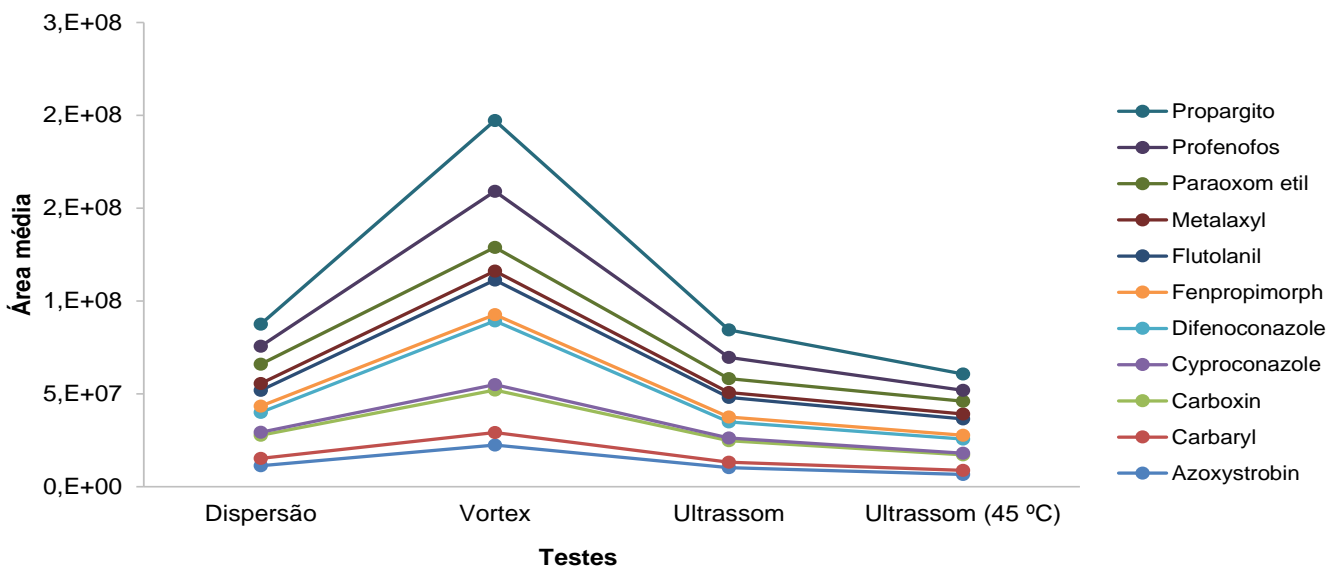
Originalmente os métodos de extração baseados na dispersão líquido-líquido não utilizavam etapas de agitação, uma vez que, o equilíbrio dos compostos entre as duas fases, amostra e fase extratora é estabelecido de maneira bastante rápida. Entretanto, nos últimos anos, diversos trabalhos reportaram a utilização de etapas de agitação com o auxílio de vortex e ultrassom demonstrando melhora na eficiência de extração dos compostos (AHMAD *et al.*, 2015). Neste trabalho, o procedimento original, onde somente o tempo de equilíbrio é utilizado, o uso de vortex, ultrassom e ultrassom com aplicação de temperatura foram avaliados. Os resultados obtidos demonstraram que a não utilização de nenhuma etapa de agitação após a dispersão dos solventes (extrator e dispersor) na amostra não proporcionou bons resultados de RSD% para a técnica. Isso pode ser observado no gráfico da Figura 14 onde está demonstrado o número de compostos com $RSD \leq 20\%$ ($n=3$) para os testes realizados.

Figura 14 - Número de compostos com RSD \leq 20% para os modos de agitação avaliados nesse trabalho no nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (n=6).



Muito embora a utilização de ultrassom com e sem temperatura tenha proporcionado uma melhora na repetitividade dos compostos, a utilização da agitação por vortex mostrou-se mais adequada para a maioria dos analitos. Além disso, alguns dos compostos que obtiveram resultados satisfatórios (RSD \leq 20%) para todos os testes foram comparados em termos de área cromatográfica. Os resultados desta comparação estão demonstrados na Figura 15 onde se observa novamente que a utilização do vortex na etapa de agitação apresentou melhor desempenho quando comparada aos outros testes, uma vez que maiores valores de área cromatográfica foram obtidos impactando nos limites do método.

Figura 15 - Comparação entre os tipos de agitação avaliados para alguns compostos que apresentaram RSD adequado (\leq 20%).



Diversos autores reportam o uso satisfatório de ultrassom em combinação com a DLLME visando a extração de compostos orgânicos em diferentes matrizes (Wang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012b; Gao *et al.*, 2012). Wang e colaboradores 2011 utilizou a técnica denominada UA-IL-DLLME e HPLC-DAD para extração de resíduos de 7 fungicidas em amostras de vinho com recuperações >70% e precisão satisfatória (RSD \leq 10%). Entretanto, Seebunrueng e colaboradores (2014) reportam certas dificuldades que podem ser encontradas com o uso de ultrassom como por exemplo, longo tempo para a separação de fases, falta de uniformidade na transmissão da irradiação e degradação de alguns compostos. A utilização de ultrassom e aquecimento proposta por Farajzadeh e colaboradores (2014) também foi avaliada. Neste trabalho, a temperatura de 45 °C juntamente com ultrassom (10 min) foi utilizada com o objetivo de melhorar a dispersão dos solventes na amostra. Após essa etapa a gota foi coletada. O teste não proporcionou uma melhora nos valores de RSD% e também se observou uma diminuição na área dos compostos. No trabalho realizado por Duarte e colaboradores (2016), o uso de ultrassom com temperatura foi otimizado para extração de agrotóxicos em água por USVADLLME e GC-MS e uma temperatura média de 45 °C foi utilizada para extração.

A utilização de vortex pode ser vantajosa em relação ao uso de ultrassom uma vez que, auxilia na dispersão do solvente de extração de forma mais homogênea e sem problemas de degradação (YIANTZI *et al.*, 2010). Além disso, o vórtice formado durante a agitação ajuda na redução do tamanho das gotículas formadas. Quanto menor as gotículas, maior a área interfacial entre a amostra e o solvente extrator e maior a eficiência de extração (ANDRUCH *et al.*, 2013). No presente trabalho, a utilização do vortex favoreceu a homogeneidade da gota formada refletindo em melhores valores de RSD para a técnica. Zacharis e colaboradores (2012) utilizou a técnica VADLLME para determinação de 12 organofosforados em amostras de água e vinho e determinação por GC-MS. O tempo de agitação avaliado no vortex foi de 1 minuto e uma etapa de centrifugação foi realizada após a agitação. No presente trabalho, a agitação com vortex durante 1 minuto foi escolhida para utilização nos demais testes realizados para o estudo da técnica.

4.4.2 Seleção do solvente extrator e dispersor

Os solventes avaliados nesse trabalho para a etapa de extração foram 1-heptanol, 1-octanol e 1-decanol. Acetonitrila, metanol e acetona foram avaliados como solventes de

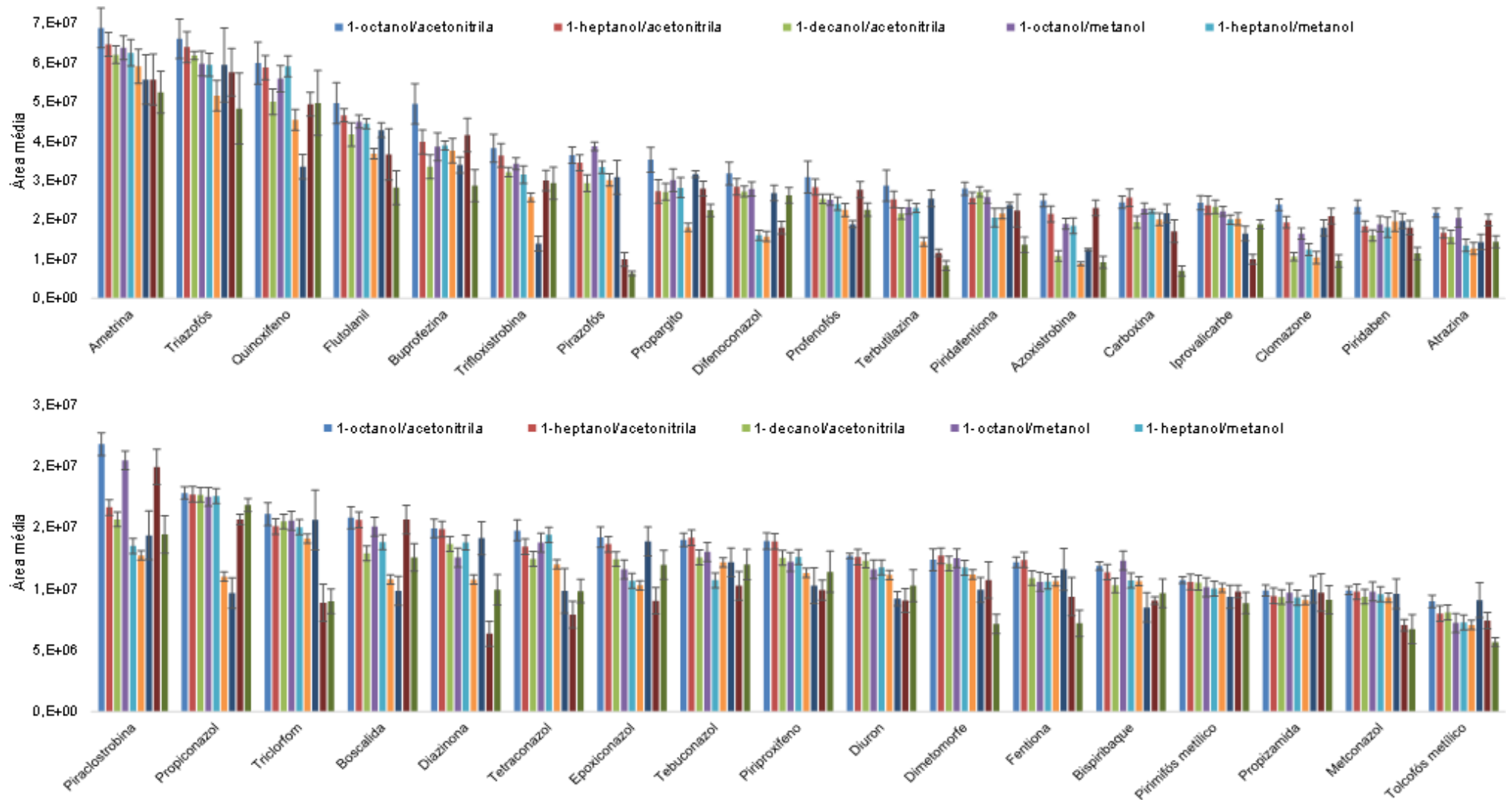
dispersão. Os solventes de extração e dispersão estudados nesse trabalho são amplamente utilizados em técnicas de microextração em fase líquida (BOLAÑOS *et al.*, 2008).

As extrações foram realizadas utilizando, 10 mL de amostra 500 μL do solvente de dispersão, 100 μL do solvente de extração e 500 μL de acetonitrila como demulsificante. A amostra de vinho correspondente ao branco analítico foi fortificada na concentração de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e os ensaios foram realizados em replicatas ($n=6$).

A combinação entre todos os solventes foi avaliada e os resultados estão expressos no gráfico da Figura 16. Para melhor apresentação dos resultados, foram escolhidos alguns compostos representativos das diferentes classes químicas dos analitos avaliados, uma vez que, o comportamento se manteve semelhante para os demais compostos. No Apêndice A, encontram-se os resultados para os demais compostos avaliados neste experimento. Neste estudo, o uso do 1-octanol em combinação com acetonitrila resultou na obtenção das maiores áreas para a maioria dos compostos selecionados. Dos 104 compostos avaliados no método, 80 foram extraídos. Entre os compostos que apresentaram baixa eficiência de extração estão carbofurano-3-hidróxido, clotianidina, monocrotofós, oxamil, tiametoxam, imidacloprido, mevinfós e triclorfom. Conforme a Tabela 3 esses compostos possuem um valor de log de Kow < 1. Essa característica faz com que a determinação desses compostos por SD-DLLME seja dificultada uma vez que, quando maior o valor de log kow maior a tendência a migrar para a fase orgânica, favorecendo a extração dos 80 compostos extraídos, 54 apresentaram maiores áreas quando a mistura 1-octanol e acetonitrila foi utilizada. Isso corresponde a 68% dos compostos avaliados, entre eles citam-se, flutalonil, buprofezina e propargito (Figura 16). Entre os demais compostos, 8 obtiveram valores de maior área quando a combinação entre 1-heptanol e acetonitrila foi empregada como é o caso dos compostos carboxina, carbofurano, epoxiconazol, etc. Além destes, 5 compostos apresentaram valores de área maiores quando utilizado 1-octanol e metanol, caso da fentiona e pirazofós.

Neste trabalho, a semelhança nas áreas obtidas para a maioria dos compostos explica-se em função da semelhança nas polaridades dos solventes utilizados para extração dos mesmos (Tabela 7). Por exemplo, ao analisarmos os compostos ametrina e difenoconazol, pode-se concluir que tanto a combinação 1-octanol e acetonitrila quanto 1-heptanol e acetonitrila poderiam ser utilizadas. Bem como, para a buprofezina, tanto 1-octanol e acetonitrila quanto 1-heptanol e acetona. E ainda, para o composto diuron, 7 diferentes combinações de solventes poderiam ser utilizadas uma vez que a variação nas áreas não foi significativa.

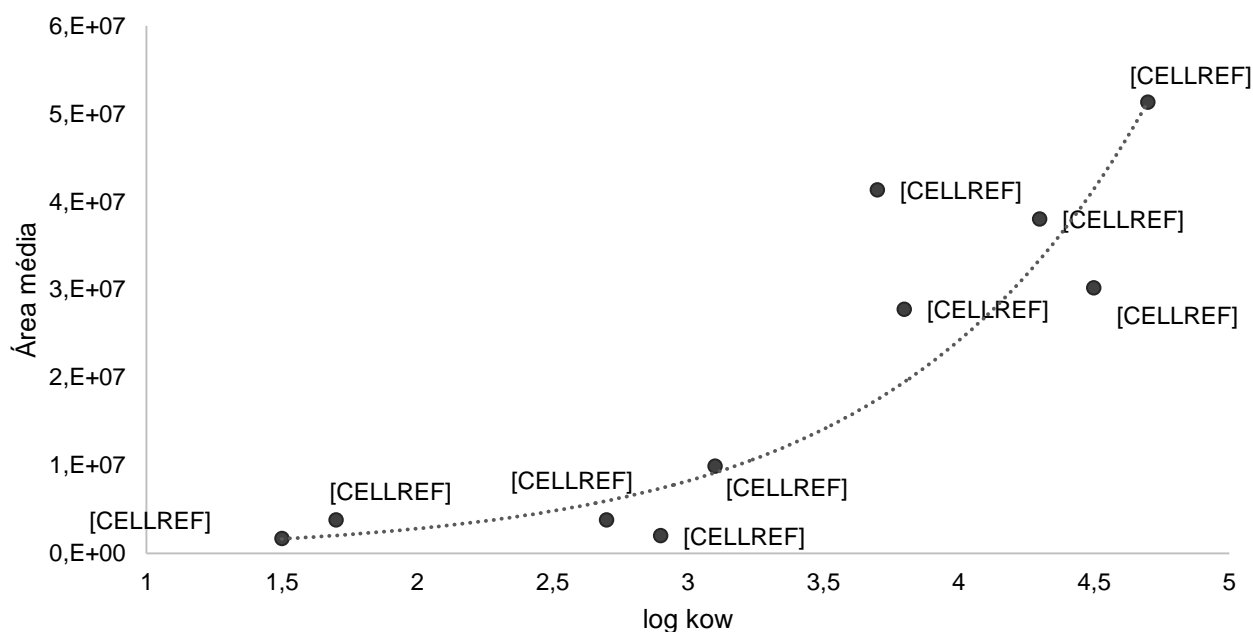
Figura 16 - Área média obtida por UHPLC-MS/MS para alguns compostos avaliados mediante a combinação dos solventes de extração (100 μL) e dispersão (500 μL) no nível de fortificação de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n=6).



