



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

**MÉTODO RÁPIDO PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS E MEDICAMENTOS
VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL
POR LC-MS/MS**

TESE DE DOUTORADO

Osmar Damian Prestes

Santa Maria - RS, Brasil

2011

**MÉTODO RÁPIDO PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS E MEDICAMENTOS
VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL POR LC-
MS/MS**

por

Osmar Damian Prestes

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

DOUTOR EM QUÍMICA

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria - RS, Brasil

2011

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

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

**MÉTODO RÁPIDO PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE RESÍDUOS DE
AGROTÓXICOS E MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS DE
ORIGEM ANIMAL POR LC-MS/MS**

elaborada por

Osmar Damian Prestes

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

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Renato Zanella (Orientador, UFSM)

Prof^a. Dr^a. Carol Hollingworth Collins (UNICAMP)

Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (UNICAMP)

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

Prof. Dr. Roger Wagner (UFSM)

Santa Maria, 03 de março de 2011

DEDICATÓRIA

“Nossa vida é um caminho cheio de incertezas,
as quais ninguém é capaz de prever,
por isso mais importante do que as coisas
que se tem na vida é quem temos na vida.

Dedico este trabalho
a todas as pessoas importantes e
que fizeram a diferença na minha vida.”

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella agradeço a orientação neste trabalho, o apoio, o incentivo e a amizade, sempre se dispondo em ajudar incondicionalmente, propiciando um ambiente de trabalho favorável para discussão e análise de idéias e resultados.

À Profa. Dra. Martha Bohrer Adaime, co-orientadora deste trabalho, a quem não tive dificuldades em admirar, pela simplicidade ao lado de destacada sabedoria e principalmente pela forma como trabalha essas virtudes.

Aos colegas do LARP, em especial a Lucila, Giovana, Débora, Juliana, Danieli, Daniela, Guilherme, Felipe e Fábio agradeço por ter conhecido todos vocês, pela troca de idéias, experiências e pela convivência.

À Caroline Friggi pela amizade, troca de idéias constante e por sua colaboração em todas as etapas deste trabalho.

À Márcia Botega pela convivência, pela parceria inigualável, pela cumplicidade e forte vínculo que se criou, pelas longas conversas e risadas. Você tornaram os obstáculos mais amenos e as conquistas mais saborosas e divertidas.

À Profa. Dra. Antônia Garrido Frenich e ao Prof. Dr. Roberto Romero do Grupo de Química Analítica de Contaminantes da Universidad de Almeria/Espanha, pela amizade, ensinamentos e acolhida em seu grupo de pesquisa. E aos amigos Rocio, Maribel, Nieves, Maria, Padilla. ¡Muchas Gracias!

Ao Prof. Dr. Ednei Primel, Prof. Dr. Roger Wagner e ao Dr. Ubiratan Flores pelas valiosas sugestões e comentários no exame de qualificação.

Aos membros da banca Profa. Dra. Carol H. Collins, Profa. Dra. Isabel C. S. F. Jardim e Prof. Dr. Roger Wagner pelas excelentes contribuições e comentários na banca examinadora da defesa desta tese.

Aos meus antigos professores que me ensinaram com prazer e dedicação parte do que sei.

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

A minha família, em especial a minha mãe que, assumindo responsabilidades de pai e mãe desde muito cedo, ensinou-me a cultivar os princípios e valores de honra, verdade e força. Em você sempre encontrei o melhor exemplo de sacrifício, dedicação e disposição sem limites. Por isso, lhe dedico este trabalho.

À todos os demais familiares e amigos, e a cada um que de alguma forma torceu por mim e assim ajudou-me a fortalecer e concretizar este sonho.

Ao CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro e pela possibilidade de realizar o Estágio de Doutorado na Universidad de Almeria/Espanha.

A Deus, que tanto me ajudou, dando-me saúde, paciência, entendimento e dirigindo meus caminhos, muitas vezes colocando pessoas especiais em minha vida.

RESUMO

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

MÉTODO RÁPIDO PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS E MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL POR LC-MS/MS

AUTOR: OSMAR DAMIAN PRESTES
ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA

Data e Local da Defesa: 03 de março de 2011, Santa Maria.

Atualmente, uma das maiores barreiras comerciais que o Brasil tem encontrado para a comercialização de seus produtos da cadeia do agronegócio é a falta de informações sobre a presença de resíduos em alimentos produzidos no país. Devido a complexidade das matrizes de origem animal e das baixas concentrações dos agrotóxicos e medicamentos veterinários presentes, há uma grande necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos eficientes e confiáveis para a identificação e quantificação dos resíduos.

Neste estudo avaliou-se a faixa de linearidade das curvas analíticas (8 níveis de concentração e 6 injeções cada), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), efeito matriz, bem como precisão e exatidão, em termos de percentual de recuperação, para 91 agrotóxicos e 9 medicamentos veterinários analisados e validados pelo método QuEChERS e Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial em amostras de carne, fígado, rim, leite e ovo. Para isso, efetuou-se a fortificação dos alimentos previamente homogeneizados, com soluções contendo os 100 compostos, em 3 níveis de fortificação (10, 25 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$), 6 réplicas para cada nível, e aplicou-se o método de extração. A extração pelo método QuEChERS modificado consistiu na pesagem de 10,0 g da matriz (para leite 10 mL), 10 mL de acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético e procedeu-se a agitação manual e vigorosa, por cerca de 1 min. Acrescentou-se 4,0 g de sulfato de magnésio anidro e 1,7 g de acetato de sódio anidro, repetindo-se a agitação. Foram, posteriormente, centrifugados por 8 min (3500 rpm), após 4 mL de extrato foram transferidos para outro tubo contendo 600 mg de sulfato de magnésio anidro e 500 mg C_{18} , repetindo a agitação e a centrifugação. O extrato foi diluído (1:1) na fase móvel, e em seguida analisado por LC-MS/MS.

As curvas analíticas, preparadas no solvente e nos extratos das matrizes avaliadas, apresentaram linearidade adequada entre 1,0 e 250,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, com valores de coeficiente de determinação maiores que 0,995. O método apresentou valores de recuperação satisfatórios entre 70 e 120% e ($\text{RSD} \leq 20\%$) para cerca de 85% dos compostos em todas as matrizes nos níveis de 10, 25 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (para leite $\mu\text{g L}^{-1}$). Em geral, o método apresentou valor de LOQ_m de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ($\mu\text{g L}^{-1}$).

Portanto, concluiu-se que o método proposto pode ser aplicado de forma eficiente para a determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários nas diferentes matrizes avaliadas, sem a necessidade de alteração do método desenvolvido foi eficiente para a extração e *clean-up* dos extratos de carne, fígado, rim, leite e ovo, uma vez que apresentou desempenho satisfatório em ambas as matrizes, dependendo da técnica de detecção utilizada.

Palavras-chave: QuEChERS, LC-MS/MS, agrotóxicos, medicamentos veterinários

ABSTRACT

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

RAPID SIMULTANEOUS DETERMINATION METHOD FOR PESTICIDES AND VETERINARY DRUGS RESIDUES IN FOOD OF ANIMAL ORIGIN BY LC-MS/MS

AUTHOR: OSMAR DAMIAN PRESTES
ADVISOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA
Date and Place: March 3rd, 2011, Santa Maria.

Currently, one of highest trade barriers that Brazil has found for the marketing of their products from the agribusiness chain is the lack of informations on the presence of residues in foods produced in the country. Due to the complexity of the matrices of animal origin and the low concentrations of pesticides and veterinary drugs present, there is a great need to develop efficient and reliable analytical methods for identification and quantification of residues.

In this study we evaluated the linearity range of standard curves (eight concentration levels and six injections each), limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), matrix effect and the precision and accuracy, in terms of percent recovery for 91 pesticides and 9 veterinary drugs analyzed and validated by the QuEChERS method and Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry in meat, liver, kidney, milk and egg samples. For this, we performed the fortification of previously homogenised samples with solutions containing 100 compounds in three fortification levels (10, 25 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$), 6 replicates for each level, and applied the method extraction. The modified QuEChERS extraction method consist weighing 10 g of the matrix (10 mL for milk), 10 mL of acetonitrile containing 1% of acetic acid (v/v) and shake handly and vigorously for about 1 min. After, 4 g of anhydrous magnesium sulfate and 1.7 g anhydrous sodium acetate, repeating the agitation. After centrifugation for 8 min (3500 rpm), 4 mL of extract were transferred to another tube containing 600 mg of anhydrous magnesium sulfate and 500 mg C_{18} , repeating the agitation and centrifugation. The extract was diluted (1:1) in the mobile phase, and then analyzed by LC-MS/MS. Analytical curves prepared in solvent and in all matrix extracts, showed adequate linearity between 1.0 and 250.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, with determination coefficients greater than 0.995. The method showed satisfactory recovery values between 70 and 120% ($\text{RSD} \leq 20\%$) to about 85% of the compounds in all matrices at levels 10, 25 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (for milk $\mu\text{g L}^{-1}$). In general, the method presented LOQ_m value of 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ($\mu\text{g L}^{-1}$). Therefore, we concluded that the proposed method can be applied efficiently for the determination of pesticide and veterinary drugs residues in the different evaluated matrices without any modification of the method.

Keywords: QuEChERS, LC-MS/MS, pesticides, veterinary drugs

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação das etapas das principais versões do método QuEChERS (A) original, (B) acetato e (C) citrato..... 37
- Figura 2 - Representação esquemática do ensaio 1 (método QuEChERS acetato) para análise de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de origem animal..... 63
- Figura 3 - Representação esquemática do ensaio 2 (método QuEChERS citrato) para análise de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de origem animal..... 64
- Figura 4 - Representação esquemática do ensaio 3 (método QuEChERS modificado) para análise de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de origem animal..... 65
- Figura 5 - Cromatogramas totais obtidos por LC-MS/MS a partir de solução analítica ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) preparada em A) acetonitrila e nos extratos “branco”, obtidos pelo método QuEChERS modificado, em B) carne, C) fígado, D) rim, E) leite e F) ovo..... 76
- Figura 6 - Cromatograma obtido por LC-MS/MS modo MRM, para uma solução analítica ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) preparado em extrato de leite “branco”. Em destaque a visualização dos sinais individuais de alguns compostos com as respectivas transições de fortificação..... 77
- Figura 7 - Representação da praticidade de operação do método QuEChERS..... 79
- Figura 8 - Representação do método QuEChERS modificado utilizado para extração dos agrotóxicos e medicamentos veterinários nas amostras de carne, fígado, rim, leite e ovo..... 81
- Figura 9 - Percentual de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carne, que apresentam faixas de recuperação de <70%, 70-