De maneira geral, maiores valores de área foram obtidos quando foi utilizado o 1-octanol em comparação aos demais solventes extratores (heptanol e decanol). Quando o 1-octanol foi utilizado em combinação com acetona, menor eficiência de extração foi observada para os compostos pirimetanil, tiacloprido e fenpropatrina. CHU *et al.*, (2015) realizaram a comparação entre os solventes 1-heptanol, 1-octanol e 1-nonanol para a extração de 6 fungicidas em amostras de vinho. Os resultados foram avaliados em termos de área dos compostos e foram semelhantes para os solventes utilizados, porém o 1-octanol foi o escolhido.

Normalmente, quando o solvente de extração empregado na DLLME possui menor densidade que a água, estes apresentam baixa polaridade. Nesses casos, os compostos que possuem maiores valores de log kow tendem a uma maior afinidade pelo solvente extrator e assim haverá uma melhor resposta cromatográfica. Neste trabalho, essa tendência foi observada e pode ser vista através da Figura 17 para alguns compostos selecionados.

Figura 17 - Relação existente entre a área e o valor do log de Kow para alguns compostos selecionados independente da combinação de solventes utilizados.



Além do solvente extrator, o solvente de dispersão também exerce influência na eficiência de extração. Este solvente deve ser miscível tanto na fase aquosa quanto na fase orgânica com o objetivo de garantir a formação de uma solução turva que aumenta a área de contato entre as duas fases, facilitando a extração (KOCÚROVÁ *et al.*, 2012).

Neste trabalho acetona, metanol e acetonitrila foram avaliados uma vez que, estes solventes vêm sendo aplicados com sucesso na DLLME para determinação de resíduos de agrotóxicos em vinho (WU *et al.*, 2010; RODRIGUEZ-CABO *et al.*, 2011, CHU *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2017).

A acetona apresentou o menor desempenho se comparada ao metanol e acetonitrila. Os motivos para esse baixo desempenho podem estar relacionados ao baixo ponto de ebulição da acetona, que através de um processo de evaporação pode ter ocasionado uma diminuição na área de contato entre as duas fases na etapa de dispersão. Neste trabalho, optou-se pela utilização da combinação que proporcionou a maior área para a maioria dos compostos, sendo essa 1-octanol como solvente de extração e acetonitrila como solvente de dispersão.

4.4.3 Avaliação do volume de solvente extrator

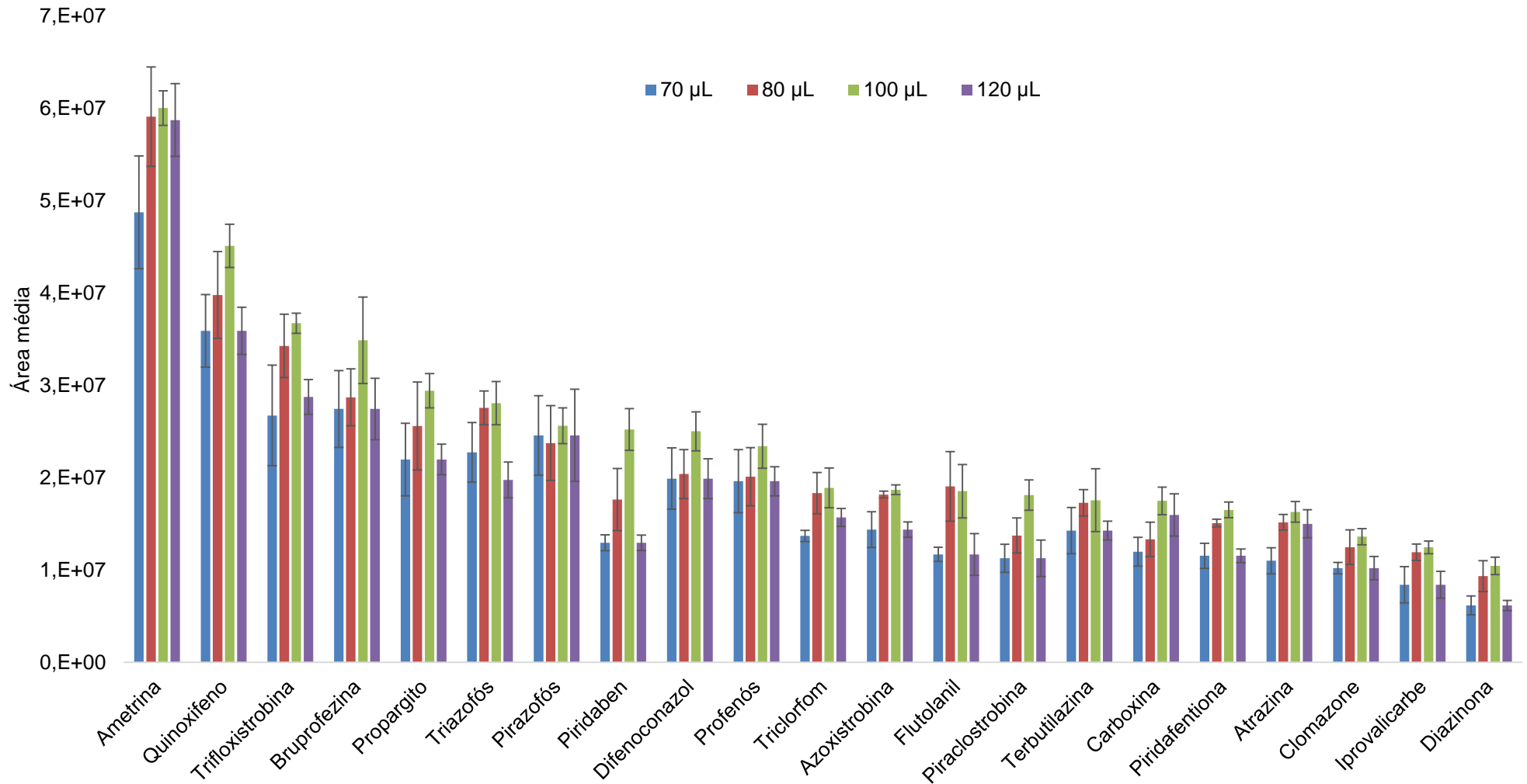
Nas microextrações com solventes menos densos que a água, volumes de solventes extratores entre 8 e 145 μL vem sendo utilizados para extração de compostos orgânicos em diferentes matrizes (LIU *et al.*, 2010; FATEMI *et al.*, 2012). Essa avaliação normalmente é realizada fixando-se um dos volumes, por exemplo, o do solvente de dispersão para avaliar a influência da variação do volume do solvente extrator na área dos compostos e vice-versa (CALDAS *et al.*, 2016). Os volumes de solvente extrator avaliados neste trabalho foram de 70, 80, 100 e 120 μL e as extrações foram realizadas utilizando 10 mL de amostra, 500 μL do solvente dispersor e 500 μL de acetonitrila como demulsificante. A amostra correspondente ao branco analítico foi fortificada na concentração de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e os ensaios foram realizados em replicatas (n=6). Os resultados estão apresentados no gráfico da Figura 18. Para melhor apresentação dos resultados, foram escolhidos alguns compostos representativos das diferentes classes químicas dos analitos avaliados, uma vez que, o comportamento se manteve semelhante para os demais compostos. No Apêndice B, encontram-se os resultados para os demais compostos avaliados neste experimento.

De acordo com Rodriguez-Cabo *et al.*, (2011) a redução no volume do solvente de extração pode originar maiores fatores de concentração e assim, proporcionar um incremento de sinal cromatográfico o que proporciona menor limite de detecção ao método. Porém, também é necessário um volume mínimo de solvente para que a extração ocorra de maneira eficiente. No trabalho realizado por Zacharis e colaboradores

(2012) o fator de enriquecimento do método USVADLLME aumentou linearmente com a redução do volume de tolueno, utilizado como solvente extrator. Os autores escolheram um volume de 40 μL respeitando o compromisso entre maior fator de enriquecimento e facilidade de recuperação da gota. Ainda, um corante foi utilizado para melhor visualização da fase flutuante.

De acordo com a Figura 18, verificou-se que a utilização de volumes menores como é caso dos volumes de 70 μL e 80 μL não refletiram em maiores valores de área para a maioria dos compostos. Entretanto, um aumento da área cromatográfica pode ser observado quando o volume de 100 μL foi empregado. Além disso, quando o volume de 120 μL foi empregado foi possível verificar que, para a maioria dos compostos, ocorreu uma redução nas áreas. O aumento de volume do solvente extrator pode levar a uma melhor eficiência da extração. Por outro lado, o volume de gota também aumenta o que leva a extratos mais diluídos e, assim, diminuindo o fator de concentração e por consequência, os valores de área (CHEN *et al.*, 2016). Com base nos resultados obtidos, o volume de 100 μL de 1-octanol foi escolhido para dar prosseguimento ao trabalho.

Figura 18 – Área média obtida por UHPLC-MS/MS para alguns compostos durante a avaliação do volume de solvente extrator utilizando 1-octanol e 500 μL de acetonitrila como dispersor no nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n=6$).



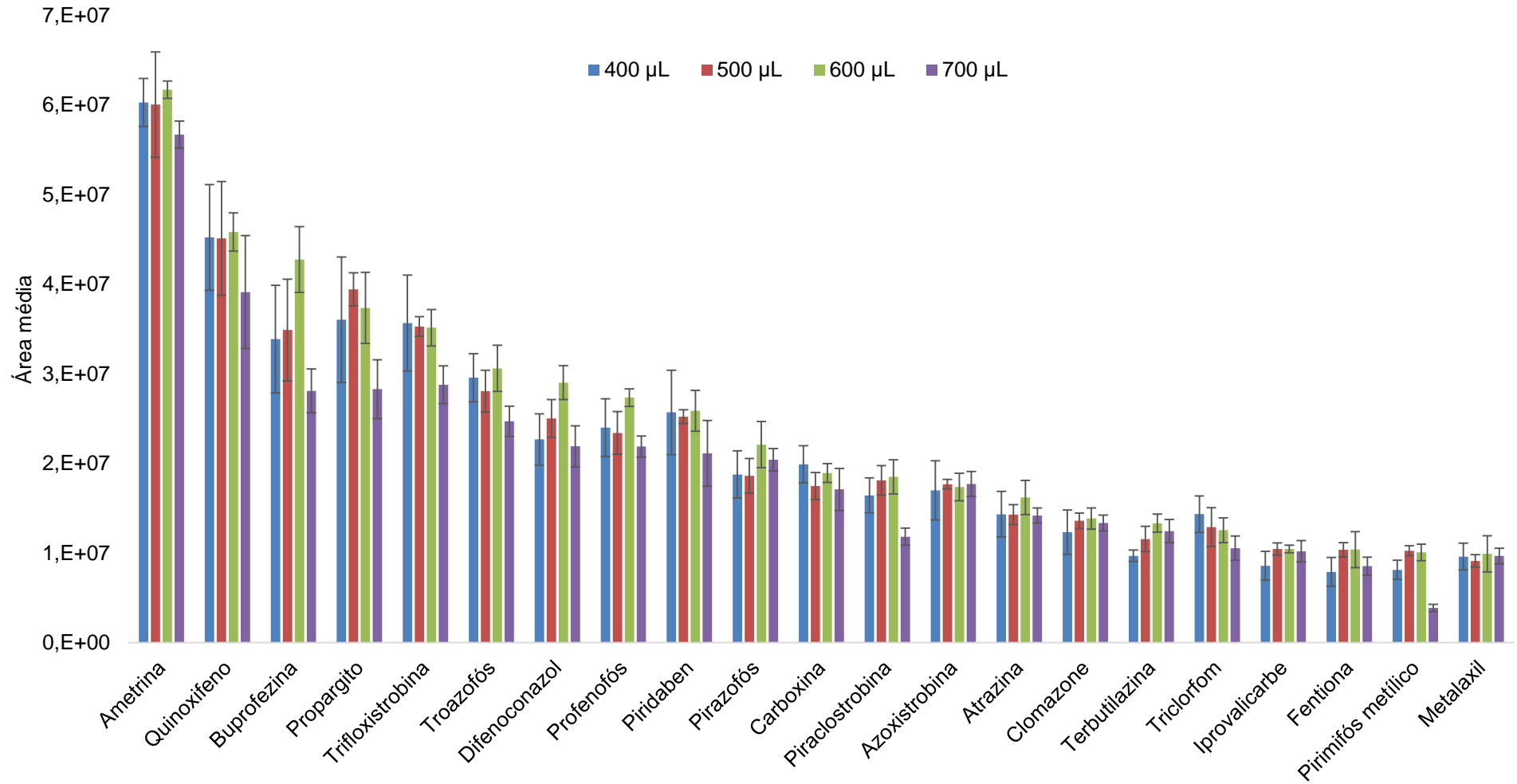
4.4.4 Avaliação do volume de solvente dispersor

Os volumes de solvente dispersor mais empregados nas técnicas de DLLME tem sido entre 400 e 750 μL (CHEN *et al.*, 2010; SEEBUNRUENG *et al.*, 2014). Neste trabalho, foram avaliados os volumes de 400, 500, 600 e 700 μL e as extrações foram realizadas utilizando 10 mL de amostra, 100 μL do solvente de extração e 500 μL de acetonitrila como demulsificante. A amostra correspondente ao branco analítico foi fortificada na concentração de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e os ensaios foram realizados em replicatas (n=6). Os resultados obtidos em termos de área para os compostos estão apresentados na Figura 19. Para melhor apresentação dos resultados, foram escolhidos alguns compostos representativos das diferentes classes químicas dos analitos avaliados, uma vez que, o comportamento se manteve semelhante para os demais compostos. No Apêndice C, encontram-se os resultados para os demais compostos avaliados neste experimento.

Através dessa avaliação, percebeu-se que a utilização do volume de 600 resultou em melhores resultados para a maioria dos compostos. Dos 80 compostos avaliados, 44 ou seja 55% dos compostos, apresentaram aumento da área cromatográfica em relação à utilização de outros volumes. Entre os compostos que não seguiram este comportamento estão, porpargito e trifloxistrobina, que obtiveram maiores valores de área quando os volumes de 500 e 400 μL foram utilizados, respectivamente (Figura 19). Entretanto, a diferença nas áreas não foi significativa o que indica que o volume de 600 μL poderia ser utilizado para esses compostos. Além disso, pode-se observar que quando o volume de solvente utilizado foi de 700 μL ocorreu uma redução na área dos compostos. Por exemplo, o composto piraclostrobina, teve uma redução significativa na área do pico cromatográfico quando o volume de 700 μL foi utilizado.

Pequenos volumes de solvente dispersor acarretam em uma pequena área de contato entre o solvente extrator e a amostra, desfavorecendo a formação da solução turva. Enquanto que, volumes muito altos, podem acarretar no aumento da solubilidade de alguns analitos, diminuindo a distribuição deles no solvente extrator, e conseqüentemente acarretando em uma menor eficiência de extração (SEEBUNRUENG *et al.*, 2014).

Figura 19 - Área média obtida por UHPLC-MS/MS para alguns compostos durante a avaliação do volume de solvente dispersor utilizando acetonitrila e 100 μL 1-octanol como extrator no nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (n=6).



4.4.5 Influência da variação de pH da amostra

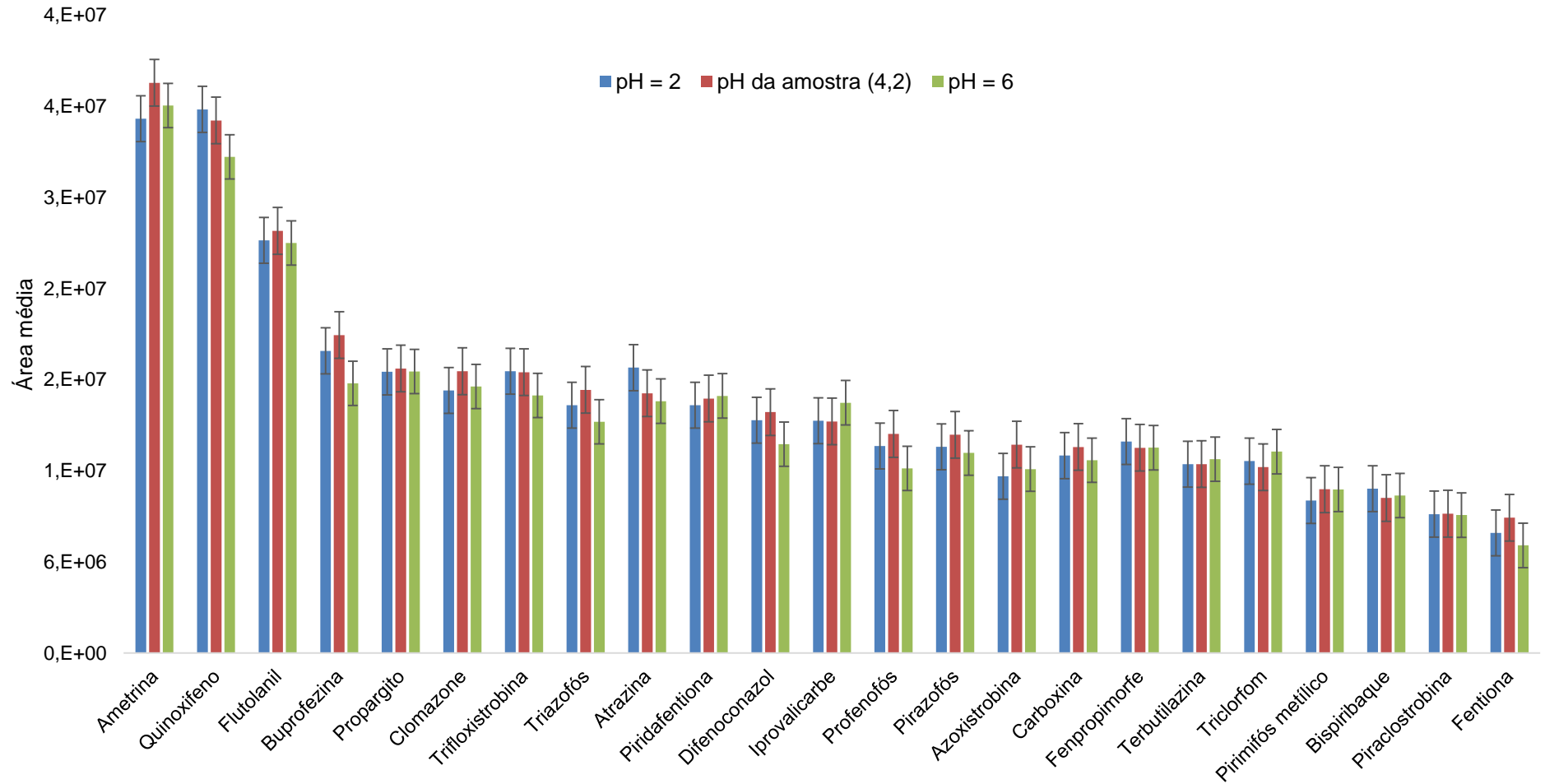
O pH da amostra é um parâmetro essencial porque afeta tanto a eficiência da extração como a seletividade da DLLME (CHEN *et al.*, 2010). Usando como exemplo analitos básicos, é necessário manter o pH da amostra acima do valor de pKa do analito, para que eles fiquem na forma não ionizada, aumentando assim, a tendência de serem extraídos pelo solvente extrator (MOREIRA *et al.*, 2013). Neste trabalho, a maioria dos compostos não possui valores de pKa, ou seja, são analitos não dissociáveis. Em teoria, o efeito do pH sobre esses compostos não é considerado significativo. Entretanto, como as amostras de vinho podem possuir diferentes valores de pH, optou-se por avaliar o efeito desse parâmetro na eficiência de extração dos compostos.

Considerando o pH da amostra de vinho utilizada como branco que foi de 4,2, fez-se uma acidificação da mesma com solução de HCl para um pH inferior de 2,0. Além disso, um pH acima do valor da amostra também foi avaliado com a adição de NaOH, atingindo um valor de pH de 6,0. Os resultados estão demonstrados na Figura 20. Para melhor apresentação dos resultados, foram escolhidos alguns compostos representativos das diferentes classes químicas dos analitos avaliados, uma vez que, o comportamento se manteve semelhante para os demais compostos. No Apêndice D, encontram-se os resultados para os demais compostos avaliados neste experimento.

Pode-se observar que a variação no pH não alterou os valores de áreas de maneira significativa para a maioria dos compostos. Entretanto, para alguns agrotóxicos como, atrazina (pKa 1,60), diazinona (pKa 2,60) e metsulfurom metílico (pKa 3,30) houve um incremento de área quando utilizado o pH 2. Assim como, observou-se um aumento de área para os compostos linuron (pKa 12,1), tiofanato metílico (pKa 7,38) e metconazol (pKa 11,38) quando pH foi ajustado para 6.

CHEN e colaboradores (2016) avaliaram diferentes valores de pH para extração de 27 agrotóxicos em vinho por DLLME e determinação por GC-MS. Os resultados encontrados indicaram que o pH não exerceu influência na área dos compostos. Tendo em vista os resultados obtidos, e levando em consideração a busca por um método multirresíduo, optou-se pela utilização do pH inicial da amostra, sem qualquer ajuste, para extração dos agrotóxicos selecionados em vinho.

Figura 20 - Área média obtida por UHPLC-MS/MS para alguns compostos durante a avaliação do pH da amostra na eficiência de extração utilizando 600 μL de acetonitrila como dispersor e 100 μL 1-octanol como extrator no nível de fortificação de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n=6).



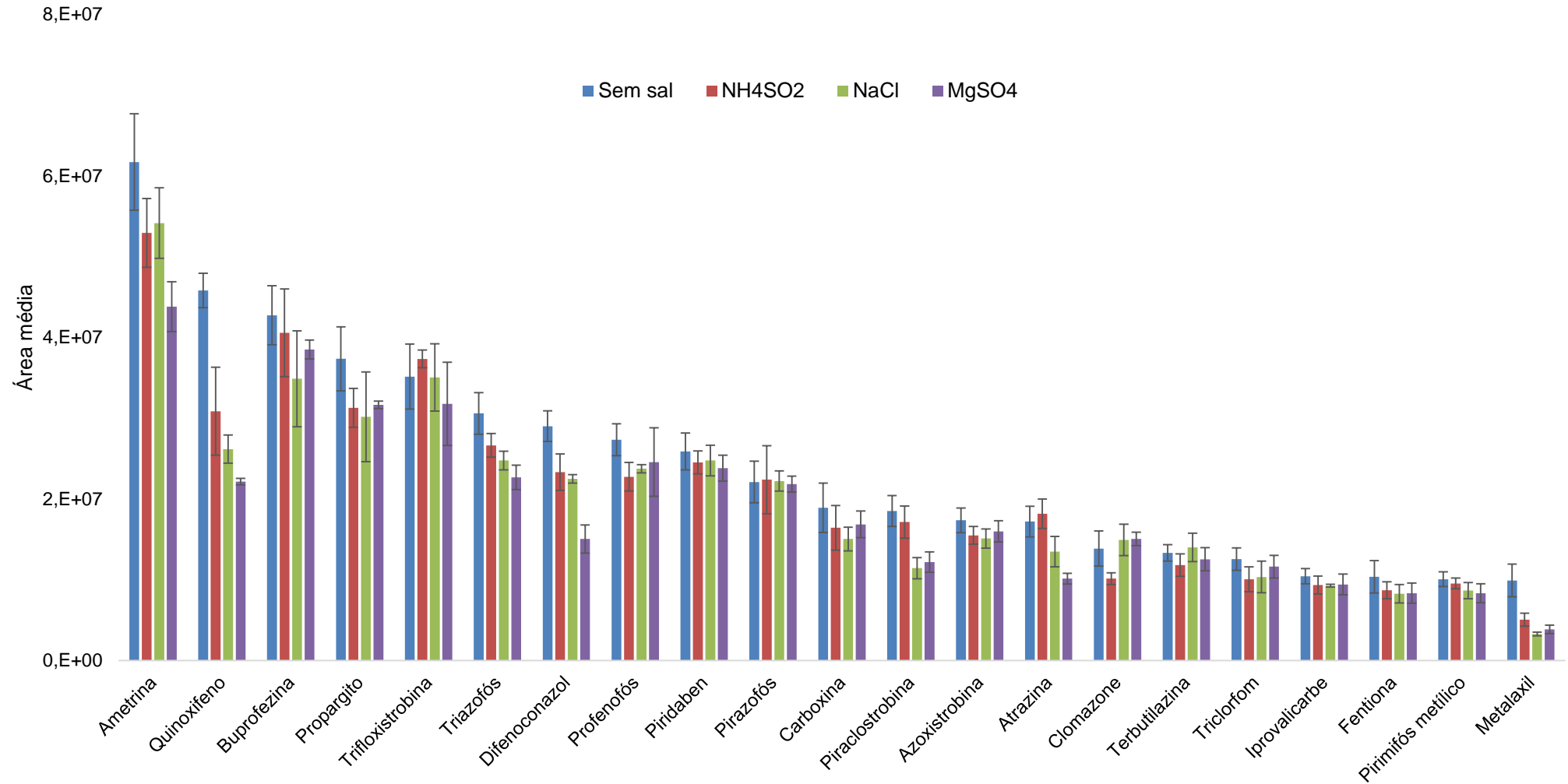
4.4.6 Adição de sal

Geralmente, nas técnicas de DLLME, a adição de sal é avaliada empregando-se NaCl em concentrações que variam de 0,5 a 30%. Nas técnicas de equilíbrio onde a extração dos compostos é baseada na partição entre uma fase aquosa e uma fase orgânica, a adição de sal pode aumentar a eficiência de extração dos compostos pela fase orgânica. Isso ocorre, por que quando o sal é adicionado à solução, as moléculas de água formam uma esfera de hidratação ao redor da molécula iônica de sal. Devido isso, ocorre uma redução na quantidade de água disponível para dissolver os analitos favorecendo assim, a extração dos mesmos pela fase orgânica. A esse efeito dá-se o nome de efeito *salting out* o qual é observado, preferencialmente para analitos com alta polaridade (MOREIRA *et al.*, 2013). Grande parte dos trabalhos existentes na literatura utilizam apenas o NaCl na investigação do efeito da adição de sal na extração. Neste trabalho, 3 diferentes sais sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cloreto de sódio (NaCl) e sulfato de magnésio (MgSO_4) foram estudados na proporção de 10% de adição com base em trabalhos anteriores (GURE *et al.*, 2015). Os resultados estão apresentados no gráfico da Figura 21. Para melhor apresentação dos resultados, foram escolhidos alguns compostos representativos das diferentes classes químicas dos analitos avaliados, uma vez que, o comportamento se manteve semelhante para os demais compostos. No Apêndice E, encontram-se os resultados para os demais compostos avaliados neste experimento.

Pode-se observar que para a maioria dos compostos a adição de sal não proporcionou melhora nos valores de área em relação ao teste na ausência de sal. Observou-se também, que a utilização de MgSO_4 levou a uma redução na área de alguns compostos como por exemplo, difenoconazole e atrazina entre outros. Esta redução pode estar relacionada a baixa solubilidade observada do MgSO_4 no vinho.

Para extração de agrotóxicos em amostras de vinho, a maioria dos trabalhos existentes que utilizam DLLME, avaliam apenas o efeito da adição de NaCl em diferentes proporções à amostra. Entretanto, dentre os trabalhos existentes é comum a não utilização de sal para realização da extração (RODRIGUEZ-CABO *et al.*, 2011, CHEN *et al.*, 2016). YOU *et al.*, 2013 realizaram a extração simultânea de 6 fungicidas em suco e vinho tinto utilizando a técnica UASEME-SFO. Neste trabalho, os autores avaliaram a adição de NaCl (0-20%) e não foi evidenciado melhora nas áreas em relação a não utilização de sal. Tendo em vista os resultados obtidos e pensando também na simplificação do processo de extração, a condição sem a utilização de sal foi a escolhida para extração dos compostos.

Figura 21 - Área média obtida por UHPLC-MS/MS para alguns compostos na avaliação de diferentes sais na eficiência de extração utilizando 600 μL de acetonitrila como dispersor e 100 μL 1-octanol como extrator no nível de fortificação de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (n= 6).



4.5 CONDIÇÕES DA SD-DLLME AVALIADA

A partir dos testes realizados e conforme os resultados apresentados chegou-se ao melhor procedimento de extração encontrado nesse trabalho, para determinação multirresíduo de agrotóxicos em vinho por SD-DLLME. O procedimento consiste no emprego de 10 mL de amostra, sem ajuste de pH e sem adição de sal. Após, foram adicionados ao balão a mistura contendo 100 μ L de 1-octanol como solvente extrator e 600 μ L de acetonitrila como solvente dispersor. Após agitação em vortex por 1 minuto e formação da solução turva, 500 μ L de acetonitrila foram adicionados para quebra da emulsão e melhor separação das fases. Após, a gota contendo 1-octanol ficou na região superior do balão e foi retirada com o auxílio de uma seringa. A gota foi colocada em um vial de 2 mL e o volume foi ajustado a 250 μ L com água ultrapura e acetonitrila (50 μ L de água + 150 de acetonitrila). Os extratos foram injetados no UHPLC-MS/MS.