	120%, >120%, após ensaios de fortificação e recuperação extraídos com o método QuEChERS modificado.....	89
Figura 10 -	Percentual de agrotóxicos e medicamentos veterinários em fígado, que apresentam faixas de recuperação de <70%, 70-120%, >120%, após ensaios de fortificação e recuperação extraídos com o método QuEChERS modificado.....	92
Figura 11 -	Percentual de agrotóxicos e medicamentos veterinários em rim, que apresentam faixas de recuperação de <70%, 70-120%, >120%, após ensaios de fortificação e recuperação extraídos com o método QuEChERS modificado.....	95
Figura 12 -	Percentual de agrotóxicos e medicamentos veterinários em leite, que apresentam faixas de recuperação de <70%, 70-120%, >120%, após ensaios de fortificação e recuperação extraídos com o método QuEChERS modificado.....	98
Figura 13 -	Percentual de agrotóxicos e medicamentos veterinários em ovo, que apresentam faixas de recuperação de <70%, 70-120%, >120%, após ensaios de fortificação e recuperação extraídos com o método QuEChERS modificado.....	101
Figura 14 -	Estrutura dos compostos ácidos analisados.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Ordem cronológica dos principais métodos de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos.....	33
Tabela 2 -	Informações dos padrões analíticos sólidos de agrotóxicos e medicamentos veterinários utilizados.....	57
Tabela 3 -	Gradiente utilizado para eluição dos compostos.....	61
Tabela 4 -	Condições empregadas no sistema cromatográfico LC-MS/MS..	71
Tabela 5 -	Agrotóxicos e medicamentos veterinários quantificados por LC-MS/MS modo ESI (+/-) e modo de aquisição MRM, tempo de retenção, íons precursores, íons produtos e energia de colisão para as duas transições monitoradas.....	73
Tabela 6 -	Percentual de compostos que apresentaram recuperações médias (70-120%) e RSD ($\leq 20\%$) obtidos para os três ensaios de extração.....	80
Tabela 7 -	Coefficientes de determinação (r^2) das curvas analíticas, obtidos para os agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados por LC-MS/MS, a partir das soluções de 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0 e 250,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	82
Tabela 8 -	Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carne.....	87
Tabela 9 -	Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em fígado.....	90
Tabela 10 -	Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em rim.....	93
Tabela 11 -	Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do	

	método de extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em leite.....	96
Tabela 12 -	Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em ovo.....	99
Tabela 13 -	Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método QuEChERS modificado.....	104
Tabela 14 -	Avaliação do efeito matriz percentual dos agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados por LC-MS/MS modo EI positivo, a partir de soluções preparadas em acetonitrila e nos extratos das matrizes avaliadas.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists
- APCI - Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*
- API - Ionização a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*
- APPI - Fotoionização a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*
- ASE – Extração Acelerada por Solvente, do inglês *Accelerated Solvent Extraction*
- BCPC – British Crop Protection Council
- C₁₈ - Sílica modificada com hidrocarboneto linear C₁₈, octadecilsilano
- CAD – Dissociação Ativada por Colisão, do inglês
- CI – Ionização Química, do inglês *Chemical Ionization*
- CID – Dissociação Induzida por Colisão, do inglês *Collisionally Activated Dissociation*
- DAD - Detecção por Arranjo de Diodos, do inglês *Diode Array Detection*
- D-SPE - extração em fase sólida dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*
- EI – Ionização Eletrônica, do inglês *Electron Ionization*
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- ESI - Ionização por Eletronebulização, do inglês *Electrospray Ionization*
- ESI(-) - Ionização por Eletronebulização no modo negativo, do inglês *Electrospray Ionization Negative Mode*
- ESI (+) - Ionização por Eletronebulização no modo positivo, do inglês *Electrospray Ionization Positive Mode*
- EUA – Estados Unidos
- FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
- FDA – Food and Drug Administration
- FVO – Food and Veterinary Office
- GARP - Grupo de Analistas de Resíduos de Agrotóxicos
- GC - Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

GC-ECD - Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Gas Chromatography with Electron Capture Detection*

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 Sequencial, do inglês *Gas Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*

GC-NPD - Cromatografia Gasosa com Detecção Nitrogênio e Fósforo, do inglês *Gas Chromatography Nitrogen Phosphorus Detection*

GPC – Cromatografia por Permeação em Gel, do inglês *Gel Permeation Chromatography*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICH - Conferência Internacional sobre Harmonização, do inglês *International Conference on Harmonisation*

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

ISO – Organização Internacional para Padronização, do inglês *International Standard Organization*

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

JECFA – Joint Expert Committee on Food Additives

LARP - Laboratório de Análise de Resíduos de Agrotóxicos

LC - Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LC-MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial, do inglês *Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry*

LLE - Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*

LMR - Limite Máximo de Resíduos

LOD - Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOD_i - Limite de Detecção do instrumento, do inglês *Limit of Detection of Instrument*

LOD_m - Limite de Detecção do método, do inglês *Limit of Detection of Method*

LOQ - Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

LOQ_i - Limite de Quantificação do Instrumento, do inglês *Limit of Quantification of Instrument*

LOQ_m - Limite de Quantificação do método, do inglês *Limit of Quantification of Method*

LVI – Injetor de Grande Volume, do inglês *Large Volume Injection*

MAE – Extração Assistida por Microondas, do inglês *Microwave Assisted Extraction*

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeCN – Acetonitrila

MRM - Monitoramento de reações múltiplas, do inglês *Multiple Reactions Monitoring*

MS - Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

MSPD – Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*

n – número de replicatas

n.q. – não quantificado

OMC – Organização Mundial do Comércio

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCI – Ionização Química Positiva, do inglês *Positive Chemical Ionization*

pH - Potencial hidrogeniônico

PLE – Extração com Líquido Pressurizado, do inglês *Pressurized Liquid Extraction*

PNCRC – Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes de Origem Animal

PSA - Amina primária secundária, do inglês *Primary Secondary Amine*

PTV – Temperatura Programada de Vaporização, do inglês *Programmed Temperature Vaporized*

QuEChERS - Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe

r^2 - coeficiente de determinação

rpm - rotações por minuto

RSD - Desvio Padrão Relativo, do inglês Relative Standard Deviation

RSD_{pi} - Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

RSD_r - Desvio Padrão Relativo para Repetitividade

SANCO - Directorate General for Health and Consumer Affairs

SBSE – Extração sortiva em barra de agitação, inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*

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

SIM - Monitoramento do Íon Selecionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*

SIM – Monitoramento do Íon Selecionado, do inglês *Single Ion Monitoring*

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

SPME – Microextração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*

t_R - tempo de retenção

UE – União Européia

UFMS – Universidade Federal de Santa Maria

UV - Ultravioleta

v/v - Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 A importância do agronegócio para o Brasil	21
2.1.1 O setor da carne bovina no Brasil.....	22
2.1.2 O setor do leite bovino no Brasil.....	23
2.1.3 A avicultura no Brasil.....	24
2.2 Agrotóxicos	25
2.3 Medicamentos Veterinários	27
2.4 Resíduos e contaminantes em alimentos	29
2.5 Programas de monitoramento de resíduos e contaminantes em alimentos no Brasil	30
2.6 Métodos multirresíduo para determinação de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos	31
2.6.1 Método QuEChERS.....	35
2.6.1.1 Método QuEChERS original.....	36
2.6.1.2 Modificações do método QuEChERS.....	39
2.6.1.3. Versatilidade e praticidade do método QuEChERS.....	41
2.6.1.4. Limitações do método QuEChERS.....	42
2.7 Técnicas cromatográficas para a determinação de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos	43
2.7.1 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas.....	43
2.7.2 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas.....	45
2.7.2.1 Fontes de ionização utilizadas no acoplamento LC-MS.....	45
2.7.2.1.1 Ionização por eletrobulização.....	46
2.7.2.1.2 Ionização química a pressão atmosférica.....	47
2.7.2.1.3 Fotoionização a pressão atmosférica.....	47
2.7.2.2 Dissociação Induzida por Colisão (CID).....	48

2.8 Validação de Métodos Analíticos	49
2.8.1 Seletividade.....	50
2.8.2 Linearidade e Curva Analítica.....	51
2.8.3 Limite de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ).....	52
2.8.4 Exatidão.....	52
2.8.5 Precisão.....	53
3 MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.1 Instrumentação	54
3.2 Reagentes, solventes e materiais utilizados	55
3.3 Processamento das amostras	55
3.4 Preparo das soluções analíticas	56
3.5 Otimização do sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de origem animal	60
3.5.1 Escolha da fase móvel.....	61
3.5.2 Condições do sistema de detecção.....	61
3.6 Otimização do método QuEChERS para análise simultânea de agrotóxicos em medicamentos veterinários em amostras de origem animal	62
3.6.1 Ensaio 1.....	62
3.6.2 Ensaio 2.....	63
3.6.3 Ensaio 3.....	64
3.7 Validação do método QuEChERS modificado para análise de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal	66
3.7.1 Seletividade.....	66
3.7.2 Determinação da Linearidade das Curvas Analíticas.....	66
3.7.3 Determinação da Estimativa do LOD e LOQ do instrumento e do método QuEChERS modificado.....	66
3.7.4 Ensaios de fortificação utilizando o método QuEChERS modificado para avaliação da exatidão.....	67

3.7.5 Precisão (repetitividade e precisão intermediária).....	69
3.7.6 Avaliação do efeito matriz.....	69
3.8 Aplicação do método.....	70
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	71
4.1 Otimização do sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal.....	71
4.2 Condições de Análise por LC-MS/MS.....	72
4.3 Método de extração QuEChERS modificado otimizado.....	78
4.3.1 Avaliação dos procedimentos de extração.....	78
4.4 Método de extração otimizado.....	80
4.5 Validação do método QuEChERS modificado.....	81
4.5.1 Seletividade.....	82
4.5.2 Curva analítica e linearidade.....	82
4.5.3 Determinação da estimativa do LOD e LOQ do instrumento e do método.....	85
4.5.4 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão do método.....	86
4.5.5 Precisão (repetitividade e precisão intermediária).....	103
4.5.6 Efeito matriz em LC-MS/MS.....	108
4.6 Aplicação do método.....	113
5 CONCLUSÕES.....	114
TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS.....	116
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118

1 INTRODUÇÃO

O cenário mundial da produção de alimentos revela o grande interesse da sociedade quanto à inocuidade do produto final a ser consumido. Os acontecimentos envolvendo a contaminação de alimentos, como foi o caso de benzeno na água e em sucos de frutas, nitrofuranos em carne de frango, cloranfenicol no mel, entre outros, há muito têm despertado a atenção do consumidor (WHO, 2010). Este quadro tem forçado os países a estabelecerem normas legislativas rígidas visando garantir o consumo de alimentos seguros por parte da população.

Quando se fala em resíduos e contaminantes em alimentos, faz-se referência a uma grande variedade de substâncias. Há muito tempo a agropecuária lança mão de artifícios envolvendo aplicação de agrotóxicos e medicamentos veterinários durante o processo de produção. Essas substâncias podem permanecer no alimento na forma original ou, ainda, como subprodutos ou metabólitos, quando degradados ou biotransformados.

Atualmente, uma das maiores barreiras comerciais que o Brasil tem encontrado para a comercialização de seus produtos da cadeia do agronegócio é a falta de dados científicos sobre a presença de resíduos e contaminantes em alimentos produzidos no país. De acordo com o relatório da missão de representantes da União Européia (UE) realizada no Brasil em março de 2008, várias foram as observações, ajustes e/ou implementações propostos, a fim de que o Brasil tenha uma harmonização no seu plano de controle de resíduos e contaminantes em produtos de origem animal (FVO, 2010). As modificações, propostas visam suprir as exigências dos principais parceiros comerciais do país (EUA e UE), além disponibilizar ao mercado interno produtos de qualidade. Entre as solicitações e/ou recomendações presentes no relatório pode-se citar:

- 1) necessidade de recursos humanos qualificados, para a geração e reprodução de conhecimentos em análise química na área de resíduos e contaminantes em alimentos;
- 2) necessidade de implementação de métodos analíticos que representem o estado da arte em análise de resíduos e contaminantes em alimentos;
- 3) acreditação e validação dos métodos de análise utilizados, a fim de obter resultados reconhecidos por organismos internacionais;

- 4) aumento do número de compostos a serem analisados em alimentos de origem animal.

Considerando a importância do agronegócio para a economia do Brasil, do uso de agrotóxicos e medicamentos veterinários para o controle de pragas e doenças, bem como a consequente possibilidade destes contaminarem os alimentos e o homem, os objetivos deste trabalho foram: (i) otimizar e validar um método de extração (baseado nos fundamentos do método QuEChERS) para determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários utilizando Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Série (LC-MS/MS); (ii) demonstrar a aplicabilidade do método otimizado na determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (carne bovina, fígado bovino, rim bovino, leite bovino e ovo).

Este estudo torna-se relevante devido à existência de poucos trabalhos científicos sobre a extração simultânea de resíduos de diferentes classes. Além disso, este trabalho contribuirá para o desenvolvimento de método analítico validado empregando técnicas modernas de extração e determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários por LC-MS/MS. Por este motivo, monitorar as possíveis contaminações em amostras de alimentos tornou-se um assunto de extrema relevância, devido ao risco que estes compostos oferecem à saúde humana, além da persistência no meio ambiente e tendência de bioacumulação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A importância do agronegócio para o Brasil

O agronegócio, entendido como a soma dos setores produtivos com os de processamento do produto final e os de fabricação de insumos, responde por 26,4% do Produto Interno Bruto (PIB) do Brasil, além de ser responsável por 39% dos empregos gerados no país (MAPA, 2010).

A história revela que o Brasil desde a sua colonização caracteriza-se como um país agroexportador. De acordo com dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), as exportações do agronegócio cresceram 2,5 vezes nos últimos dez anos e renderam US\$ 76,4 bilhões de dólares em 2010. Este valor é 18% maior do que o registrado em 2009 (US\$ 64,7 bilhões) e supera em US\$ 4,6 bilhões o recorde anterior, conquistado em 2008, de US\$ 71,8 bilhões. As importações aumentaram 35,2%, passando de US\$ 9,9 bilhões, em 2009, para US\$ 13,4 bilhões em 2010. Com isso, a balança comercial do agronegócio registrou superávit de R\$ 63 bilhões no ano passado (MAPA, 2010).

Os níveis tecnológicos alcançados pelos produtores rurais brasileiros atingiram patamares expressivos que podem ser mensurados pelo aumento da produtividade no campo. Isso explica, por exemplo, o fato de o Brasil ter conseguido dobrar sua produção agropecuária. Este desempenho no campo só foi possível devido a investimentos em pesquisa, novas tecnologias e utilização de insumos (sementes, adubos, agrotóxicos e medicamentos veterinários) de primeira linha disponíveis para o setor (GUANZIROLI, 2008).

A melhoria da competitividade da agricultura e produção animal no Brasil, sobretudo nos últimos dez anos e o próprio empenho do governo e da iniciativa privada em estimular e divulgar o produto agropecuário brasileiro no exterior tem proporcionado o aumento das exportações. Para aumentar a participação dos produtos agrícolas brasileiros no mercado internacional, além do trabalho promocional desenvolvido em conjunto com a iniciativa privada, o governo tem atuado junto a Organização Mundial do Comércio (OMC) no sentido da eliminação das barreiras comerciais nos países importadores (GUANZIROLI, 2008).

Para a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization, FAO*), com a atual taxa de crescimento da população mundial haverá a necessidade de dobrar a produção de alimentos a cada 50 anos. O Brasil é um dos poucos países com elevado potencial para suprir este aumento de demanda. Entre as vantagens que o país apresenta pode-se citar: elevada oferta de áreas agriculturáveis com solo, relevo e clima favoráveis, avanço recente em pesquisas e no desenvolvimento de variedades adaptadas aos cultivos regionais e consolidação do binômio de exploração lavoura-pecuária (FAO, 2010).

O agronegócio brasileiro é altamente competitivo e demonstra elevado grau de crescimento, porém necessita da adoção de procedimentos mais eficazes para a manutenção da qualidade, visto que a segurança alimentar e qualidade dos produtos em grande parte advêm das barreiras técnicas aplicadas pelos países importadores dos produtos agropecuários brasileiros. Este fato está mudando práticas e também a população brasileira está se tornando cada vez mais exigente (LOURENÇO, 2010). Segundo levantamento realizado pelo MAPA, o mercado interno terá um forte crescimento. Haverá, assim, uma dupla pressão sobre o aumento da produção nacional, o crescimento do mercado interno e as exportações do país (MAPA, 2010).

2.1.1 O setor da carne bovina no Brasil

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC), o Brasil tem um rebanho bovino de cerca de 190 milhões de cabeças, em contínuo crescimento e tem apresentado avanços nos índices de produtividade. O custo de produção do bovino brasileiro se situa dentre os mais baixos do mundo, o que traz uma grande vantagem competitiva. A bovinocultura de corte representa a maior fatia do agronegócio brasileiro, gerando faturamento de mais de R\$ 50 bilhões/ano e cerca de 7,5 milhões de empregos (ABIEC, 2010).

O setor de carnes no Brasil modificou-se radicalmente nas últimas décadas. A pecuária bovina, apesar de ainda não incorporar tão rapidamente as novas tecnologias de produção e gestão, tem evoluído significativamente, com aumento da produtividade do rebanho e modernização de muitas empresas rurais. Estes avanços foram resultados de mudanças no mercado consumidor de alimentos e mudanças da própria economia (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

A pecuária bovina do Brasil vem batendo recordes consecutivos de exportação e, em 2010, foram exportadas 1,864 milhão de toneladas, resultando em US\$ 4,795 bilhões. As previsões da Assessoria de Gestão Estratégica do MAPA é que o Brasil amplie nos próximos anos a participação no mercado mundial de carne bovina. O Brasil deve consolidar a liderança mundial nas exportações de carne bovina em volume e em receita (MAPA, 2010).

Apesar dos bons indicadores econômicos, a carne bovina brasileira tem enfrentado uma série de restrições sanitárias em alguns dos principais mercados importadores Estados Unidos (EUA) e União Européia (EU). Estima-se que o país deixou de exportar até US\$ 2 bilhões em carne bovina até o fim de 2010. Somente com os entraves impostos pela UE, o "prejuízo" acumulado desde 2008 é calculado em US\$ 1 bilhão (MAPA, 2010).

Entre os meses de maio e dezembro de 2010, o mercado americano embargou toda a exportação de carne industrializada proveniente do Brasil. Neste período o Brasil deixou de exportar 33,8 mil toneladas de carne industrializada (US\$ 76,34 milhões) devido a presença de resíduos de medicamentos veterinários acima dos valores permitidos (ABIEC, 2010).

A solução dos problemas da pecuária brasileira passa, necessariamente, pela organização da cadeia produtiva e por melhorias profundas nas práticas de manejo aplicadas pelo setor produtivo. O conjunto de agentes que compõe a cadeia produtiva da carne apresenta grande heterogeneidade: de pecuaristas altamente capitalizados a pequenos produtores, de frigoríficos com alto padrão tecnológico, capazes de atender a uma exigente demanda externa, a abatedouros que preenchem requisitos mínimos da legislação sanitária (ABIEC, 2010).

2.1.2 O setor do leite bovino no Brasil

A importância que a atividade leiteira adquiriu no país é incontestável, tanto no desempenho econômico como na geração de empregos permanentes. A produção brasileira, em 2009, foi de 29,1 bilhões de litros, gerando um valor bruto superior a R\$ 15 bilhões (IBGE, 2010). O setor primário envolve cerca de cinco milhões de pessoas, considerando, também, os 1,3 milhões de produtores de leite.

Duas características são marcantes na pecuária de leite brasileira: a primeira é que a produção ocorre em todo o território nacional. Existe informação de produção de leite em 554 microrregiões, das 558 consideradas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). A segunda característica é que não há um padrão de produção. A heterogeneidade dos sistemas de produção é muito grande e ocorre em todas as unidades da federação. Existe desde propriedades de subsistência, sem técnica e produção diária menor que dez litros, até produtores comparáveis aos mais competitivos do mundo, com tecnologias avançadas e produção diária superior a 60 mil litros (EMBRAPA, 2008; CNA, 2010).

O Brasil sempre atuou no mercado internacional como um dos maiores importadores de leite. Porém, a partir do crescimento da produção e dos ganhos na produtividade, o país passou a ser exportador de leite, uma virada comercial importante, que poderá trazer uma série de benefícios para diversos elos da cadeia produtiva, além de consolidar a posição do país no mercado internacional de produtos lácteos (PONCHIO *et al.*, 2005).

2.1.3 A avicultura no Brasil

No Brasil, a avicultura emprega mais de 4,5 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do PIB nacional. A importância social da avicultura no Brasil se verifica também pela presença maciça no interior do país, principalmente nos estados do Sul e Sudeste. Em muitas cidades a produção de frangos é a principal atividade econômica (BRAZILIAN CHICKEN, 2010).

Em 2009 a produção brasileira atingiu a marca de 10,9 milhões de toneladas, garantindo ao Brasil uma posição entre os três maiores produtores mundiais de carne de frango, juntamente com EUA e China. Desse total, cerca de 65% permanecem no mercado interno, o que comprova a força dessa indústria para o país. O consumo per capita de carne de aves no Brasil está em aproximadamente 39 quilos por ano. Nas exportações, o Brasil mantém, desde 2004, a posição de maior exportador mundial, tendo terminado 2009 com a marca de 3,6 milhões de toneladas embarcadas para mais de 150 países (IBGE, 2010).

Visando atender às crescentes exigências dos importadores, as empresas exportadoras brasileiras do setor passaram a investir em melhoria na genética, em

novas tecnologias e em processos que aumentassem a eficiência de toda a cadeia produtiva. O alto nível tecnológico alcançado pela avicultura nacional, notadamente a de corte, colocou a atividade em posição privilegiada em relação a outras atividades pecuárias desenvolvidas no Brasil, com nível de produtividade internacional. Em 2009, os três principais países produtores de frango no mundo, EUA, China e Brasil, responderam por 54% da produção mundial (BRAZILIAN CHICKEN, 2010).

De acordo com os dados da Pesquisa Pecuária Municipal, realizada pelo IBGE, em 2009, o Estado de São Paulo foi o principal produtor de ovos no Brasil (860,9 milhões de dúzias), seguido por Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul. A produção brasileira de ovos em 2009 foi de 3,3 bilhões de dúzias. O crescimento da produção e da qualidade deste produto habilitam o Brasil para um mercado gigantesco de ovos e sub-produtos de ovos frescos e processados. O setor produtivo de ovos brasileiros está voltado para o mercado externo e deverá atender às diretivas da UE e de outros prováveis países compradores do produto. Trata-se de uma padronização para granja, fábricas de ração, entrepostos, indústrias de conserva de ovos, entre outros elos da produção (IBGE, 2010).