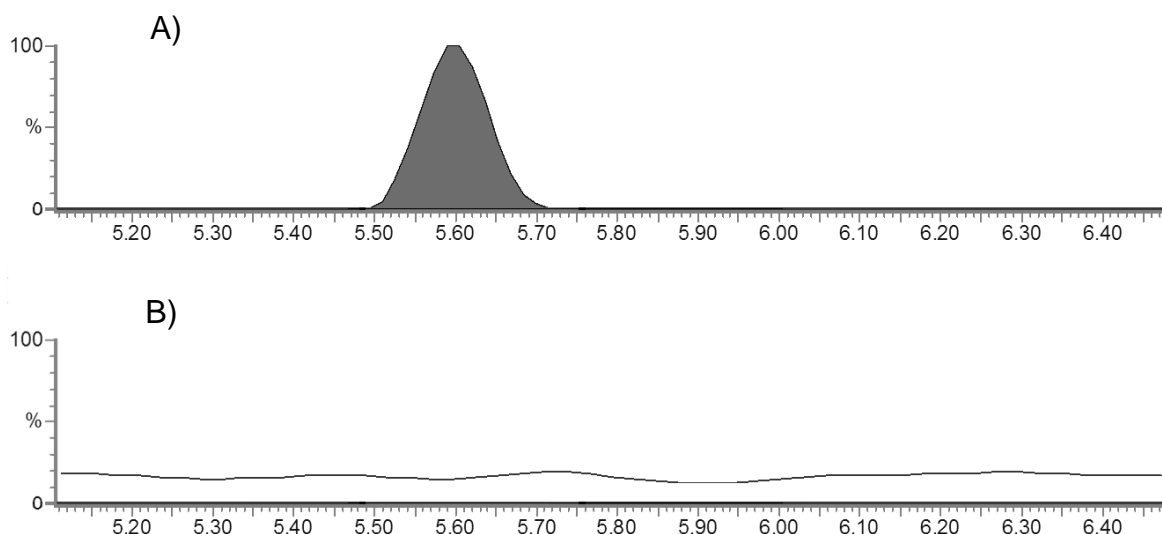
4.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO SD-DLLME PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE VINHO

A validação do método SD-DLLME foi realizada utilizando o sistema UHPLC-MS/MS nas condições descritas no item 3.8. Todas as soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz (vinho) obtidos a partir das amostras “branco”. Dessa maneira, foi possível avaliar os parâmetros de validação de métodos cromatográficos e os resultados estão apresentados na Tabela 11 para os 74 compostos validados.

4.6.1 Seletividade e linearidade

A seletividade 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, a amostra avaliada para confecção da curva analítica e ensaios de fortificação (Figura 22).

Figura 22 - A) Composto dimetomorfe e B) branco de vinho extraídos pela SD-DLLME



A linearidade do método proposto foi avaliada pela aplicação da regressão linear aos pontos da curva analítica e obtenção do coeficiente de determinação (r^2). A faixa linear do método foi de 0,1 a 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, com $r^2 \geq 0,990$ para a maioria dos compostos, exceto para boscalida, carboxina, fenpropatrina, flutolanil e imazalil que obtiveram $r^2 \geq 0,98$.

4.6.2 Limites de detecção e quantificação

Em relação a SD-DLLME o LOQ variou de 0,1 a 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ enquanto que o LOD de 0,03 a 0,06 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 11). Os valores obtidos demonstram estar adequados se comparados aos trabalhos de Rodríguez-Cabo e colaboradores (2011), Cinelli e colaboradores (2014) e Gure e colaboradores (2015).

Não havendo legislação vigente que estabeleça valores de LMR para amostras de vinho, os limites encontrados foram comparados aos estabelecidos para uva (ANVISA, 2015) sendo que os valores atendem a legislação estabelecida.

4.6.3 Exatidão, Precisão e Precisão Intermediária

A exatidão do método foi avaliada em termos de recuperação dos compostos nos níveis de fortificação de 0,1, 0,2, 0,5 e 1,0 para a SD-DLLME. Os resultados estão demonstrados na Tabela 12. Analisando os valores é possível observar a precisão do

método uma vez que, os valores de RSD_r estão $\leq 20\%$ (SANTE, 2015). Para a SD-DLLME, alguns compostos não apresentaram recuperação satisfatória no nível de fortificação de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e por isso, tiveram seus valores de LOQ_m estabelecidos em $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 12). Dentre esses compostos estão, carboxina, dimetoato, fenpropimorfe e flutolanil. Na avaliação da precisão intermediária os valores de recuperação mantiveram-se na faixa de 70 a 120% para a maioria dos compostos, exceto aqueles que não haviam recuperado na avaliação da repetitividade. Uma boa precisão pode ser observada, com valores de RSD_{pi} $\leq 20\%$.

4.6.4 Efeito Matriz

Conforme discutido no item 4.3.4 o efeito matriz é um parâmetro de extrema importância na etapa de validação de um método. Sendo assim esse parâmetro foi calculado também para o método SD-DLLME conforme descrito no item 3.8 da seção Material e Métodos. Os valores de EM calculados para o método SD-DLLME estão apresentados na Tabela 11. Pode-se observar que, para a maioria dos compostos, os valores encontrados foram negativos. Os resultados encontrados estão de acordo com o trabalho realizado por Caldas *et al.*, 2016, onde os valores de EM calculados para o método SD-DLLME foram em sua maioria negativos, indicando a existência de supressão do sinal cromatográfico.

De acordo com a Figura 23, para a maioria dos compostos validados, os valores encontrados foram entre -20 e -40%. Além disso, o maior valor foi calculado para o composto profenofós (-78%).

Como discutido anteriormente, a construção da curva analítica no extrato da matriz e a diluição dos extratos vêm sendo amplamente utilizadas para assegurar confiabilidade dos resultados de quantificação quando se tem a existência do EM (KRUIVE *et al.*, 2008; FERRER *et al.*, 2011). Sendo assim, tendo em vista os resultados obtidos de EM e para atenuar esse problema, as curvas analíticas utilizadas para quantificação dos compostos por SD-DLLME foram extraídas levando em consideração o efeito da matriz sobre a análise cromatográfica.

Figura 23 - Efeito matriz para os compostos extraídos SD-DLLME.

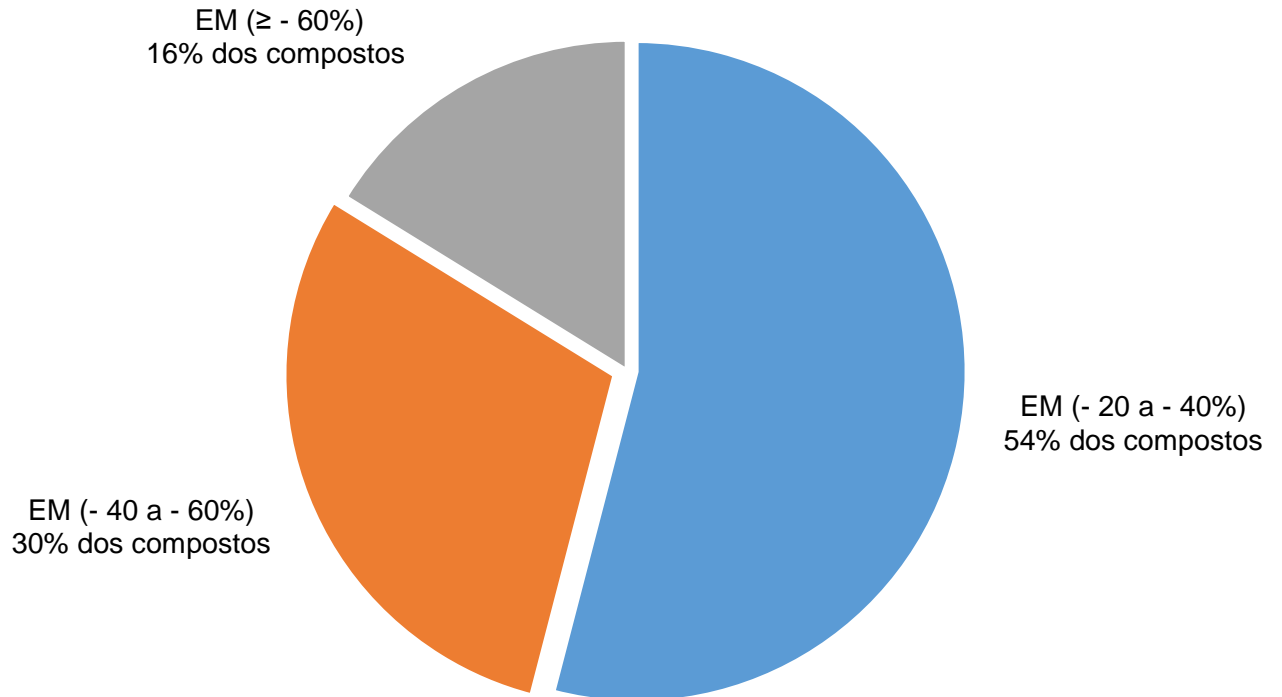


Tabela 11 - Resultados obtidos na etapa de validação do método SD-DLLME para os parâmetros de validação LOQ, LOD, exatidão, precisão, precisão intermediária e efeito matriz. continua

Compostos	r ²	LOD (µg L ⁻¹)	LOQ (µg L ⁻¹)	Exatidão, Recuperação % (Precisão, RSDr %)				Precisão Inter., Recuperação % (Precisão, RSDip %)				EM
				0,1	0,2	0,5	1,0	0,1	0,2	0,5	1,0	
				(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	
Ametina	0,99	0,03	0,1	104 (10)	101 (18)	96 (20)	105 (08)	104 (16)	108 (01)	103 (06)	102 (03)	-53
Atrazina	1,00	0,03	0,1	116 (20)	120 (12)	120 (20)	119 (08)	86 (20)	78 (13)	115 (14)	120 (10)	-45
Azinfós metílico	1,00	0,03	0,1	73 (12)	102 (02)	101 (15)	103 (14)	73 (12)	105 (02)	99 (07)	97 (03)	-59
Azoxistrobina	0,99	0,03	0,1	71 (14)	107 (13)	96 (20)	109 (10)	71 (13)	107 (03)	106 (09)	96 (07)	-48
Bispiribaque	0,99	0,03	0,1	105 (17)	80 (20)	91 (10)	77 (18)	101 (17)	120 (10)	100 (16)	71 (11)	-31
Boscalida	0,98	0,03	0,1	92 (20)	94 (12)	80 (10)	82 (20)	72 (11)	101 (11)	91 (05)	88 (01)	-35
Buprofezina	0,99	0,03	0,1	103 (15)	106 (16)	101 (18)	104 (20)	121 (21)	109 (07)	120 (10)	84 (06)	-31
Carbaril	0,99	0,03	0,1	85 (13)	102 (21)	94 (20)	111 (11)	85 (11)	112 (02)	98 (16)	120 (04)	-68
Carbendazim	0,99	0,03	0,1	88 (10)	85 (10)	73 (12)	74 (18)	78 (10)	86 (09)	75 (14)	86 (14)	-31
Carbofuran	0,99	0,03	0,1	79 (13)	76 (18)	75 (16)	73 (17)	79 (20)	111 (03)	93 (20)	110 (01)	-60
Carboxina	0,98	0,06	0,2	68 (10)	90 (02)	78 (07)	91 (20)	63 (15)	108 (10)	91 (13)	114 (02)	-31
Chlorpirifós	0,99	0,03	0,1	101 (12)	108 (20)	108 (14)	104 (20)	91 (11)	99 (05)	120 (17)	73 (14)	-22
Chlorpirifós-metílico	0,99	0,03	0,1	75 (10)	121 (07)	108 (12)	109 (09)	95 (19)	109 (05)	102 (17)	71 (20)	-39
Clomazone	1,00	0,03	0,1	95 (20)	71 (10)	79 (10)	110 (12)	95 (11)	86 (03)	96 (10)	105 (04)	-58
Clorimurom etilílico	0,99	0,03	0,1	97 (07)	99 (09)	71 (18)	103 (17)	77 (11)	106 (04)	94 (11)	97 (10)	-67
Cianazina	0,99	0,03	0,1	93 (13)	81 (08)	110 (20)	93 (10)	83 (15)	95 (02)	120 (18)	112 (04)	-52
Ciproconazol	1,00	0,03	0,1	95 (20)	89 (01)	71 (07)	103 (12)	85 (16)	106 (05)	87 (20)	106 (03)	-39
Diazinona	0,99	0,03	0,1	89 (20)	70 (10)	91 (08)	98 (20)	89 (15)	113 (04)	102 (09)	104 (02)	-28
Diclofluanida	1,00	0,03	0,1	89 (15)	82 (02)	86 (12)	82 (12)	79 (12)	82 (15)	86 (13)	80 (14)	-20
Difenoconazol	0,99	0,03	0,1	94 (07)	95 (20)	95 (03)	93 (18)	74 (11)	115 (06)	108 (20)	103 (06)	-35
Dimetoato	0,99	0,06	0,2	65 (20)	92 (14)	98 (20)	76 (20)	67 (14)	121 (17)	116 (07)	114 (04)	-38
Dimetomorfe	1,00	0,03	0,1	88 (07)	78 (20)	77 (05)	78 (08)	78 (12)	118 (04)	97 (17)	99 (07)	-65
Diuron	0,99	0,03	0,1	90 (20)	86 (09)	102 (18)	104 (08)	70 (14)	72 (01)	102 (11)	106 (05)	-25
Epoxiconazol	0,99	0,03	0,1	89 (10)	80 (20)	82 (10)	76 (18)	79 (09)	93 (09)	84 (19)	120 (12)	-25
Famoxadona	0,99	0,03	0,1	94 (21)	81 (20)	97 (11)	105 (12)	84 (14)	76 (13)	73 (13)	88 (21)	-60

continuação

Compostos	r ²	LOD (µg L ⁻¹)	LOQ (µg L ⁻¹)	Exatidão, Recuperação % (Precisão, RSDr %)				Precisão Inter., Recuperação % (Precisão, RSDip %)				EM
				0,1	0,2	0,5	1,0	0,1	0,2	0,5	1,0	
				(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	
Fenarimol	0,99	0,03	0,1	88 (10)	76 (20)	78 (11)	72 (11)	88 (19)	108 (11)	73 (20)	76 (13)	-48
Fenpropatrina	0,98	0,06	0,2	77 (08)	120 (13)	100 (14)	107 (21)	80 (19)	109 (05)	101 (19)	90 (07)	-37
Fenpropimorfe	1,00	0,06	0,2	56 (20)	85 (15)	85 (11)	108 (20)	66 (20)	99 (06)	98 (15)	101 (19)	-39
Fentiona	0,99	0,03	0,1	91 (16)	104 (10)	107 (17)	109 (20)	91 (11)	111 (02)	104 (16)	105 (11)	-68
Fipronil	0,99	0,03	0,1	76 (01)	88 (01)	96 (20)	96 (08)	76 (11)	88 (06)	107 (07)	77 (09)	-30
Fluquiconazol	0,99	0,03	0,1	97 (10)	86 (20)	103 (20)	86 (20)	97 (15)	111 (06)	103 (16)	90 (08)	-31
Flutolanil	0,98	0,06	0,2	46 (08)	79 (18)	97 (20)	91 (08)	60 (08)	105 (02)	97 (17)	94 (06)	-51
Imazalil	0,99	0,03	0,1	82 (13)	86 (14)	78 (18)	87 (13)	92 (13)	80 (21)	88 (21)	107 (11)	-52
Indoxicarbe	0,99	0,03	0,1	91 (20)	108 (13)	92 (19)	99 (21)	91 (17)	117 (04)	75 (11)	93 (11)	-31
Iprovalicarbe	0,99	0,06	0,2	86 (20)	110 (11)	92 (20)	107 (12)	76 (20)	101 (03)	69 (07)	90 (11)	-30
Kresoxim-metílico	0,99	0,06	0,2	70 (20)	102 (11)	104 (08)	94 (18)	72 (15)	112 (07)	72 (09)	70 (13)	-66
Linuron	0,96	0,03	0,1	84 (10)	82 (12)	97 (12)	98 (01)	74 (13)	105 (04)	89 (08)	92 (17)	-40
Malationa	0,99	0,03	0,1	81 (12)	108 (13)	80 (03)	75 (13)	71 (10)	119 (12)	75 (13)	115 (03)	-51
Mefosfolan	0,99	0,06	0,2	73 (10)	108 (18)	121 (21)	109 (10)	79 (13)	109 (08)	119 (20)	96 (04)	-30
Metalaxil	0,99	0,06	0,2	77 (15)	110 (08)	112 (08)	112 (18)	76 (10)	112 (04)	115 (15)	108 (07)	-20
Metconazole	0,99	0,03	0,1	85 (11)	102 (02)	101 (12)	117 (10)	85 (12)	113 (02)	86 (08)	102 (17)	-53
Methiocarbe sulfona	0,99	0,06	0,2	74 (12)	82 (20)	106 (03)	111 (11)	70 (08)	102 (07)	111 (10)	105 (06)	-34
Metsulfuron metílico	0,99	0,03	0,1	82 (10)	103 (10)	105 (11)	105 (13)	82 (20)	115 (07)	116 (09)	85 (14)	-36
Miclobutanil	0,99	0,06	0,2	84 (09)	79 (10)	71 (20)	82 (12)	70 (07)	92 (07)	98 (09)	100 (17)	-34
Pirimicarbe	0,99	0,06	0,2	76 (10)	85 (11)	80 (21)	82 (10)	76 (10)	97 (03)	115 (14)	106 (03)	-63
Procimidona	0,99	0,06	0,2	108 (11)	70 (10)	92 (11)	82 (11)	88 (11)	80 (13)	78 (12)	88 (08)	-45
Pirimifós-metílico	0,99	0,03	0,1	84 (13)	79 (01)	105 (10)	114 (11)	94 (09)	117 (04)	87 (10)	82 (08)	-25
Profenofós	0,99	0,06	0,2	120 (18)	120 (20)	108 (20)	108 (10)	111 (04)	113 (04)	80 (03)	93 (06)	-78
Profoxidim	0,99	0,03	0,1	109 (11)	105 (13)	101 (14)	106 (18)	99 (14)	109 (05)	74 (14)	81 (07)	-37
Propargito	0,99	0,03	0,1	81 (11)	75 (18)	90 (15)	78 (20)	91 (11)	81 (04)	77 (09)	81 (08)	-54
Propiconazol	0,99	0,03	0,1	109 (09)	97 (11)	112 (13)	95 (15)	109 (09)	107 (04)	104 (09)	82 (18)	-64
Propizamida	0,99	0,03	0,1	82 (09)	72 (07)	80 (12)	79 (15)	82 (09)	110 (01)	81 (11)	97 (06)	-37

Propoxur	0,99	0,03	0,1	73 (09)	74 (01)	94 (18)	91 (11)	73 (05)	102 (03)	105 (07)	110 (03)	-20
Piraclostrobina	0,99	0,03	0,1	76 (07)	107 (09)	82 (08)	80 (20)	76 (05)	109 (03)	84 (15)	94 (08)	-26
Pirazofós	0,99	0,06	0,2	73 (08)	71 (15)	72 (18)	75 (10)	73 (07)	83 (06)	97 (09)	100 (13)	-55
Piridaben	0,99	0,03	0,1	77 (10)	76 (21)	73 (19)	83 (20)	87 (20)	110 (06)	86 (12)	78 (07)	-23
Piridafentiona	0,99	0,03	0,1	82 (07)	81 (18)	84 (12)	84 (12)	85 (08)	105 (01)	75 (10)	106 (07)	-68
Piridato	0,99	0,03	0,1	107 (08)	111 (20)	107 (11)	106 (10)	107 (08)	112 (04)	78 (08)	81 (12)	-68
Piriproxifeno	1,00	0,03	0,1	104 (17)	101 (11)	109 (02)	102 (11)	99 (14)	119 (08)	100 (06)	103 (10)	-21
Pirimetanil	0,99	0,06	0,2	74 (18)	70 (10)	71 (10)	86 (21)	70 (11)	101 (02)	80 (14)	88 (14)	-57
Quincloraque	0,99	0,03	0,1	114 (10)	108 (01)	118 (11)	108 (20)	114 (05)	117 (11)	115 (19)	91 (07)	-67
Quinoxifeno	0,99	0,03	0,1	92 (12)	102 (11)	110 (12)	114 (20)	92 (06)	106 (03)	79 (12)	90 (03)	-31
Tebuconazol	0,99	0,06	0,2	71 (14)	70 (19)	106 (17)	84 (17)	79 (14)	109 (05)	90 (14)	89 (07)	-37
Terbufós	0,99	0,06	0,2	79 (09)	85 (18)	93 (20)	104 (02)	75 (09)	120 (13)	109 (13)	91 (12)	-46
Terbutilazina	1,00	0,03	0,1	70 (08)	73 (15)	79 (16)	76 (16)	70 (09)	103 (03)	83 (14)	95 (07)	-44
Tetraconazol	0,99	0,03	0,1	87 (16)	87 (18)	91 (08)	103 (10)	83 (05)	84 (06)	81 (03)	86 (14)	-65
Tiacloprid	0,99	0,06	0,2	77 (20)	74 (20)	118 (20)	104 (20)	73 (18)	79 (03)	100 (19)	94 (11)	-37
Tiodicarbe	0,99	0,06	0,2	76 (21)	71 (07)	82 (07)	76 (21)	71 (14)	79 (15)	84 (12)	87 (18)	-51
Tiofanato metílico	0,99	0,03	0,1	93 (15)	108 (20)	110 (20)	112 (18)	73 (05)	83 (04)	97 (04)	104 (05)	-27
Tolcofós metílico	1,00	0,03	0,1	73 (09)	104 (16)	113 (15)	115 (20)	73 (09)	93 (04)	99 (11)	88 (10)	-36
Triadimefon	0,99	0,03	0,1	70 (19)	78 (20)	70 (08)	86 (11)	80 (11)	119 (08)	101 (10)	104 (08)	-38
Triazofós	0,99	0,03	0,1	73 (10)	77 (13)	98 (15)	72 (15)	93 (07)	104 (04)	86 (12)	93 (05)	-55
Triclorfom	0,99	0,06	0,2	71 (20)	90 (18)	76 (18)	121 (17)	79 (09)	76 (06)	110 (10)	80 (12)	-36
Trifloxistrobina	0,99	0,03	0,1	88 (10)	107 (10)	97 (18)	90 (10)	100 (07)	110 (07)	76 (06)	87 (05)	-37

RSDr – Desvio padrão relativo a repetibilidade.

RSDpi – Desvio padrão relativo a precisão intermediária.

5 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

5.1 APLICAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS MINIATURIZADO PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE VINHO

Neste trabalho, 22 amostras de vinho de diferentes variedades foram utilizadas para aplicação dos procedimentos validados. Dentre as amostras, 7 (A1 até A7) são vinhos de fabricação caseira obtidos de vinicultores de diferentes regiões do estado (centro, serra e campanha) e 15 foram vinhos adquiridos nos mercados de Santa Maria (nacionais e importados).

Num primeiro momento, as 22 amostras foram analisadas utilizando o procedimento de extração relativo ao método QuEChERS miniaturizado, sendo que dessas, 12 amostras apresentaram resíduos de pelo menos um composto. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 12. O composto que apareceu com maior frequência (9 amostras) foi o fungicida sistêmico carbendazim. Sendo que, a maior concentração foi na amostra A9 ($55,3 \mu\text{g L}^{-1}$). No Brasil, esse composto é autorizado para o cultivo de uva e possui um LMR de $700 \mu\text{g kg}^{-1}$, expresso como a soma de carbendazim e tiofanato metílico (ANVISA, 2016).

Dentre os demais compostos encontrados estão carbaril e fluroxipir que não são autorizados para a utilização na uva. O carbaril é um inseticida enquanto que, o fluroxipir é um herbicida utilizado para o controle as ervas daninhas. A amostra A5 foi a que apresentou maior nível de contaminação, sendo que foi encontrado resíduos dos agrotóxicos carbendazim, dimetomorfe e fluroxipir.

5.2 APLICAÇÃO DA SD-DLLME PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE VINHO

Dentre as 22 amostras analisadas pelo método QuEChERS, 10 amostras não apresentaram resíduos de agrotóxicos, são elas: A3, A4, A7, A11, A14, A15, A16, A18, A18, A19 e A21. Essas amostras foram analisadas pela SD-DLLME uma vez que, os limites de quantificação e detecção obtidos para esse método foram menores que os obtidos para o método QuEChERS. Os resultados encontrados então apresentados na Tabela 12, onde é possível observar que todas as amostras avaliadas apresentaram algum tipo de contaminação. Os compostos atrazina, azoxistrobina, tebuconazol e

tiofanato metílico foram os encontrados com maior frequência. A atrazina é um herbicida bastante utilizado para o controle de ervas daninhas. Porém, não é autorizado para aplicação em videiras. Enquanto que a azoxistrobina e tebuconazol são fungicidas autorizados para aplicação na uva e possuem LMR de 0,5 e 2,0 mg kg⁻¹, respectivamente.

Os valores de concentração encontrados para todos os agrotóxicos variaram de <LOQ até 2,0 µg L⁻¹. No trabalho realizado por Chen *et al.*, (2016), para a determinação de agrotóxicos em vinho utilizando DLLME e GC-MS, foram encontrados resíduos dos compostos ipenilanina, metalaxil, miclobutanil e tebuconazol em concentrações que variaram de 0,56 a 18,6 µg L⁻¹. Rodríguez-Cabo *et al.*, (2011) realizaram a análise de 12 amostras de vinhos utilizando a técnica de DLLME e GC-MS. Resíduos de 7 fungicidas foram encontrados nas amostras e as concentrações variaram entre 1,2 e 278,0 µg L⁻¹.

Os resultados encontrados no presente trabalho, para as 10 amostras, demonstraram a existência de resíduos de agrotóxicos tanto em vinho produzidos em pequena escala, para consumo próprio, bem como naqueles produzidos em escala industrial. Atualmente, o monitoramento de agrotóxicos é realizado apenas na uva, e para um número limitado de compostos. Além disso, os altos valores de LMR autorizam a aplicação de agrotóxicos em grandes quantidades, aumentando a probabilidade de encontrar esses compostos no vinho.

Tabela 12 - Resultados em $\mu\text{g L}^{-1}$ das 22 amostras analisadas utilizando o método QuEChERS miniaturizado e SD-DLLME e determinação por UHPLC-MS/MS

Amostras	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	A22
QuEChERS miniaturizado																						
Azoxistrobina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ
Boscalida	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	23,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Carbaril	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Carbendazim	20,0	23,7	n.d.	n.d.	47,0	n.d.	n.d.	17,1	55,3	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	54,3	n.d.	14,1
Dimetomorfe	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	21,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fluroxipir	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	13,0	15,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SD-DLLME																						
Atrazina	-	-	1,7	0,04	-	-	2,0	-	-	-	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	0,8	n.d.	-	n.d.	-
Azoxistrobina	-	-	1,7	n.d.	-	-	n.d.	-	-	-	3,4	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	<LOQ	-	n.d.	-
Carbendazim	-	-	n.d.	0,05	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	0,5	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	-
Difenoconazol	-	-	<LOQ	n.d.	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	-	-	n.d.	0,09	n.d.	-	n.d.	n.d.	-	0,80	-
Imazalil	-	-	1,5	n.d.	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	2,6	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	-
Tebuconazol	-	-	0,09	9,8	-	-	1,2	-	-	-	n.d.	-	-	10,6	n.d.	0,86	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	-
Pirimetanil	-	-	1,56	n.d.	-	-	n.d.	-	-	-	0,098	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	0,95	-	n.d.	-
Imidacloprido	-	-	n.d.	0,086	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	-	-	n.d.	8,4	n.d.	-	n.d.	n.d.	-	0,97	-
Malationa	-	-	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	-	-	n.d.	<LOQ	n.d.	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	-
Tiofanato metílico			n.d.	<LOQ	-	-	1,7	-	-	-	n.d.	-	-	<LOQ	n.d.	n.d.	-	<LOQ	n.d.	-	n.d.	-

<LOQ – concentração encontrada do analito está abaixo do LOQ do método

n.d. – não detectado

6 AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO UTILIZADOS

Tendo em vista os resultados de validação obtidos para o método QuEChERS miniaturizado (Tabela 10) e a SD-DLLME (Tabela 11) pode-se dizer que ambos os procedimentos são adequados para determinação de resíduos de agrotóxicos em vinho.

O método QuEChERS é um método bastante robusto e de fácil aplicação para diferentes matrizes. Atualmente, é o método mais utilizado para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos e bebidas. O método miniaturizado neste trabalho apresentou excelentes valores de recuperação, facilidade de execução além de proporcionar uma redução nas quantidades de reagentes utilizados. Dos 104 compostos avaliados, 97 foram validados através do método miniaturizado, enquanto que, 74 compostos foram validados pela SD-DLLME. Essa redução no número de compostos está relacionada com as características de cada procedimento de extração. Enquanto o método QuEChERS é um método de extração exaustiva, a SD-DLLME trabalha com o equilíbrio dos compostos entre a fase aquosa e orgânica. Através de uma análise dos trabalhos existentes na literatura (Tabela 2) é possível observar que, existe certa dificuldade em adaptar técnicas de microextração para a análise multirresíduo, abrangendo um grande escopo de compostos. Isso ocorre, muitas vezes, devido às condições de extração adotadas nessas técnicas que acabam por privilegiar certas classes de compostos em detrimento de outras.

Porém, apesar de apresentar um menor número de compostos, a SD-DLLME demonstrou possuir maior detectabilidade. Isso pode ser observado através da comparação entre os LOQs de ambos os procedimentos. Para o método QuEChERS o LOQ variou de 10 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para a SD-DLLM de 0,1 a 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$. Esse menor valor de LOQ, permitiu a quantificação de compostos que não puderam ser quantificados através do método QuEChERS miniaturizado, o que indica que, nas amostras de vinho analisadas, grande parte dos agrotóxicos encontram-se em concentrações bastante baixas. Esse fato pode estar relacionado aos processos de vinificação.

Os valores de efeito matriz encontrados para ambos os procedimentos também apresentaram diferença. Os valores de EM obtidos para a SD-DLLME foram menores que os obtidos pelo método QuEChERS (Figura 22 e 23). Esses resultados podem estar associados a etapa de preparo de amostra, em especial, ao solvente de extração utilizado. No caso da SD-DLLME, o 1-octanol possui menor polaridade que a acetonitrila, devendo assim, extrair menos interferentes da matriz vinho.