2.2 Agrotóxicos

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

No Brasil (2002), o Decreto nº 4.074 regulamenta a Lei nº 7802/1989 e estabelece que os defensivos agrícolas, ou agrotóxicos, são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas

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

Observa-se uma diferença importante entre as duas definições já que aquela efetuada pela FAO contempla substâncias que possam vir a serem utilizadas não apenas diretamente durante o plantio, mas em todas as etapas do cultivo propriamente dito e também após a colheita, como nas etapas de armazenamento, transporte, distribuição e processamento do alimento.

Os agrotóxicos estão sendo largamente utilizados desde a metade do século XX. De acordo com os dados do British Crop Protection Council (BCPC), aproximadamente 860 substâncias ativas são comercializadas como agrotóxicos nos mais variados tipos de formulações. Estas substâncias estão divididas em mais de 100 classes, sendo benzoiluréias, carbamatos, organofosforados, organoclorados, piretróides, sulfoniluréias e triazinas os grupos mais importantes (BCPC, 2010).

As características físico-químicas dos agrotóxicos são consideravelmente diferentes, uma vez que podem apresentar caráter ácido, básico e neutro. Estes compostos podem conter em sua estrutura: halogêneos, fósforo, enxofre ou nitrogênio, heteroátomos que possuem uma grande relevância no método de detecção destes compostos. Um grande número de agrotóxicos é muito volátil, outros não, e esta grande diversidade causa sérios problemas no desenvolvimento de um método “universal” para análise de resíduos destes compostos.

O uso de agrotóxicos para a proteção das mais diferentes culturas permitiu um aumento no volume de produção, porém, o aparecimento de resíduos destas substâncias nos alimentos é, atualmente, uma das principais preocupações de saúde pública. Sendo assim, programas internacionais para o controle legal de agrotóxicos estão estabelecidos para prevenir a contaminação de gêneros alimentícios. Portanto, o controle de resíduos de agrotóxicos em alimentos é um dos mais importantes aspectos de segurança alimentar.

O emprego de agrotóxicos na agricultura tem seus benefícios econômicos, uma vez que asseguram o controle e o combate de pragas e doenças, protegendo a qualidade da produção. Por outro lado, os consumidores destes produtos agrícolas podem estar expostos aos agrotóxicos, devido a presenças destes nos alimentos.

Entre os efeitos nocivos causados ao homem, por estas substâncias, pode-se citar: diversos tipos de câncer, danos ao sistema nervoso central, problemas no sistema reprodutivo e locomotor, deficiência mental, entre outros.

A utilização de agrotóxicos contribui para o aumento na produção, porém há uma preocupação crescente com seus efeitos adversos no ambiente, tais como contaminação dos recursos hídricos, impactos em organismos não alvos e na saúde humana. Os agrotóxicos podem apresentar diferentes rotas de degradação no meio ambiente e serem transferidos em partes para diferentes compartimentos ambientais. Quando aplicados em pulverização, os agrotóxicos podem ser transportados pelo vento para locais distantes dos quais foram aplicados. Quando aplicados diretamente no solo, podem ser levados pela água de chuva ou irrigação e atingir os mananciais de águas superficiais ou as reservas subterrâneas através da lixiviação com a água. Embora existam muitas possibilidades para que os agrotóxicos sejam transportados no ambiente e contaminem as fontes de água, nem todos os produtos apresentam a mesma persistência e mobilidade no ambiente.

2.3 Medicamentos Veterinários

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica os medicamentos veterinários como toda e qualquer substância aplicada, em qualquer animal destinado à produção de alimentos, com fins terapêuticos, profiláticos ou de diagnóstico, ou para modificar as funções fisiológicas, de comportamento ou como promotor de crescimento (ANVISA, 2010).

Na pecuária moderna, os medicamentos veterinários têm sido amplamente utilizados e administrados como aditivos em água ou nos alimentos dos animais destinados ao consumo humano, com o intuito de prevenir o aparecimento de doenças. Além disso, agentes promotores do crescimento são aplicados para estimular o crescimento dos animais, o que é considerado uma prática excessiva no uso desses medicamentos (STOLKER & BRINKMAN, 2005).

É evidente que há benefícios importantes para os pecuaristas ao usar estas substâncias, geralmente, o uso desses medicamentos melhora a absorção e a conversão dos alimentos levando a um ganho em proteínas e sais minerais

estimulando o crescimento dos animais. No entanto, essas substâncias podem permanecer nos alimentos derivados dos animais tratados, levando a resíduos destes nos alimentos.

Muitos destes compostos podem exercer efeitos genotóxicos, carcinogênicos, endócrinos, entre outros. A agência *Food and Drug Administration* (FDA) e a UE exigem um severo controle no uso destes compostos envolvendo a produção de alimentos. De acordo com estes órgãos reguladores, estas substâncias são classificadas em dois grupos, o grupo A compreende as substâncias proibidas (estilbenos, agentes antitireóideos, esteróides, lactonas do ácido resorcílico, beta-antagonistas e nitrofuranos), e o grupo B compreende outros medicamentos veterinários autorizados, mas que possuem limites estabelecidos (bactericidas, anti-helmínticos, carbamatos e piretróides, sedativos, anti-inflamatórios não esteróides, organoclorados e organofosforados) (FDA, 2010; FVO, 2010).

Os antibióticos, na sua maioria, atuam como promotores do crescimento e têm sido utilizados de forma abusiva levando principalmente ao desenvolvimento de resistência microbiana no homem. Por outro lado, os anti-helmínticos, embora sejam usados para o seu propósito, no tratamento de infecções parasitárias, também têm causado sérios problemas, devido ao não cumprimento do prazo de carência e da posologia aplicada ao animal. Em geral, animais que são alimentados com antibióticos ganham peso mais rápido, são menos suscetíveis a infecções bacterianas e apresentam maior eficiência alimentar (ARCURI & MANTOVANI, 2010). A maioria dos antibióticos utilizados em ruminantes não afeta o metabolismo do animal diretamente, e os efeitos benéficos geralmente estão relacionados com ação indireta do medicamento veterinário, melhorando as condições de higiene do animal ou influenciando a digestão dos alimentos (ARCURI & MANTOVANI, 2010). Além de inibir patógenos responsáveis por quadros clínicos que diminuem o desempenho do animal, vários antibióticos utilizados como aditivos alimentares em bovinos afetam o metabolismo de alimentos no rúmen e alteram os produtos de fermentação de grupos microbianos específicos do trato gastrointestinal. A modificação da fermentação ruminal pode ser caracterizada como o principal efeito dos antibióticos adicionados à alimentação dos ruminantes. Desta forma, mais energia e nitrogênio são disponibilizados para o animal, resultando na melhora do desempenho e ganho de peso (ARCURI & MANTOVANI, 2010).

2.4 Resíduos e contaminantes em alimentos

De acordo com a norma NBR ISO 22000 o termo "segurança alimentar" descreve aspectos relacionados à inocuidade, ou seja, os alimentos não devem constituir vias de exposição a perigos que possam causar danos à saúde, sejam eles agentes biológicos, físicos ou químicos. Entre os perigos químicos existentes, destacam-se os resíduos e contaminantes (SPISSO *et al.*, 2008).

A FAO define o termo "resíduo" como a fração de uma substância, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento proveniente de produtos agrícolas e/ou animais tratados com estas substâncias (CODEX ALIMENTARIUS, 2010).

O termo "contaminante" é definido como qualquer substância que não seja intencionalmente adicionada aos alimentos. Os contaminantes podem estar presentes nos alimentos como resultado das etapas de produção, transformação, acondicionamento, embalagem, transporte e armazenagem do alimento (CODEX ALIMENTARIUS, 2010).

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

As organizações internacionais envolvidas com a saúde pública, como o *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA), órgão da FAO, e o FDA dos EUA, estabelecem as diretrizes para os Limites Máximos de Resíduos (LMR) (DENOBILI, 2004). Estes são definidos como a concentração máxima de resíduo resultante do uso de um pesticida ou medicamento veterinário em produtos agropecuários. O LMR é a quantidade legalmente permitida, ou reconhecida, como aceitável no alimento e é estabelecido para cada composto aprovado para uso em um determinado alimento. O LMR sempre está correlacionado à Ingestão Diária Aceitável. Esta é obtida a partir de ensaios de experimentação avaliando-se a toxicidade, teratogenicidade, e carcinogenicidade destes compostos não intencionais

(DENOBILI, 2004). No Brasil, a competência para estabelecer limites máximos de resíduos em alimentos, seja de medicamentos veterinários ou de agrotóxicos, é do Ministério da Saúde através da ANVISA (2010).

O conhecimento da exposição da população a estes compostos é de fundamental importância para nortear as ações de controle e monitoramento visando a proteção do consumidor.

2.5 Programas de monitoramento de resíduos e contaminantes em alimentos no Brasil

O agronegócio nacional vem incorporando novas tecnologias na produção de alimentos de origem animal, incluindo manejos diferenciados na utilização de pastagens, alimentação, genética e na saúde animal. Aliado a este fato, há uma preocupação crescente com questões relacionadas a presença de resíduos e contaminantes em animais destinados a produção de alimentos.

O Brasil possui destaque na produção agropecuária, estabelecendo-se como um dos principais produtores de alimentos de origem animal do mundo. Assim, a produção animal no país vem se profissionalizando e dispondo de ferramentas e tecnologias para maximizar a produção animal. Para este intento, a utilização de medicamentos de uso veterinário constitui uma importante ferramenta para o tratamento de infecções e para aumento de produtividade.

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC), foi instituído pela Portaria nº 51, de 6 de maio de 1986, sendo sua adequação realizada pela Portaria nº 527, de 15 de agosto de 1995. É um programa do MAPA, que visa garantir a saúde do consumidor por meio de um monitoramento da presença de resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes ambientais em produtos de origem animal (carnes, leite, pescado, e mel) (MAPA, 2010). Um dos principais objetivos do PNCRC é integrar o esforço destinado à melhoria da produtividade e da qualidade destes alimentos colocados à disposição da população brasileira, e secundariamente, proporcionar ao país, condições de se adequar do ponto de vista sanitário, às regras do comércio

internacional de alimentos, preconizadas pela Organização Mundial do Comércio (OMC) e outros órgãos como FAO e Organização Mundial da Saúde (OMS).

As principais metas do PNCRC caminham no sentido da verificação do uso correto e seguro das drogas veterinárias, de acordo com as boas práticas veterinárias recomendadas e das tecnologias utilizadas nos processos de incrementação da produção e produtividade pecuária. As ações deste plano estão direcionadas para se conhecer e evitar a violação dos níveis de segurança ou dos LMR de substâncias com uso autorizado, bem como a ocorrência de quaisquer níveis de resíduos de compostos químicos de uso proibido no país (MAPA, 2010).

Deve-se ressaltar a importância do PNCRC para o país, visto que o não cumprimento das metas anuais previstas para o controle de resíduos acarreta sérios problemas e embargos nas exportações para os principais parceiros comerciais do país (UE e EUA).

Em 2002 a ANVISA, iniciou a implantação do Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet). Este visa avaliar o potencial de exposição do consumidor aos resíduos de medicamentos veterinários pela ingestão de alimentos de origem animal adquiridos no comércio. Entre os alimentos selecionados, está priorizado o leite bovino, porém outras matrizes como carnes (frango, bovina e suína), pescado, ovo e mel, deverão fazer parte do escopo monitorado, devido ao grande consumo destes produtos (ANVISA, 2010).

2.6 Métodos multirresíduos para determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos.

Nos últimos anos, ocorreu um rápido desenvolvimento de novos métodos analíticos visando à determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Estes avanços tiveram como objetivo a substituição dos métodos tradicionais de análise de resíduos, que apresentavam como características a morosidade de suas diversas etapas, emprego de grandes volumes de solvente, alto custo, etc. (PRESTES *et al.*, 2009).

Geralmente, a complexidade da composição dos alimentos, ocasiona dificuldades para a quantificação dos agrotóxicos, sendo necessária a realização de

uma etapa de limpeza do extrato, após extração com solvente. Essa etapa é fundamental, uma vez que reduz as interferências e o efeito matriz, além de diminuir a necessidade de manutenção do sistema cromatográfico. No sentido de melhorar a análise quantitativa, esforços foram realizados no desenvolvimento de novos métodos de extração e limpeza (PRESTES *et al.*, 2009).

As limitações na análise de resíduos de agrotóxicos foram minimizadas após o desenvolvimento dos métodos multirresíduo. Estes apresentam como vantagens a possibilidade de analisar um grande número de compostos, altos percentuais de recuperação dos analitos, remoção dos possíveis interferentes da amostra, boa precisão e robustez, baixo custo, rapidez, facilidade e segurança (utilizam pequenos volumes de solventes de baixa toxicidade). A Tabela 1 apresenta em ordem cronológica o desenvolvimento destes métodos.

O primeiro método multirresíduo para extração de agrotóxicos foi desenvolvido por Mills *et al.* (1963), nos laboratórios do FDA, nos EUA. O método baseia-se em uma extração com acetonitrila (MeCN), sendo utilizado basicamente na determinação de compostos organoclorados apolares em amostras não-gordurosas. A adição de água ao extrato, seguida de uma etapa subsequente de partição, promovida através da adição de solventes apolares (éter de petróleo ou hexano). Além de água, açúcares e sais também são removidos do extrato nesta etapa.

O desenvolvimento e aplicação de agrotóxicos com características mais polares, como por exemplo, organofosforados e organonitrogenados, demandou novos métodos de extração multirresíduo que englobassem estes compostos. Em 1975, Luke *et al.* desenvolveram o denominado método de Luke, que consiste em uma etapa de extração de 100 g de amostra utilizando acetona (200 mL), seguida de uma partição líquido-líquido com solventes apolares (éter de petróleo e diclorometano), sendo utilizados 100 mL de cada. Com o objetivo de obterem-se maiores percentuais de recuperação para os compostos polares, adicionou-se cloreto de sódio (NaCl) na fase aquosa para favorecer a transferência destes para a fase orgânica.

Tabela 1. Ordem cronológica dos principais métodos de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos

Década	Método	Extração e Limpeza	Características
1960	Mills	O método baseia-se em uma extração com acetonitrila sendo utilizado basicamente na determinação de compostos organoclorados em amostras não-gordurosas. A etapa de limpeza é realizada através da utilização de uma coluna de florisil [®] .	A extração é seguida por uma etapa de partição com éter de petróleo. Compostos organofosforados apresentavam baixos percentuais de recuperação quando analisados por este método.
	Storherr	Realizou-se algumas modificações no método de Mills. A extração é realizada com acetonitrila, porém o éter de petróleo é substituído por diclorometano. A etapa de limpeza é realizada com carvão ativado	Este método possibilitou que o método de Mills fosse aplicado a compostos organoclorados e organofosforados em frutas e vegetais.
1970	Método para determinar organoclorados, organofosforados e nitrogenados	Utiliza acetona na etapa de extração. Este processo é seguido de uma partição líquido-líquido utilizando diclorometano ou mistura de diclorometano e éter de petróleo, a fim de remover da água. A etapa de limpeza é realizada com carvão ativado.	
	Luke	A extração dos agrotóxicos é realizada com acetona. Adiciona-se cloreto de sódio para saturar a fase aquosa, tendo como consequência maiores valores de recuperação dos compostos polares. A etapa de limpeza, quando realizada, é feita com coluna de florisil [®] .	Este é o primeiro método em que uma solução de cloreto de sódio foi adicionada ao extrato para promover o efeito "salting out".
1980		Esta época foi marcada pelo desenvolvimento de métodos que não exigiam a utilização de grandes quantidades de solventes clorados. Estes foram substituídos por outros, por exemplo, mistura 1:1 (v/v) de cicloexano e acetato de etila. Além disso, os solventes apolares foram substituídos por sais (Na ₂ SO ₄ , MgSO ₄ , NaCl, etc), durante o processo de partição. A extração em fase sólida (SPE, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>) começou a ser amplamente utilizada, substituindo muitos métodos baseados na extração líquido-líquido.	A acetona continua sendo o solvente mais utilizado na etapa de extração. Porém, há o desenvolvimento de métodos, nos quais a etapa de extração era realizada com acetonitrila e acetato de etila. A fim de melhorar os percentuais de recuperação dos compostos polares o sulfato de sódio (Na ₂ SO ₄) foi amplamente utilizado. Além disso, diversos procedimentos de limpeza foram desenvolvidos.
atual		Os avanços da química analítica em consonância com o conceito sustentabilidade levaram ao desenvolvimento de várias técnicas alternativas de extração como por exemplo a SFE, MAE, MSPD, SPME e ASE.	

Krijgsman & van de Kamp (1976), com o intuito de melhorar os resultados obtidos com o método de Luke, propuseram a extração de agrotóxicos utilizando acetato de etila com subsequente adição de sulfato de sódio anidro, obtendo maior rapidez, simplicidade, limpeza dos extratos e melhores valores de recuperação para os compostos polares, quando comparado ao método de Luke. A imiscibilidade do sistema acetato de etila - água tornou desnecessária a adição de solventes apolares. Todas estas vantagens fizeram deste o método oficial para extração multirresíduo de agrotóxicos em vários países europeus. Uma das desvantagens deste método é a quantidade de co-extrativos apolares tais como, lipídios e ceras, tornando necessária uma etapa posterior de limpeza utilizando Cromatografia por Permeação em Gel (*Gel Permeation Chromatography*, GPC), aumentando significativamente o tempo e o custo do preparo da amostra.

Na década de 1980, o *Food and Consumer Product Safety Authority* da Holanda desenvolveu em seu laboratório o método de extração mini-Luke, o qual é uma miniaturização do método de extração Luke original, omitindo-se a etapa de particionamento com cloreto de sódio (HIEMSTRA & KOK, 2007). O método consiste na extração de 15 g de frutas ou vegetais já processados, adicionando-se acetona (30 mL) seguida de agitação em homogeneizador Ultraturrax por cerca de 30 s, sendo posteriormente adicionados éter de petróleo (30 mL) e diclorometano (30 mL), agitando-se novamente por cerca de 30 s. A miniaturização deste método possibilitou a redução da quantidade de amostra, bem como de solventes utilizados. Entretanto, valores baixos de recuperação (< 70%) foram obtidos para agrotóxicos polares, como metamidofós, ometoato, monocrotofós entre outros. Como um método de extração alternativo, foi desenvolvida uma modificação do método de extração mini-Luke nos anos 90, no qual foi adicionado sulfato de sódio anidro na etapa de extração levando, assim, a uma melhor extração dos agrotóxicos polares (PRESTES *et al.*, 2009).

Durante os anos 1990, devido às fortes pressões de ambientalistas e também a fatores relacionados à saúde humana, ocorreu um grande desenvolvimento de métodos alternativos de extração baseados na redução do volume de solvente utilizado na etapa de extração. Entre estes novos métodos pode-se citar a Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE) (LANÇAS, 2004), a qual também tem sido empregada com frequência na etapa de purificação do extrato para amostras de alimentos. Outros métodos que foram desenvolvidos neste período também tinham

como objetivo a simplificação de etapas como, por exemplo, Dispersão da Matriz em Fase Sólida (*Matrix Solid Phase Dispersion*, MSPD) (BARKER *et al.*, 1989) e Microextração em Fase Sólida (*Solid Phase Micro Extraction*, SPME) (ARTHUR & PAWLISZYN, 1990). Em 1999, foi proposta por Baltussen *et al.* (1999) a Extração Sortiva em Barra Magnética (*Stir Bar Sorptive Extraction*, SBSE), que fornece baixos limites de detecção, especialmente para analitos hidrofóbicos. A Extração por Fluido Supercrítico (*Supercritical Fluid Extraction*, SFE) (MENDIOLA *et al.*, 2007), Extração Acelerada por Solventes (*Pressurized Liquid Extraction*, PLE) (CARABIAS-MARTÍNEZ *et al.*, 2005) e Extração Assistida por Micro-ondas (*Microwave Assisted Extraction*, MAE) (CAMEL, 2000) são exemplos de métodos que apresentam, dentre outras características, elevada eficiência, entretanto geralmente demandam investimento considerável em instrumentação.

Os novos métodos que têm como base a instrumentação, sendo a extração muitas vezes automatizada, demandam analistas treinados e etapas de limpeza entre extrações, o que implica em um maior tempo de análise. Outra desvantagem geralmente apresentada é o escopo limitado de agrotóxicos que podem ser extraídos sob determinadas condições. Sendo assim, estes procedimentos, podem ser empregados em algumas aplicações, mas estão distantes de serem considerados ideais para um método multirresíduo (WARDENCKI, *et al.* 2004).

2.6.1 Método QuEChERS

Em 2003, Anastassiades *et al.* (2003) com o objetivo de superar limitações práticas dos métodos multirresíduo existentes, na época introduziram um novo procedimento de preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos denominado QuEChERS (**Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe**) sendo que a pronúncia, de acordo com os autores, deve ser "*catchers*" (MAJORS, 2007). Esse método, que tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, explora as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna.

Com o objetivo de atender aos rigorosos Limites Máximos de Resíduos, estabelecidos por legislações internacionais, este método foi idealizado para gerar extratos que pudessem ser analisados por Cromatografia Líquida e/ou Cromatografia Gasosa acopladas à Espectrometria de Massas (GC-MS/MS e LC-

MS/MS) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). A praticidade e os excelentes resultados fornecidos pelo método QuEChERS em combinação com estas técnicas, ajudaram na popularização deste método e dos seus conceitos. De acordo com o *ISI Web of Knowledge* (2010), o artigo no qual este método foi descrito pela primeira vez já possui mais de 210 citações.

2.6.1.1 Método QuEChERS original

Durante o desenvolvimento do método QuEChERS, Anastassiades *et al.* (2003) revisaram as condições comumente utilizadas na análise multirresíduo de agrotóxicos e propuseram este novo método de preparo de amostra, baseado nas seguintes etapas: extração com acetonitrila, seguida da partição, promovida pela adição de sais (ex. sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e cloreto de sódio (NaCl)). Um novo método de limpeza denominado Extração em Fase Sólida Dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction*, D-SPE) foi proposto juntamente com o método QuEChERS. Na Figura 1 A estão representadas as principais etapas do método QuEChERS original.

A utilização de acetonitrila como solvente possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos (MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004). A acetonitrila proporciona a extração de uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades e, quando acidificada, permite recuperações satisfatórias de agrotóxicos que geralmente apresentam problemas de estabilidade. Outra grande vantagem é que acetonitrila é mais adequada para LC-MS/MS do que acetona e acetato de etila e pode ser utilizada sem problemas na análise por GC-MS/MS. Assim, acetonitrila foi escolhida como solvente de extração para o método QuEChERS (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; LEHOTAY *et al.*, 2001).