Esse mesmo comportamento foi reportado por Tomasini e colaboradores (2011) quando realizada a comparação entre a DLLME e o método QuEChERS modificado para a extração de resíduos de fipronil em amostras de mel. A redução nos valores de EM podem estar relacionados a menor quantidade de matriz que é transferida para o extrato final quando a SD-DLLME foi utilizada. Em termos de aplicabilidade, ambos os procedimentos são baratos, de fácil execução e utilizam pequenas quantidades de solvente orgânico, gerando uma menor quantidade de resíduos que os procedimentos tradicionais. De maneira geral, o método QuEChERS apresenta certa vantagem com relação a frequência analítica, uma vez que, a etapa de retirada da gota na SD-DLLME ainda é executada de maneira bastante manual, acarretando em um maior tempo de extração.

A Tabela 13 traz uma comparação de alguns parâmetros dos métodos desenvolvidos, demonstrando que tanto o método QuEChERS miniaturizado quanto a SD-DLLME são adequados para determinação de resíduos de agrotóxicos em vinho.

Tabela 13 - Comparação entre os métodos QuEChERS miniaturizado e SD-DLLME para extração de agrotóxicos em vinho.

Parâmetros	SD-DLLME	QuEChERS miniaturizado
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,03 - 0,06	3,0 - 6
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,1 - 0,2	10 - 20
Volume de amostra (mL)	2,0	10,0
Volume de solvente (mL)	0,7	2,0
Nº de compostos	74	97
Recuperação (%)	70 a 120	70 a 120
RSD (%)	≤ 20	≤ 20
EM (%)	-20 e -78	-27 a -80

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram realizadas modificações em dois métodos de extração para determinação de agrotóxicos em vinho. Uma modificação do método QuEChERS foi avaliada e miniaturizada. O método miniaturizado apresentou excelentes resultados na etapa de validação e ainda reduziu em 80% as quantidades de amostra e reagentes utilizados. Aliado a isso, a menor geração de resíduos tornam esse método vantajoso quando comparado aos demais métodos de extração convencionais.

Além do método QuEChERS, a microextração líquido-líquido dispersiva com uso de solvente demulsificante (SD-DLLME) também foi avaliada levando em consideração os principais parâmetros que afetam a eficiência de extração. A utilização da agitação com o auxílio do vortex melhorou a repetibilidade da técnica e proporcionou melhor eficiência de extração para a maioria dos compostos. O uso do solvente demulsificante proporcionou uma eficiente separação entre as fases o que contribuiu para a retirada da gota localizada na superfície da solução.

No método QuEChERS miniaturizado, 97 compostos foram validados enquanto que, 74 compostos foram validados por SD-DLLME. Mesmo não havendo legislação que estabeleça LRM para a ocorrência de agrotóxicos em vinho, ambos os métodos atingiram limites estabelecidos para a cultura da uva. Foram encontrados resíduos de agrotóxicos nas 22 amostras de vinho analisadas demonstrando a necessidade de monitoramento dessa bebida.

Dessa forma, conclui-se que ambos os métodos propostos para a determinação de agrotóxicos em vinhos, QuEChERS e SD-DLLME, mostraram-se eficazes, bem como o uso do UHPLC-MS/MS, podendo ser aplicados em análises de rotina e monitoramento, uma vez que atendem as legislações de acordo com os parâmetros de validação de métodos cromatográficos.

8 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.

9 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Ampliar o escopo de agrotóxicos a serem analisados por SD-DLLME;
- Desenvolver um método de análise cromatográfica por GC-MS/MS para expandir o escopo para analitos não passíveis de análise por cromatografia líquida;
- Avaliar a influência da concentração de etanol nos métodos desenvolvidos;
- Avaliar solventes alternativos para SD-DLLME, como líquidos iônicos;
- Investigar a aplicação do método SD-DLLME modificado para determinação de outros contaminantes orgânicos, como medicamentos veterinários, drogas de abuso e poluentes orgânicos persistentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, W.; AL-SIBAAI, A.A.; BASHAMMAKH, A.S.; ALWAEEL, H.; EL-SHAHAWI M.S. Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction for pesticide analysis. **TrAC-Trends in Analytical Chemistry**, v. 72, p. 181–192, 2015.

ALI, K.; CHOI, H. Y.; VERPOORTE, R. Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 357-378, 2010.

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. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-31, 2003.

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

ANDRUCH, V.; BURDEL, M.; KOCÚROVÁ, L.; ŠANDREJOVÁ, J.; BALOGH, I.S. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. v.49, p.1-19, 2013.

ANJOS J.P.; ANDRADE J.B. Simultaneous determination of pesticide multiresidues in white wine and rosé wine by SDME/GC-MS. **Microchemical Journal**. v. 120, p. 69-76, 2015.

ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária), Agrotóxicos e Toxicologia. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agr+otoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos>. Acesso em 12 de dezembro de 2016.

ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária), 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 janeiro de 2017.

ARIAS.; J.L., ROMBALDI, C., CALDAS, S.S.; PRIMEL, E.G. Alternative sorbents for the dispersive solid-phase extraction step in quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction of pesticides from rice paddy soils with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.19. p. 66-75, 2014.

ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p.2145-2148, 1990.

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

BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; JANSSEN, H.G.; CRAMERS, C. Study into de Equilibrium Mechanism between Water and Poly (dimethylsiloxane) for Very

Apolar Solutes: Adsorption or Sorption? **Analytical Chemistry**, v. 71, p. 5213-5216, 1999.

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

BARKER, S.A; LONG, A.R.; SHORT, C.R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 475, p. 353-61, 1989.

BOLAÑOS P. P.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; GARRIDO A. F.; MARTÍNEZ VIDAL, J. L. Application of hollow fibre liquid phase microextraction for the multiresidue determination of pesticides in alcoholic beverages by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1208, p. 16–24, 2008.

BOONCHIANGMA, S.; NGEONTAE, W.; SRIJARANAI, S. Determination of six pyrethroid insecticides in fruit juice samples using dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography. **Talanta**, v.88, p. 209–215, 2012.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988. Disponível em <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis>>. Acessado em 14 de janeiro de 2017.

BRASIL, 2002. Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm. Acessado em 23 de janeiro de 2017.

BRIGGS, Shirley A. 1992. Basic guide to pesticides: Their characteristics and hazards. Hemisphere Publishing Corporation. Philadelphia, PA.

CABRAS P.; ANGIONI, A. Pesticide Residues in Grapes, Wine, and Their Processing Products. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 967-973, 2000.

CABRERA, L.C.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; PRIMEL, E.G.; ZANELLA, R. Evaluation of alternative sorbents for dispersive solid-phase extraction clean-up in the QuEChERS method for the determination of pesticide residues in rice by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v.39, p.1945 - 1954, 2016.

CALDAS, S.S.; ROMBALDI, C.; ARIAS, J.L.O.; MARUBE, L.C.; PRIMEL, E.G. Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 146 p. 676–688, 2016.

CARNEIRO, F.F. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde, 2015. Disponível em: <http://www.abrasco.org.br/dossieagrototoxicos/wp>

[content/uploads/2013/10/DossieAbrasco_2015_web.pdf](#). Acessado em 27 de janeiro de 2017.

CHAVARRIA, G.; SANTOS, H. P. Cultivo protegido de videira: manejo fitossanitário, qualidade enológica e impacto ambiental. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 910-918, 2013.

CHEN, B.; WU, F.; WU, W.; JIN, B.; XIE, L.; FENG, W.; OUYANG, G. Determination of 27 pesticides in wine by dispersive liquid–liquid microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 126, p. 415–422, 2016.

CHEN, H.; CHEN, R.; LI, S. Low-density extraction solvent-based solvent terminated dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of carbamate pesticides in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 1244-1248, 2010.

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

CHRISTIA, C.; BIZANI, E.; CHRISTOPHORIDIS, C.; FYTIANOS, K. Pesticide residues in fruit samples: comparison of different QuEChERS methods using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Environmental Science Pollution Research**, v. 22, p. 13167–13178, 2015.

CHU, S.; WAN-CHI TSENG, PO-HSIN KONG, CHUN-KAI HUANG, JUNG-HSUAN CHEN, PAI-SHAN CHEN, SHANG-DA HUANG. Up-and-down-shaker-assisted dispersive liquid–liquid microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry for the determination of fungicides in wine. **Food Chemistry**, v.185 p. 377–382, 2015.

CINELLI, G.; AVINO, P.; NOTARDONATO, I. RUSSO, M.V. Ultrasound-vortex-assisted dispersive liquid–liquid microextraction coupled with gas chromatography with a nitrogen–phosphorus detector for simultaneous and rapid determination of organophosphorus pesticides and triazines in wine. **Analytical Methods**, v. 6, p. 782-790, 2014.

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

CUI, S., CHEN, Q.; WANG, W.; MIOA J.; WANG, A.; CHEN, J. Ultra-Preconcentration and Determination of Multiple Pesticide Residues in Water Samples Using Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction and GC-FID. **Chromatographia**, v. 76, p. 671-678, 2013.

CUNHA, S.C., FERNANDES, J.O., ALVES, A., OLIVEIRA, M.B.P.P. Fast low-pressure gas chromatography–mass spectrometry method for the determination of multiple pesticides in grapes, musts and wines. **Journal of Chromatography A**. v. 1216, p. 119–126, 2009.

ČUŠ, F.; ČESNIK H. B.; BOLTA Š. V.; GREGORČIČ A. Pesticide residues and microbiological quality of bottled wines. **Food Control**, v. 21, p.150–154, 2010.

DUARTE, J.S.; DORES, E.F.G.C.; VILLA, R.D. Ultrasound Vortex Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (USVADLLME) Applied to the Determination of the Triazole Flutriafol and Triazines and Triazinones Pesticides in Water. **Química Nova**, v. 39, p. 925-931, 2016.

ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S.; TSIPI, D. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216 p. 5856–5867, 2009.

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](http://faostat.fao.org/site/379/DesktopDefault.aspx?PageID=379)> Acesso em: 26 dez.2014.

FARAJZADEH, M.A.; YADEGHARIA, A.; KHOSH MARAM, L. Combination of dispersive solid phase extraction and dispersive liquid–liquid microextraction for extraction of some aryloxy pesticides prior to their determination by gas chromatography. **Microchemical Journal**, v. 131, p. 182-191, 2017

FARAJZADEHA, M. A.; MOGADDAMA, M. R. A.; GHORBANPOUR, H. Development of a new microextraction method based on elevated temperature dispersive liquid–liquid microextraction for determination of triazole pesticides residues in honey by gas chromatography-nitrogen phosphorus detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1347, p. 8-16, 2014.

FATEMI, M. H. et al. Extraction optimization of polycyclic aromatic hydrocarbons by alcoholic - assisted dispersive liquid–liquid microextraction and their determination by HPLC. **Journal of Separation Science**, v. 35, p.86-92, 2012.

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

FERRER, C.; LOZANO, A.; AGÜERA, A.; GIRÓN, A.J.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7634–7639, 2011.

FLAMINI, R.; TRALDI, P. Grape and wine pesticides, In: **Mass Spectrometry in Grape and Wine Chemistry**. 2010.

GALLART, M.; FRANCIOLI, S.; VIU-MARCO A.; LÓPEZ-TAMAMES, E.; BUXADERAS, S. Determination of free fatty acids and their ethyl esters in musts and wines. **Journal of Chromatography A**. v. 776, p. 283–291, 1997.

GAO, S.; YANG, X.; YU, W.; LIU, Z.; ZHANG, H. Ultrasound-assisted ionic liquid/ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of sulfonamides in infant formula milk powder using high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 99, p. 875-882, 2012

GERVAIS, G.; BROSILLON, S.; LAPLANCHE, A.; HELEN, C. Ultra-pressure liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry for multiresidue determination of pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1202 p. 163–172, 2008.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, R. M^a.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Multiresidue determination of 11 new fungicides in grapes and wines by liquid–liquid extraction/clean-up and programmable temperature vaporization injection with analyte protectants/gas chromatography/ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 6033–6042, 2009.

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

GUERRA, C. C. Vinho tinto. In: VENTURINI FILHO, W.G. Bebidas Alcoólicas, Ciência e tecnologia – volume 1. Blucher (Ed.), 2010.

GURE, A.; LARA, F.J.; GARCÍA-CAMPAÑA, A.M.; MEGERSA, N.; OLMO-IRUELA, M. Vortex-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of sulfonylurea herbicides in wine samples by capillary high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 170, p. 348–353, 2015.

Guo, L.; Lee, H.K. Low-density solvent based ultrasound-assisted emulsification microextraction and on-column derivatization combined with gas chromatography–mass spectrometry for the determination of carbamate pesticides in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, v.1235, p. 1–9, 2012.

HANOT, V., GOSCINNY, S., DERIDDER, M. A simple multi-residue method for the determination of pesticides in fruits and vegetables using a methanolic extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Optimization and extension of scope. **Journal of Chromatography A**, v. 1384, p. 53–66, 2015.

HASHIZUME, T. Tecnologia do vinho. In: AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U.A. (Ed) Biotecnologia Industrial: biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, p. 21-68.

HERRERA-HERRERA, A. V.; RAMOS, M.A.; BORGES, J.H.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M.A.; et al. Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. **Trends Analytical Chemistry**, v. 29, p. 728-751, 2010.

HOU, X.; ZHENG, X.; ZHANG, C.; MA, X.; LING, Q.; ZHAO, L. Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction based on the solidification of a floating organic droplet followed by gas chromatography for the determination of eight pyrethroid pesticides in tea samples. **Journal of Chromatography B**, v. 969 p. 123–127, 2014.

HURTADO-SÁNCHEZ, M. C.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; RODRÍGUEZ-CÁCERES, I.; DURÁN-MERÁS, I.; GARRIDO FRENICH, A. Rapid and sensitive on-line solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry analysis of pesticides in surface waters. **Journal of Chromatography A**, v.1305, p. 193–202, 2013.

IBRAVIN – Instituto Brasileiro do Vinho, Disponível em:<<http://www.ibravin.org.br/dados-estatisticos>>. Acesso em 20 de janeiro de 2017a.

IBRAVIN – Instituto Brasileiro do Vinho, Disponível em: <http://www.ibravin.org.br/historia-do-vinho-no-brasil>. Acesso em 14 de janeiro de 2017b.

IBRAVIN – Instituto Brasileiro do Vinho, Disponível em: <http://www.ibravin.org.br/Regioes-Produtoras>. Acesso em 20 de janeiro de 2017c.

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

JACKSON, R.S, Wine Science (Third Edition) Principles and Applications. A volume in Food Science and Technology, p.1–14, 2008.

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Solvent Microextraction into a Single Drop. **Analytical Chemistry**. v. 68, p. 2236- 2240, 1996.

JI, Y; DU, Z.; ZHANG, H.; ZHANG, Y. Rapid analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in tap water and drinks by ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction coupled to ultra-high performance supercritical fluid chromatography. **Analytical Methods**, v. 6, p. 7294-7304, 2014.

JOVANOVIĆ, P.; GUZSVÁNY V.; LAZIĆ S.; FRANKO M.; SAKAČ M.; ŠARIĆ L.; KOS J. Development of HPLC-DAD method for determination of neonicotinoids in honey. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 40, p. 106–113, 2015.

KEMMERICH, M.; RIZZETTI, T.M.; MARTINS, M.L.; PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. Optimization by Central Composite Design of a Modified QuEChERS Method for Extraction of Pesticide Multiresidue in Sweet Pepper and Analysis by Ultra-High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**. v. 8, p.728–739, 2015.