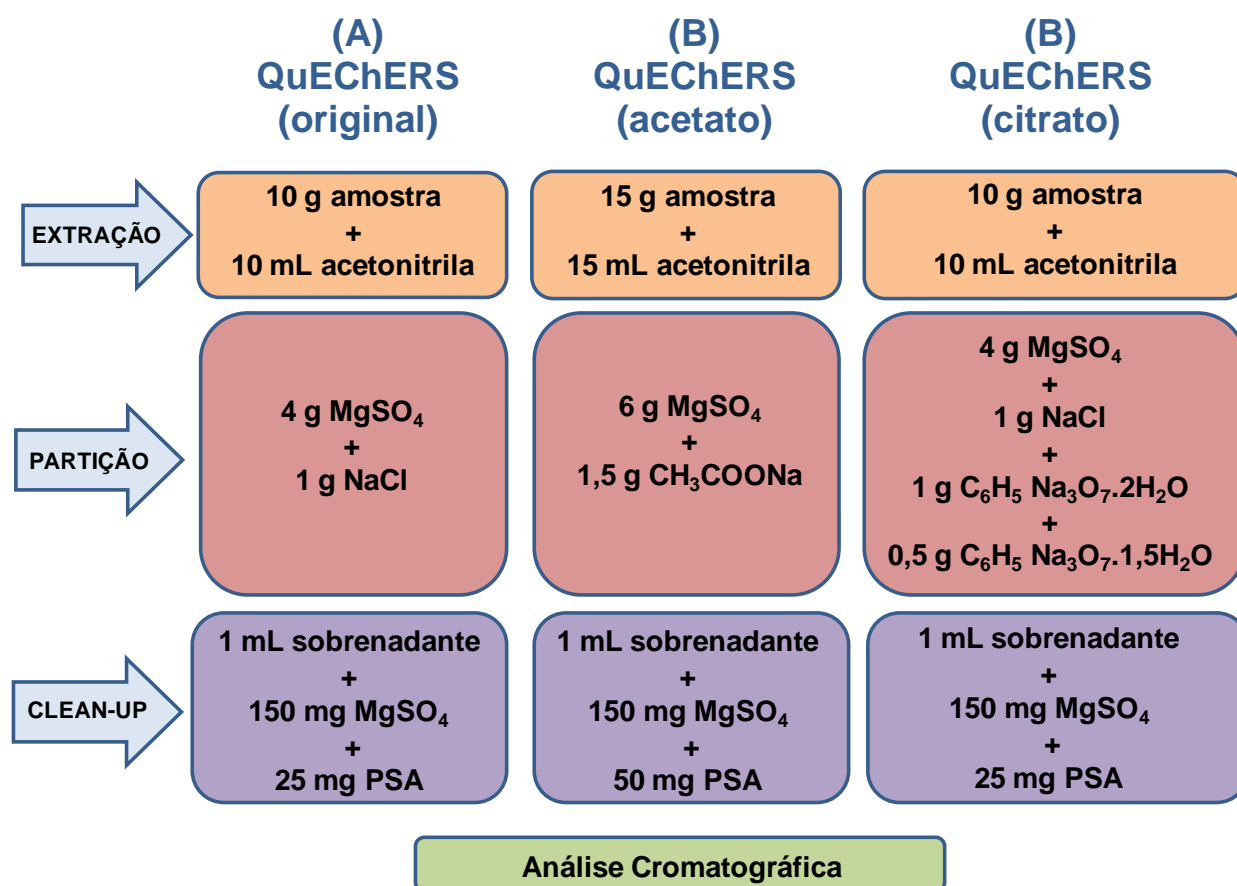


Figura 1. Representação das etapas das principais versões do método QuEChERS (A) original, (B) acetato e (C) citrato.

A maioria dos métodos multirresíduo de preparo de amostra empregam processadores, como o Ultraturrax, durante o procedimento de extração. O procedimento de agitação manual ou com auxílio do Vortex possui várias vantagens em relação à agitação mecânica, tais como, possibilidade de realizar a extração a campo; a extração ocorre em um único frasco fechado não expondo o analista; rapidez, uma vez que não há necessidade de lavagem do homogeneizador no intervalo entre as extrações. Portanto, no método QuEChERS a agitação pode ser manual ou utilizando Vortex.

A adição de sais para promover o efeito “*salting out*” é utilizada em vários métodos multirresíduo. Dependendo da natureza do solvente utilizado na etapa de partição obtém-se melhores percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, bem como, a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (GHIP, 1996; STAHN, 2000; PIZZUTTI *et al.*, 2007).

Nos métodos multirresíduo que utilizam acetona, a partição é controlada através de uma combinação de NaCl e solventes apolares, porém têm como desvantagens a diluição do extrato e o consumo de um maior volume de solvente. Os métodos multirresíduo que utilizam acetonitrila, desenvolvidos até então, não empregam adição de nenhum tipo de solvente apolar no processo de partição (SCHENCK *et al.*, 2008; KOESUKWIWAT, 2008). Na extração com acetonitrila, a adição de sais é muito conveniente uma vez que é rápida, fácil, apresenta baixo custo, tem a grande vantagem de não diluir o extrato da amostra e proporciona a separação das fases orgânica e aquosa.

A utilização de sais secantes como sulfato de sódio (Na_2SO_4) tem a finalidade de melhorar a recuperação de agrotóxicos polares (ANDERSSON & PALSHEDEN, 1991). A escolha do MgSO_4 no desenvolvimento do método QuEChERS foi devido a maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais. Além de reduzir o volume de fase aquosa, 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 (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

A etapa de limpeza é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico, uma vez que componentes não-voláteis da matriz podem ficar aderidos no sistema de injeção e também na coluna

cromatográfica, alterando a resposta do sistema e aumentando a frequência de manutenções técnicas no equipamento (SAITO *et al.*, 2004; UENO *et al.*, 2004).

Tradicionalmente a etapa de limpeza emprega SPE, a qual utiliza cartuchos ou colunas que contêm entre 250 e 1000 mg de sorvente (HYÖTYLÄINEN, 2008). Esta técnica envolve operação manual, uso de diferentes solventes para lavagem do sorvente, etapas de evaporação e secagem. Muitos fatores afetam a precisão quando se trabalha com SPE, entre eles o ajuste do sistema de vácuo e a vazão dos solventes. Esta técnica, quando automatizada, requer manutenção frequente, além dos sistemas hoje disponíveis apresentarem um custo considerável (HYÖTYLÄINEN, 2003).

Ao contrário dos métodos já existentes para limpeza com SPE que utilizam cartuchos ou colunas, a D-SPE permite que a limpeza e a redução de água residual sejam efetuadas de uma forma rápida e simultânea (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Esta etapa de remoção de água proporciona um extrato final de menor polaridade, facilitando assim a precipitação de co-extrativos polares. O sorvente PSA (*Primary Secondary Amine*) retém as interferências da matriz, sendo que depois da agitação manual e centrifugação o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). A estrutura bidentada do PSA tem um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário. Como resultado, a retenção de ácidos graxos livres e de outros compostos polares presentes na matriz é muito forte. Uma limpeza eficiente garante uma maior vida útil para insensores e colunas cromatográficas, reduzindo assim a contaminação do sistema cromatográfico e minimizando o efeito matriz (MARTINEZ-VIDAL *et al.*, 2006; SHIMELIS *et al.*, 2007).

2.6.1.2 Modificações do método QuEChERS

Durante o desenvolvimento da primeira versão do método QuEChERS (Figura 1 A), apenas 25 agrotóxicos comumente analisados por GC-MS/MS foram avaliados (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Apesar de a versão original ter demonstrado excelentes resultados em diferentes tipos de amostras, (LEHOTAY *et al.*, 2005a; CVUA, 2006; PAYÁ *et al.*, 2007) algumas aplicações mostraram que certos compostos apresentavam problemas de estabilidade e/ou recuperação de acordo

com o pH da matriz (LEHOTAY *et al.*, 2005ab; ANASTASSIADES *et al.*, 2007). Desta forma, durante o período de otimização do método, percebeu-se que a utilização de tampões (pH 5,0) promoviam recuperações satisfatórias (>70%) para compostos dependentes do pH (por ex.: pimetrozina, imazalil e tiabendazol), independente da matriz utilizada (LEHOTAY, 2005b; ANASTASSIADES *et al.*, 2007).

A adição de uma etapa de tamponamento foi a primeira modificação proposta para o método QuEChERS, com o objetivo de melhorar os percentuais de recuperação (70-120%) (MAJORS, 2010). Lehotay *et al.* (2005b) desenvolveram o método “QuEChERS-acetato” (Figura 1 B), no qual o efeito tamponante (pH 4,8) é promovido pela adição de acetato de sódio. Este método foi adotado em 2007 como método oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (AOAC, 2007). Anastassiades *et al.* (2007) propuseram o método “QuEChERS-citrato” (Figura 1 C), este utiliza uma mistura de citrato de sódio di e sesquidratados como responsáveis pelo efeito tamponante (pH 5,0-5,5). Em 2008, o *European Committee for Standardisation*, oficializou o método “QuEChERS citrato” como método de referência na UE (CEN, 2008).

Outra modificação bastante relevante foi a adição do sorvente C₁₈ (octadecilsilano), (LEHOTAY *et al.*, 2005c) juntamente com PSA na etapa de D-SPE, para promover uma limpeza mais efetiva de algumas matrizes, em especial aquelas que contêm gordura (CUNHA *et al.*, 2007; LEHOTAY *et al.*, 2006; LEHOTAY *et al.*, 2010a; LEHOTAY *et al.*, 2010b; KOESUKIWIWT *et al.*, 2010). A combinação do método QuEChERS com limpeza do extrato à baixa temperatura, visando a redução dos co-extrativos lipídicos, também foi empregada com sucesso. Porém, a adição do sorvente C₁₈ na etapa de D-SPE é mais rápida e fácil, e promove uma remoção igualmente eficaz dos lipídios (LEHOTAY *et al.*, 2010a).

Além destas modificações, a redução do teor de clorofila nos co-extrativos provenientes de amostras com pigmentação verde, foi outro avanço efetuado na etapa de limpeza, (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; ANASTASSIADES *et al.*, 2007), obtido através da adição de uma pequena quantidade de carbono grafitizado (CUNHA *et al.*, 2007; LEHOTAY *et al.*, 2006, LEHOTAY *et al.*, 2010a). Outra modificação realizada na etapa de limpeza foi o uso de uma maior quantidade de PSA na etapa de D-SPE em amostras de cereais como objetivo de remover, de

forma mais eficiente, os ácidos graxos co-extraídos (MARTÍNEZ-GALERA *et al.*, 2008).

2.6.1.3. Versatilidade e praticidade do método QuEChERS

Ensaio de proficiência empregando este método comprovaram sua robustez, sendo o método transferido com sucesso entre os laboratórios participantes (MARTÍNEZ-GALERA *et al.*, 2008).

As modificações já realizadas no método QuEChERS indicam um futuro promissor na análise multirresíduo de agrotóxicos em alimentos e outros produtos agrícolas. Além dos trabalhos citados, o método tem sido empregado de forma satisfatória quando aliado à Espectrometria de Massas, porém não está limitado somente a este tipo de detector.

Hernández-Borges *et al.* (2009), utilizaram o método QuEChERS e GC-NPD para a determinação de 11 agrotóxicos em banana, com valores de limite de quantificação (LOQ) na faixa de 0,01 a 0,14 mg kg⁻¹, percentuais de recuperação entre 67 e 118% e RSD ≤ 16%. O método QuEChERS também foi utilizado na extração de 36 agrotóxicos em amostras de mel, seguida da determinação por GC-ECD e GC-NPD. Obtiveram-se percentuais de recuperação entre 70 e 120% e RSD ≤ 22% (BARAKAT *et al.*, 2007).

Os inseticidas diflubenzurona e triflumurona foram extraídos de amostras de tomate empregando-se o método QuEChERS e determinados por LC acoplada a sistema de fotoderivatização pós-coluna com detector de quimioluminescência. A recuperação ficou entre 79,7 e 94,2%, com valores de RSD ≤ 10%, valores de LOD na faixa de 0,05 a 0,26 µg kg⁻¹ e valores de LOQ entre 10 e 20 µg kg⁻¹ (LEHOTAY, 2007).

2.6.1.4. Limitações do método QuEChERS

Nos últimos anos, o método QuEChERS iniciou uma verdadeira transformação no preparo de amostra para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos, uma vez que suas características de simplicidade, rapidez, baixo custo, entre outras, foram incorporadas em vários laboratórios de rotina. Porém, ao ser comparado com métodos comumente utilizados para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos, observa-se que a relação entre a quantidade de amostra:solvente (1 g mL^{-1}) obtida no método QuEChERS é baixa se comparada com os valores típicos de 2 a 5 g mL^{-1} dos métodos que utilizam solventes apolares (HIEMSTRA & KOK, 2007). Portanto, se a matriz não é uma fonte de ruídos na etapa de análise isto pode conduzir, no método QuEChERS, a valores de LOQ mais elevados, para o mesmo volume de injeção. Entretanto, considerando a alta detectabilidade das técnicas cromatográficas disponíveis atualmente, principalmente com GC-MS/MS e LC-MS/MS, o método QuEChERS é adequado para o preparo de amostra visando o controle de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

Além disso, a acetonitrila é um excelente solvente para os métodos de determinação que utilizam LC-MS/MS, mas não é ideal para análises empregando GC-MS/MS. Porém, os avanços nos sistemas de injeção permitem a combinação perfeita entre o método QuEChERS e GC-MS/MS. Entre eles pode-se citar a injeção de grandes volumes (*Large Volume Injection - LVI*), que permite a injeção de uma maior quantidade de extrato e conseqüentemente de analitos, promovendo um aumento significativo de detectabilidade. Outro avanço bastante significativo nos sistemas de injeção foi a possibilidade da realização de programação de temperatura de vaporização (*Programmed Temperature Vaporized, PTV*) que possibilita a obtenção de uma melhor resposta cromatográfica (FERNANDEZ-ALBA, 2005).

2.7 Técnicas cromatográficas acopladas à Espectrometria de Massas para a determinação de resíduos e contaminantes em alimentos

2.7.1 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

Desde os anos 70 têm-se utilizado a técnica de GC acoplada a sistemas clássicos de detecção como, por exemplo, captura de elétrons (*Electron Capture Detection*, ECD), nitrogênio e fósforo (*Nitrogen and Phosphorus Detection*, NPD) e fotometria de chama (*Flame Photometric Detection*, FPD) para a determinação de resíduos de agrotóxicos (ROMERO-GONZALEZ *et al.*, 2006; HERNÁNDEZ-BORGES *et al.*, 2007). Porém, muitos agrotóxicos que eram analisados por estes detectores, estão sendo substituídos por outros compostos que possuem, em geral, melhor ação e menor impacto ambiental, entretanto muitos quando analisados por GC, não são detectados ao nível de $\mu\text{g kg}^{-1}$ (ALDER *et al.*, 2006).

Atualmente, a técnica GC-MS é utilizada com frequência para determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos. A facilidade do acoplamento GC-MS, além da disponibilidade de um banco de espectros de massas padrão obtidos no modo de ionização por impacto de elétrons (*Electron Ionization*, EI) ajudaram na disseminação da técnica GC-MS (LEANDRO *et al.*, 2005; CHIARADIA *et al.*, 2008).

GC-MS é uma das principais ferramentas aplicadas em análise de resíduos de agrotóxicos por permitir que a confirmação e a determinação de um grande número de compostos sejam feitas simultaneamente. Os baixos LOD obtidos são consequência da alta seletividade promovida pelo uso de diferentes modos como, por exemplo, o modo SIM (*Selective Ion Monitoring*) que tem sido utilizado para determinar resíduos de agrotóxicos em alimentos (FERNANDEZ-ALBA, 2005; MERCER, 2005).

A ionização dos agrotóxicos em GC-MS pode ser realizada utilizando os modos EI e ionização química (*Chemical Ionization*, CI), positiva ou negativa. As vantagens da utilização do modo EI são a baixa influência da estrutura molecular na resposta e o grande número de fragmentos característicos que são gerados. Entretanto, o modo CI positivo ou negativo proporciona uma melhor seletividade para muitos agrotóxicos quando comparado com o modo EI. O modo CI é preferencialmente utilizado para a determinação de organo-halogenados, piretróides

e organofosforados. Este modo é menos utilizado em métodos multirresíduo, por não ser uma técnica de ionização universal, além de fornecer espectros contendo um pequeno número de fragmentos, oferecendo menos informação qualitativa (ALDER *et al.*, 2006).

Na seletividade, porém, interferências provenientes da matriz podem influenciar o resultado, e a identificação dos analitos pode ficar comprometida. Recentes avanços em MS propõem um aumento da especificidade, a partir da exclusão dos íons dos interferentes da amostra. Uma maior seletividade também é observada quando se utiliza CI, entretanto, a informação relacionada à estrutura dos compostos que estão sendo analisados também é diminuída (BEGUIN *et al.*, 2006).

Os íons que são formados, tanto por EI como por CI, precisam ser separados de acordo com suas razões m/z . Há 4 classes de analisadores (filtros de massas), que são utilizados para selecionar e filtrar os íons, sendo eles: rádio frequência (tanto quadrupolo quanto trapeamento de íons) (GARRIDO-FRENICH *et al.*, 2005); tempo de voo; transformada de Fourier e setor magnético, sendo que os mais utilizados são a rádio frequência e o tempo de voo (DIEZ *et al.*, 2006).

O uso de GC acoplada à Espectrometria de Massas em série (*Tandem Mass Spectrometry*, MS/MS) promove um aumento de seletividade em conjunto com uma redução do ruído, sem perder a capacidade de identificação, permitindo a análise de resíduos de agrotóxicos ao nível de traços na presença de interferentes provenientes da matriz. Esta técnica é particularmente utilizada na análise de amostras complexas, uma vez que permite a determinação de diferentes analitos coeluentes (MARTINEZ-VIDAL *et al.*, 2002). Nos últimos anos, vários avanços na área de instrumentação possibilitaram aos equipamentos um aumento de detectabilidade, sendo possível a identificação e quantificação de analitos em níveis inferiores aos estabelecidos pelos LMR (FERNANDEZ-ALBA, 2005).

O grande desafio para os analistas no desenvolvimento de um método multirresíduo é a obtenção de percentuais satisfatórios de recuperação dos analitos, bem como, a minimização das interferências através da utilização de métodos de extração e limpeza apropriados. Nos últimos anos, várias foram as aplicações e modificações realizadas no método QuEChERS, a fim de alcançar este objetivo.

2.7.2 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

No passado, os métodos que utilizavam LC eram aplicados com menor frequência na análise de resíduos de agrotóxicos, devido a uma menor seletividade e detectabilidade apresentada pelos detectores utilizados como, por exemplo, ultravioleta e arranjo de diodos, quando comparados aos métodos de GC existentes na época (ALDER *et al.*, 2006). Porém, o desenvolvimento de agrotóxicos polares, que apresentam em geral menor persistência e toxicidade quando comparados com os compostos apolares, exigiu a adequação dos métodos de análise existentes, uma vez que a maioria destes novos compostos não apresenta uma boa resposta quando analisados por GC (GARRIDO-FRENICH *et al.*, 2004). A potencialidade do acoplamento entre LC e MS já havia sido reconhecida há várias décadas, porém incompatibilidades relacionadas à vazão do eluente com relação à velocidade de bombeamento do sistema de vácuo e o projeto da fonte de íons do espectrômetro de massas fez com que a utilização desta técnica em análises de rotina ocorresse recentemente (CHIARADIA *et al.*, 2008). Este acoplamento oferece uma série de vantagens, dentre elas, elevada detectabilidade e seletividade (ALDER *et al.*, 2006).

2.7.2.1 Fontes de ionização utilizadas no acoplamento LC-MS

As fontes de ionização, inicialmente investigadas para o acoplamento LC-MS, foram baseadas no impacto eletrônico (EI) e na ionização química (CI) empregadas com sucesso no acoplamento GC-MS. Entretanto, devido às diferentes características existentes entre as fases móveis empregadas nas duas técnicas de separação (GC e LC), este acoplamento mostrou-se inadequado para análise de compostos em baixas concentrações, além de não apresentarem a robustez necessária (LANÇAS, 2009).

Desde o desenvolvimento de fontes de ionização que operam à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Ionization*, API) como, por exemplo, a ionização por eletronebulização (*Electrospray Ionization*, ESI) e a ionização química à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI), vários instrumentos robustos e confiáveis estão disponíveis (ALDER *et al.*, 2006; CHIARADIA *et al.*, 2008).

2.7.2.1.1 Ionização por eletronebulização

A ionização por eletronebulização (*electrospray*, ESI) permite a formação de íons na pressão atmosférica. Neste processo, a amostra é dissolvida, e pressurizada em um tubo capilar de aço inox, ao qual é aplicada uma voltagem tipicamente entre 3.000 e 5.000 V. Como resultado, o líquido emerge do capilar à pressão atmosférica, na forma de um aerossol. As gotículas formadas perdem sucessivamente o solvente (são dessolvatadas) e os íons fluem para o espectrômetro de massas induzidos pelos efeitos das atrações eletrostáticas e pela pressão reduzida. Neste processo, apenas a ionização ocorre à pressão atmosférica, o espectrômetro de massas se encontra sob “vácuo” (LANÇAS, 2009).

Os detalhes de como efetivamente ocorre o processo de eletronebulização ainda são motivos de muita discussão e controvérsia. Os dois mecanismos mais aceitos para explicar o fenômeno são o proposto por Dole (1968), também conhecido como mecanismo do resíduo de carga ou da fissão, e o proposto por Iribarne e Tomson (1976), conhecido como mecanismo da evaporação do íon. De acordo com Dole, à medida que as gotículas evaporam, sua carga permanece inalterada. Ainda de acordo com este mecanismo, como a tensão superficial das gotículas é incapaz de se opor às forças repulsivas resultantes da carga imposta, estas “explodem” em inúmeras gotículas menores, denominada “explosão” coulômbica. Este processo continua até que apenas um íon do analito permaneça; após a evaporação da última gotícula do solvente, forma-se um íon em fase gasosa (LANÇAS, 2009). De acordo com o mecanismo proposto por Iribarne e Tomson, pequenas gotículas também são formadas na explosão coulômbica, como proposto por Dole. A diferença principal entre estes modelos é que Iribarne e Tomson propõe que a partir da formação das gotículas, a força de campo elétrico na superfície destas é suficientemente elevada para removê-las da superfície, transferindo diretamente para a fase gasosa energeticamente mais favorável para íons solvatados (LANÇAS, 2009).