KOCÚROVÁ, L.; BALOGH, I.S.; ŠANDREJOVÁ, J.; ANDRUCH, V. Recent advances in dispersive liquid–liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review. **Microchemical Journal**, v. 102, p. 11-17, 2012.

KRUIVE, A.; KUNNAPAS, A.; HERODES, K.; LEITO, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, p. 58-66, 2008.

KWON, H.; LEHOTAY, S.J. Geis-Asteggiante L. Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography–mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops. **Journal of Chromatography A**, v. 1270, p. 235– 245, 2012.

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.

LEHOTAY, S. J., MASTOVSKA, K., LIGHTFIELD, A. R. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 615-629, 2005.

LEONG, M.; FUH, M.; HUANG, S. Beyond dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1335, p. 2-14, 2014.

LIU, H.; DASGUPTA, P.K. Analytical Chemistry in a Drop. Solvent Extraction in a Microdrop. **Analytical Chemistry**. v. 68, p.1817-1821, 1996.

LIU, L. et al. Application of DLLME to the determination of pyrethroids in aqueous samples. **Chromatographia**, v. 72, p. 1017-1020, 2010.

LOZANO, ANA.; KIEDROWSKA, B.; SCHOLTEN, J.; DE KROON, M.; ; DE KOK, A. FERNANDEZ-ALBA, A.R. Miniaturisation and optimisation of the Dutch mini-Luke extraction method for implementation in the routine multi-residue analysis of pesticides in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.192, p. 668-681, 2016

PARRILLA VÁZQUEZ, M.M.; PARRILLA VÁZQUEZ, P.; MARTÍNEZ GALERA, M.; UCLÉS MORENO, A. Comparison of two ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction approaches for the determination of benzoylurea insecticides in wastewater using liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry: Evaluation of green parameters. **Journal of Chromatography A**, v. 1356, p.1-9, 2014.

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, Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/uva>>. Acesso em 15 de dezembro de 2014.

MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ, G., NIETO-GARCÍA, A. J., ROMERO-GONZÁLEZ, R., FRENICH, A. G. Application of QuEChERS based method for the determination of pesticides in nutraceutical products (*Camellia sinensis*) by liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 177, p. 182-190, 2015.

MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M.; ZANELLA, R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): Fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 29-45, 2012.

MAY, M.M.; FERRONATO, G.; BANDEIRA, N.M.G.; PRESTES, O.D.; ZANELLA, R.; ADAIME, M.B. Determination of Pesticide Residues in Soy-Based Beverages Using a QuEChERS Method (with Clean-Up Optimized by Central Composite Design) and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 369-378, 2017.

MELLO, L. M. R. de. Atuação do Brasil no mercado vitivinícola mundial: panorama 2013. Disponível em <<https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/busca-de-publicacoes/-/publicacao/todos?>>. Acessado em: 14 de outubro de 2016.

MELLO, L. M. R., MACHADO, E C. A. E. Área cultivada com videiras no Rio Grande do Sul: 2008-2012. Documentos / Embrapa Uva e Vinho, Documento 87, 49 p. 2013.

MERIB J.; CARASEK E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 5, p. 249-262, 2013.

MILLS, P.A.; ONLEY, J.H.; GUITHER, R.A. Rapid method for chlorinated pesticide residues in non fatty foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 50, p. 430-439, 1963.

MOLINER-MARTINEZ, Y., CAMPÍNS-FALCÓ, P., MOLINS-LEGUA, C., SEGOVIA-MARTÍNEZ, L., SECO-TORRECILLAS, A. Miniaturized matrix solid phase dispersion procedure and solid phase microextraction for the analysis of organochlorinated pesticides and polybrominated diphenylethers in biota samples by gas chromatography electron capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 6741–6745, 2009

MOREIRA, B.J.; YOKOYA, J.M.C.; GAITANI, C.M. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 6, p. 186-204, 2013.

OSHITA, D.; JARDIM, I.C.S. F. Comparação de Métodos por Cromatografia Líquida na Determinação de Multirresíduos de Agrotóxicos em Morangos. **Química Nova**, v. 38, p. 1273-1281, 2015.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K.E.; Liquid-Liquid- Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 71, p. 2650-2655, 1999.

PELIT, F.O.; PELIT, L.; ERTAŞ, H.; ERTAŞ, F.N. Development of a gas chromatographic method for the determination of Chlorpyrifos and its metabolite Chlorpyrifos-oxon in wine matrix. **Journal of Chromatography B**, v. 904, p. 35–41, 2012.

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 a espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.

PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v.3, p.51-64, 2011.

RAHMAN, M.M.; ABD EL-ATY A.M., SHIM, J.H. Matrix enhancement effect: A blessing or a curse for gas chromatography? A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 801, p. 14–21, 2013.

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

RASMUSSEN, K.E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p.1-10, 2004.

RAVELO-PÉREZ, L.M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; BORGES-MIQUELA, T. M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M.Á. Solid-phase microextraction and sample stacking micellar electrokinetic chromatography for the analysis of pesticide residues in red wines. **Food Chemistry**, v. 111, p. 764–770, 2008.

REJCZAK, T., TUZIMSKI, T. Recent Trends in Sample Preparation and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for Pesticide Residue Analysis in Food and Related Matrixes. **Journal of AOAC International**, v. 98, p. 1143-62, 2015.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEIN, M.M.; AGHAEI, E.; AHMADIA, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, p.1-9, 2006.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2342-2357, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforeticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBERAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. Phenilic compounds. In: **HANDBOOK of enology: the chemistry of wine stabilization and treatments**. Chichester: John Wiley, 2006. v. 2, p. 141-203.

RIZZETTI, T.M.; KEMMERICH, M.; MARTINS, M.L.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v.1, p. 25-33, 2016.

RODRÍGUEZ-CABO, T.; RODRÍGUEZ, I.; RAMIL, M.; CELA, R. Dispersive liquid–liquid microextraction using non-chlorinated, lighter than water solvents for gas chromatography–mass spectrometry determination of fungicides in wine. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p. 6603-6611, 2011.

ROMERO-GONZÁLEZA, R.; GARRIDO FRENICH, A.; MARTÍNEZ VIDAL, J.L.; PRESTES, O.D. GRIO, S.L. Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 1477–1485, 2011.

WROLSTAD, R.E.; Durst, R.W.; Lee, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 423–428, 2005.

SANTE. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Documento nº 11945/2015, disponível em: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945.pdf. Acessado 27/01/2017.

SEEBUNRUENG, K.; SANTALADCHAIYAKIT, Y.; SRIJARANAI, S. Vortex assisted low density solvent based demulsified dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in water samples. **Chemosphere**, v. 103, p. 51-58, 2014.

SÔNEGO, O.R. et al. Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 2005. 32p. (Circular Técnica).

SOUSA, R. et al. Optimisation and application of dispersive liquid–liquid microextraction for simultaneous determination of carbamates and organophosphorus pesticides in waters. **Analytical Methods**, v. 5, p. 2736-2745, 2013a.

SOUSA, F.A., COSTA., A.I.G, QUEIROZ, M.E.L.R, TEÓFILO, R.F., PINHO, G.P., NEVES, A.N. Influence of pH and Matrix Components in the Chromatographic Response of Pesticides Residues Analysis. **Chromatographia**, v.76, p.67-73, 2013b.

STACHNIUK, A.; FORMAL, E. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food. **Food Analytical Methods**. v. 9, p. 1654–1665, 2016.

STASHENKO, E. E.; MARTINEZ, J. R. GC-MS: Mas de un Analizador de Masas, para que? **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 25-48, 2010.

STENZLER, J.; PETZ, M.; KREBBER, R.; STUKE, S. Simplification and Miniaturization of a Multiresidue Method for the Determination of Pesticides in Plant Matrices. **Analytical Letters**, v. 47, p. 1079-1087, 2014.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. (IUPAC Technical Report). **Pure Applied Chemistry**, v. 74, p. 835-855, 2002.

TOMASINI, D.; SAMPAIO, M. R. F., CARDOSO, L. V.; CALDAS, S. S. PRIMEL, E.G. Comparison of dispersive liquid–liquid microextraction and the modified QuEChERS method for the determination of fipronil in honey by high performance liquid chromatography with diode-array detection. **Analytical Methods**, v. 3, p. 1893-1900, 2011.

VIÑAS, P.; AGUINAGA, N.; CAMPILLO, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction for the ultra-performance liquid chromatographic determination of oxazole fungicide

residues in wines and juices. **Journal of Chromatography A**, v. 1194, p. 178–183, 2008.

VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; ANDRUCH, V. Recent achievements in solidified floating organic drop microextraction. **TrAC-Trends in Analytical Chemistry**, v. 68, p. 48–77, 2015.

WALORCZYK, S.; DROŹDŹYŃSKI, D.; BOGUSŁAW, G. Multiresidue determination of 160 pesticides in wines employing mixed-mode dispersive-solid phase extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 85, p. 1856–1870, 2011.

WALORCZYK, S.; DROŹDŹYŃSKI, D.; KIERZEK, R. Determination of pesticide residues in samples of green minor crops by gas chromatography and ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem quadrupole mass spectrometry. **Talanta**, v. 132, p. 197–204, 2015.

WANG, J.; CHEUNG, W. UHPLC/ESI-MS/MS Determination of 187 Pesticides in Wine. **Journal of AOAC International**, v. 99, p. 539-57, 2016.

WANG, S.; REN, L.; XU, Y.; LIU, F. Application of ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of fungicides in red wine. **Microchimica Acta**, v. 173, p. 453–457, 2011.

WANG, X.; CHENG, J.; XIAO, J.; WANG, X.; CHEN, M.; CHENG, M. One-step in-syringe vortex-assisted liquid–liquid microextraction for the analysis of three fungicides in aqueous samples. **Analytical Methods**, v. 5, p. 2034-2040, 2013a.

WANG, X.; TELEPCHAK, X.T. Determination of Pesticides in Red Wine by QuEChERS Extraction, Rapid Mini-Cartridge Cleanup and LC–MS–MS Detection. **LCGC Europe**, v. 2, p. 66-76, 2013b.

WU, C.; LIU, H.; LIU, W.; WU, Q.; WANG, C.; WANG, Z. Determination of organophosphorus pesticides in environmental water samples by dispersive liquid–liquid microextraction with solidification of floating organic droplet followed by high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 2543–2549, 2010.

WU, Q.; CHANG, Q.; WU, C.; RAO, H.; ZENG, X.; WANG, C.; WANG, Z. Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction for the determination of carbamate pesticides in water samples by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 1773–1778, 2010.

YIANTZI, E., PSILLAKIS, E., TYROVOLA, K., et al. Vortex-assisted liquid–liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A. **Talanta**, v. 80, p. 2057–2062, 2010.

YOU, X.; WANG, S.; LIU, F.; SHI, K. Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction based on the solidification of a floating organic droplet used for the simultaneous determination of six fungicide residues in juices and red wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1300, p. 64-69, 2013.

ZACHARIS, C.K.; CHRISTOPHORIDIS, C.; FYTIANOS, K. Vortex-assisted liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry for the determination of organophosphate pesticides in environmental water samples and wines. **Journal of Separation Science**, v. 35, p. 2422-2429, 2012.

ZACHARIS, C.K.; TZANAVARAS, P.D.; ROUBOS, K.; DHIMA, K. Solvent-based de-emulsification dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry for determination of trace organochlorine pesticides in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5896-5900, 2010.

ZAMORA, F. Biochemistry of alcoholic fermentation. In: POLO, M.C., MORENO - ARRIBAS, M.V. Wine chemistry and biochemistry. New York: Springer, 2009, p.3-22.

ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A.; GRZEŚKOWIAK, T. Dispersive liquid-liquid microextraction. **Trends Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1382-1399, 2011.

ZHANG, L.; LIU, S.; CUI, X.; PAN, C.; ZHANG, A.; CHEN, F. A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, p. 900–925, 2012a.

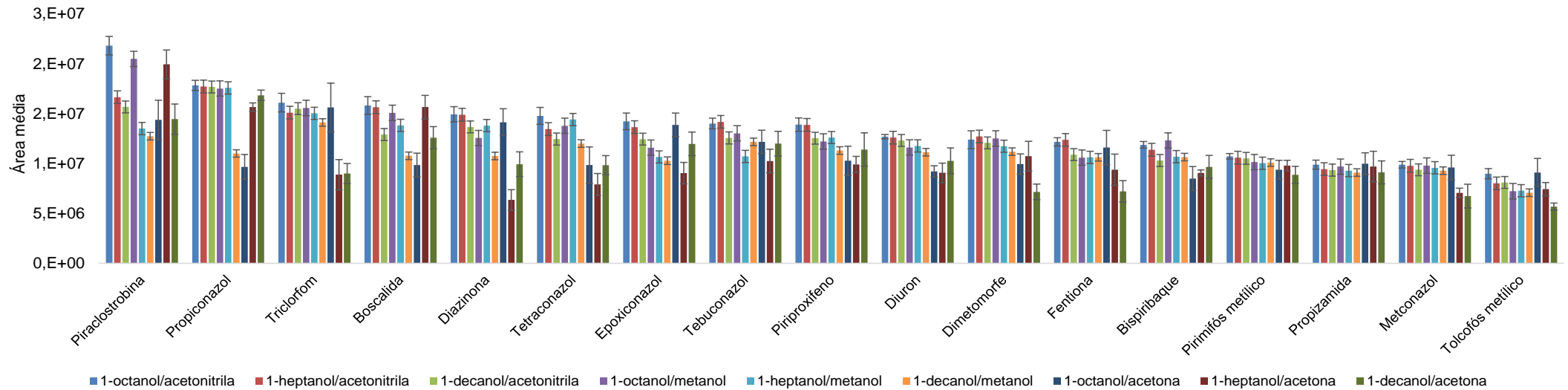
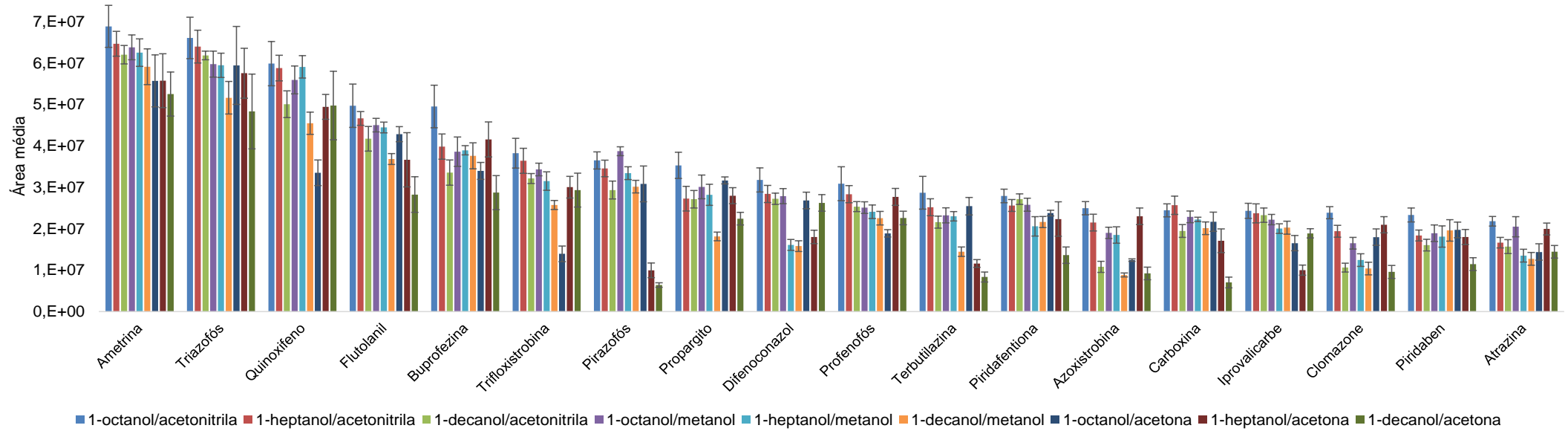
ZHANG Y.; LEE, H.K. Application of ultrasound-assisted emulsification microextraction based on applying low-density organic solvent for the determination of organochlorine pesticides in water samples. **Journal of Chromatography A**, v.1252, p. 67-73, 2012b.

ZHANG, K.; WONG, J.W.; HAYWARD, D.G.; SHELADIA, P.; KRYNITSKY, A.J.; SCHENCK, F.J.; WEBSTER, M.G.; AMMANN, J.A.; EBELER, S.E. Multiresidue Pesticide Analysis of Wines by Dispersive Solid-Phase Extraction and Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57 4019–4029, 2009.

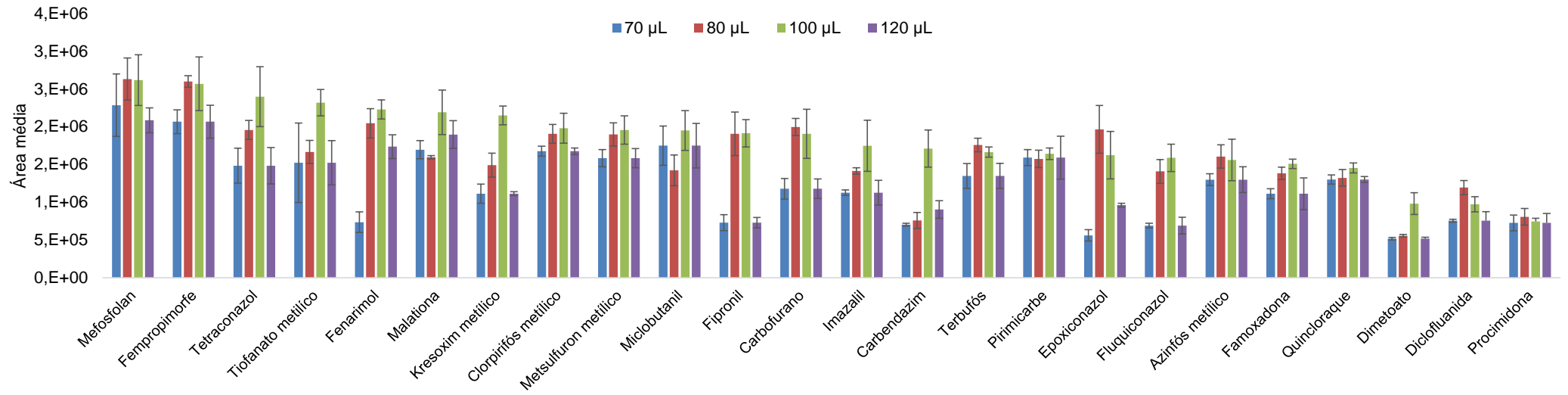
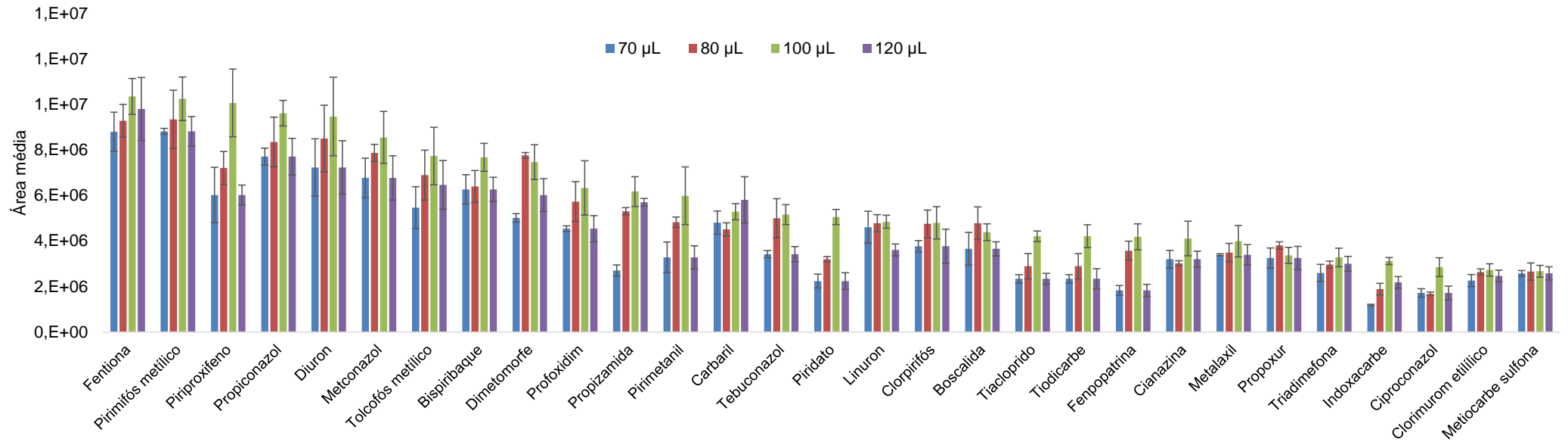
ZHAO, Z.; YANG, X.; ZHAO, X.; BAI, B.; YAO, C.; LIU, N.; WANG, J.; ZHOU, C. Vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of major Aspergillus and Penicillium mycotoxins in rice wine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Control**, v. 73 p. 862-868, 2017.

ZROSTLIKOVAJITKA, H. J.; POUSTKA J.; BEGANY, P. Alternative calibration approaches to compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography– electrospray ionisation tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in plant materials. **Journal of Chromatography A**, v. 973, p.13–26, 2002.

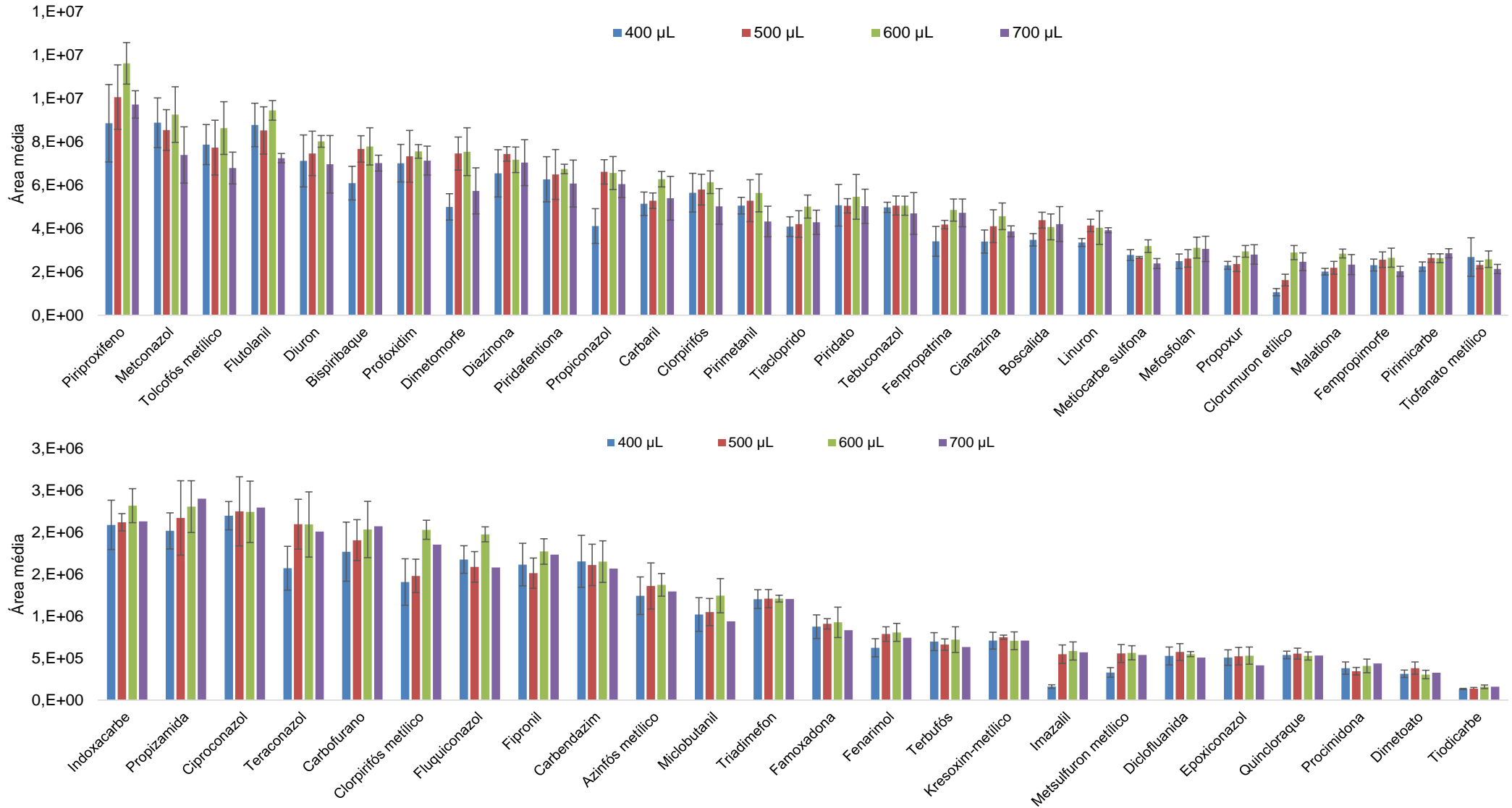
APÊNDICE A – Área média obtida por UHPLC-MS/MS para alguns compostos avaliados mediante a combinação dos solventes de extração (100 µL) e dispersão (500 µL) no nível de fortificação de 0,5 µg L⁻¹ (n= 6).



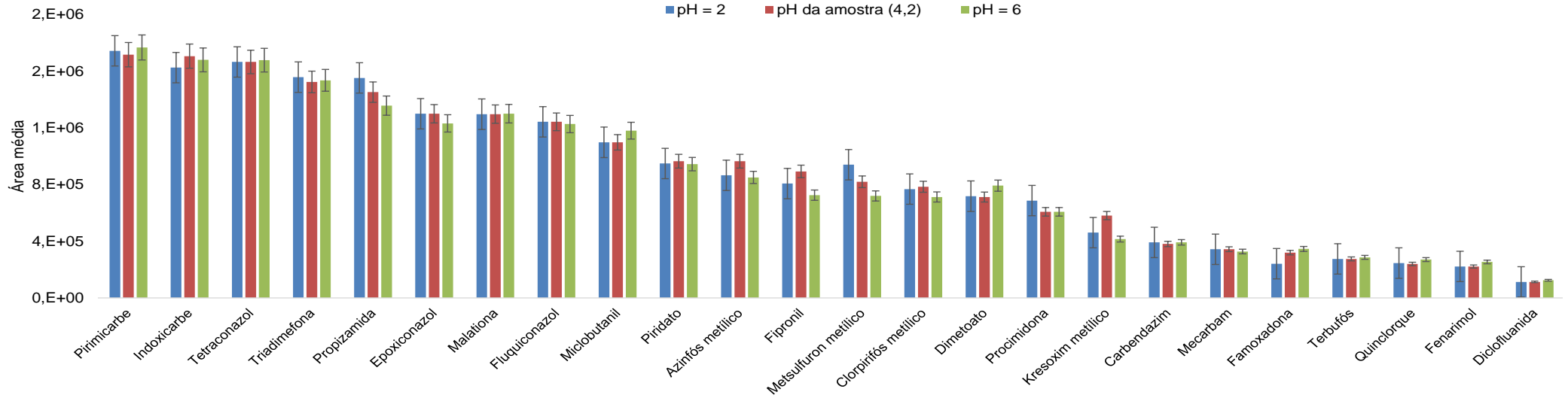
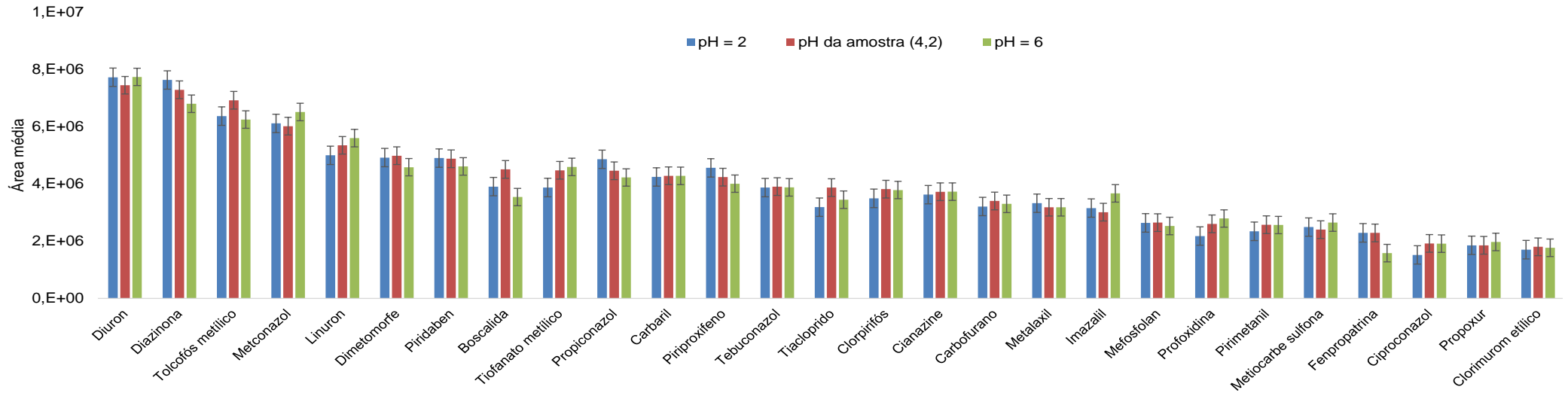
APÊNDICE B - Área média obtida por UHPLC-MS/MS para alguns compostos na avaliação do volume de solvente extrator utilizando 1-octanol e 500 µL de acetonitrila como dispersor no nível de fortificação 0,5 µg L⁻¹ (n= 6).



APÊNDICE C - Área média obtida por UHPLC-MS/MS para alguns compostos na avaliação do volume de solvente dispersor utilizando acetonitrila e 100 µL 1-octanol como extrator no nível de fortificação 0,5 µg L⁻¹ (n= 6).



APÊNDICE D - Área média obtida por UHPLC-MS/MS para alguns compostos na avaliação do pH da amostra na eficiência de extração utilizando 600 µL de acetonitrila como dispersor e 100 µL 1-octanol como extrator no nível de fortificação 0,5 µg L⁻¹ (n= 6).



APÊNDICE E - Área média obtida por UHPLC-MS/MS para alguns compostos na avaliação de diferentes sais na eficiência de extração utilizando 600 µL de acetonitrila como dispersor e 100 µL 1-octanol como extrator no nível de fortificação 0,5 µg L⁻¹ (n= 6).