2.7.2.1.2 Ionização química à pressão atmosférica

A ionização química a pressão atmosférica (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) é uma técnica apropriada para determinação de massas molares menores do que 2000 unidades e da estrutura molecular. É aplicada para análise de moléculas iônicas, polares e apolares, podendo ser usada no modo positivo (*Positive Chemical Ionization, PCI*) e negativo (*Negative Chemical Ionization, NCI*) (PRIMER, 2004; FERNANDEZ-ALBA, 2005; NUÑEZ, 2005).

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

2.7.2.1.3 Fotoionização a pressão atmosférica

A fotoionização a pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Photoionization, APPI*) é aplicada na análise de compostos menos polares do que aqueles menos ionizáveis por APCI, podendo ser operada no modo positivo e negativo (PRIMER, 2004; FERNANDEZ-ALBA, 2005; NUÑEZ, 2005).

A APPI para LC-MS é relativamente uma técnica nova. Como a APCI, o vaporizador converte o eluato do cromatógrafo a líquido em uma fase gasosa. A descarga de uma lâmpada gera fótons em uma faixa estreita de energia de ionização. A faixa de energia é cuidadosamente escolhida para ionizar o maior número possível de moléculas do analito, enquanto minimiza a ionização das moléculas do solvente. Os íons resultantes passam através de um capilar de vidro para dentro do analisador de massas. APPI é aplicável para análise de muitos dos

compostos que são normalmente analisados por APCI. Também mostra uma possibilidade particular para análise de compostos não ionizados por APCI, como os hidrocarbonetos poliaromáticos. Uma fonte APPI é um complemento útil para as técnicas tradicionais de ionização na LC-MS, para aquelas amostras que apresentam pobre ou nenhuma ionização, usando técnicas tradicionais como ESI e APCI. Em todos os casos, a natureza do analito e as condições de separação têm uma forte influência sobre qual técnica de ionização (ESI, APCI ou APPI) irá promover os melhores resultados (PRIMER, 2004; FERNANDEZ-ALBA, 2005; NUÑEZ, 2005).

2.7.2.2 Dissociação Induzida por Colisão (CID)

As técnicas de ionização sob pressão atmosférica (API) citadas até aqui são todas chamadas de técnicas brandas de ionização, nas quais os espectros de massas resultantes são geralmente o íon molecular como os íons $(M+H)^+$, $(M-H)^-$, $(M + NH_4)^+$, a menos que técnicas de fragmentação sejam aplicadas. A informação resultante sobre a massa molar é importante, mas informações sobre a estrutura da molécula são geralmente necessárias (PRIMER, 2004; FERNANDEZ-ALBA, 2005; NUÑEZ, 2005).

Para obterem-se informações sobre a estrutura, os íons dos analitos são fragmentados através de colisões com moléculas neutras de um gás, num processo conhecido dissociação induzida por colisão (*Collision Induced Dissociation*, CID). Aplicam-se voltagens para se acelerar os íons dos analitos, assim com maior energia, para a colisão com o gás, gerando mais fragmentos (PRIMER, 2004; FERNANDEZ-ALBA, 2005; NUÑEZ, 2005).

Assim como ocorre com GC-MS/MS, a LC-MS/MS permite um aumento de seletividade e detectabilidade proporcionando o monitoramento de centenas de agrotóxicos em uma única análise. LC-MS/MS tornou-se uma ferramenta indispensável em laboratórios que trabalham com análise multirresíduo de agrotóxicos e medicamentos veterinários. Apesar do alto custo de aquisição e manutenção destes equipamentos, apresentam uma série de vantagens, entre elas alta eficiência analítica, menor tempo no desenvolvimento de métodos e elevada robustez. Nos últimos anos, vários estudos e determinações de resíduos de

agrotóxicos e medicamentos veterinários, utilizando o método QuEChERS e LC-MS/MS, têm sido realizados em alimentos de origem animal.

2.8 Validação de Métodos Analíticos

Métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a determinação de resíduos de contaminantes em alimentos como ferramenta principal para assegurar que os produtos estejam enquadrados nas determinações legais. Para que estes métodos garantam a disponibilidade de um alimento seguro, é preciso que sejam normalizadas e cumpram requisitos que garantam bons resultados. Com o objetivo de assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos, são delineados procedimentos de validação do processo analítico empregado, como garantia da qualidade das medições químicas, através da sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade (PASCHOAL *et al.*, 2008).

Os laboratórios que realizam as análises em alimentos precisam ter capacidade técnica comprovada para tal compromisso, a qual é garantida pelas normas de credenciamento estabelecidas por órgãos responsáveis, que no Brasil são representados pela ANVISA (2010a) e pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2010) que disponibilizam guias para procedimentos de validação de métodos analíticos (Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003, (ANVISA, 2003a) e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de 03/2003, (INMETRO, 2003). Há ainda órgãos internacionais, como União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, 2010), Organização Internacional para Padronização (ISO, 2010), Conferência Internacional em Harmonização (ICH, 2010), que também estabelecem procedimentos de validação como critério fundamental no credenciamento de laboratórios.

Atualmente, há vários conceitos e definições, provenientes tanto de pesquisadores (HILL & REINOLDS, 1999; LANÇAS, 2004) como de agências e normas reguladoras nacionais (INMETRO, 2003; ANVISA, 2010) e internacionais (ISO, 2010; CODEX ALIMENTARIUS, 2001), que objetivam responder questões como: qual a função da validação de métodos e de que maneira deve ser realizada.

Considerando-se as diversas e inúmeras áreas que necessitam gerar dados confiáveis, é consenso que esses conceitos e definições não estão completa e

rigidamente estabelecidos, mas continuam a evoluir e aprimorarem-se, no sentido de se efetuar a validação do método de maneira que atenda os objetivos e as necessidades para os quais o método é proposto (HILL & REINOLDS, 1999).

Ribani *et al.* (2004) apresentaram uma excelente revisão sobre validação de métodos como sendo um processo contínuo de avaliação dos métodos, desde a etapa de planejamento, passando pelo desenvolvimento e coleta de dados, até o monitoramento constante da aplicação e transferência deste.

O objetivo desse incessante cuidado nada mais é do que garantir que os dados gerados possuam a qualidade necessária, em termos de confiabilidade e rastreabilidade, entre outros, para o fim que se propõe. Caso não haja o cumprimento desse objetivo, ou seja, caso não seja assegurada a qualidade dos resultados analíticos, raramente este fato ocorrerá sem grandes consequências. Essas podem ser, desde a não acreditação do laboratório pelos órgãos competentes até enormes prejuízos financeiros relacionados às barreiras alfandegárias que podem ser impostas pelo comércio exterior.

Assim, deve-se selecionar, estudar e monitorar constantemente os parâmetros mínimos necessários para garantir a interpretação inequívoca dos resultados.

Alguns dos parâmetros envolvidos no processo de validação de métodos analíticos são: curva analítica, linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e de quantificação e seletividade.

2.8.1 Seletividade

Definida como a habilidade de um método para a determinação do analito, de forma exata, em presença de interferentes provenientes da matriz da amostra, a seletividade é um importante parâmetro especialmente na análise de amostras complexas, como na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (LANÇAS, 2004). Assim, também pode-se dizer que a seletividade é a habilidade dos métodos de extração, de purificação, de derivatização, do sistema de separação e detecção, em realizar a discriminação entre o analito de interesse e outros compostos (SANCO, 2010). A seletividade garante que o sinal analítico seja exclusivamente do composto de interesse. Se este parâmetro não for assegurado, a

linearidade, exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI *et al.*, 2004).

2.8.2 Linearidade e Curva Analítica

A linearidade de um método analítico pode ser definida como sendo a habilidade deste método em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma determinada faixa de concentração (INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

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

Para a maioria das técnicas cromatográficas, observa-se uma relação linear de primeira ordem entre a resposta instrumental medida (eixo y) (variável dependente) e a concentração do analito (eixo x) (variável independente). Essa relação produz uma equação de regressão linear $y = ax + b$, que relaciona as duas variáveis x e y e gera os coeficientes de regressão **a** (inclinação da curva) e **b** (interseção da curva analítica com o eixo y, quando $x = 0$). Essa equação é válida para um intervalo determinado de concentração do analito, independente da técnica instrumental utilizada. Também é possível calcular o coeficiente de correlação **r**, que pode ser utilizado para estimar a qualidade da curva analítica, uma vez que demonstra uma menor variação dos dados obtidos quanto mais próximo de 1 for o valor de **r** (RIBANI *et al.*, 2004). Valores de **r** iguais ou superiores a 0,99 e 0,90, são recomendados, respectivamente, pela ANVISA (2003b) e pelo INMETRO (2003). Já os valores do coeficiente de determinação r^2 são tidos como satisfatórios a partir de 0,98 (CHASIN *et al.*, 1998).

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

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

O LOD representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, e o LOQ expressam a menor concentração do analito que pode ser quantificada, ao empregar-se um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al.*, 2004). São geralmente expressos em unidades de concentração (CHASIN *et al.*, 1998).

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

Nesse estudo, a maneira utilizada para a obtenção da estimativa do LOD e do LOQ, tanto do instrumento como do método, está descrita no item 3.7.3.

2.8.4 Exatidão

É uma medida da concordância existente entre os dados obtidos em uma determinada medida e um valor de referência assumido como sendo o verdadeiro (RIBANI *et al.*, 2004).

A exatidão representa a existência de erros sistemáticos, e é um dos critérios mais importantes para o julgamento do desempenho de um método analítico.

Na indisponibilidade de material de referência certificado, a exatidão pode ser avaliada através dos ensaios de fortificação e recuperação (CODEX ALIMENTARIUS, 2001) (geralmente expressa em percentual), podendo ser calculada pela Equação 1.

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

onde:

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração usada para fortificação.

Em geral, são aceitos intervalos de recuperação entre 70 e 120%, com precisão de até 20% para a maioria dos métodos analíticos, inclusive para análise de resíduos de agrotóxicos (SANCO, 2010).

2.8.5 Precisão

É o termo geral utilizado para avaliar a dispersão dos resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou soluções analíticas de referência, analisadas em condições definidas (INMETRO, 2004).

A precisão pode ser numericamente expressa em termos de estimativa do desvio padrão relativo (RSD) (Equação 2).

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

onde:

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

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

N = número de medidas.

Para métodos empregados em determinações ao nível de traços, valores de RSD% de até 20% são aceitáveis (HUBER, 1998).

A precisão pode ser determinada em termos de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental deste trabalho consistiu na otimização e validação do Método QuEChERS para a extração simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (carne, fígado, rim, leite e ovos) e posterior quantificação por LC-MS/MS.

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

3.1 Instrumentação

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão descritos abaixo:

- ✓ Agitador Vortex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ✓ Balança analítica de precisão AND, modelo SV-200 (Japão);
- ✓ Centrífuga Thermo Fisher Scientific, modelo IEC CENTRA CL2 (Waltham, MA, USA);
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha e Eppendorf, Canadá);
- ✓ Processador de Alimentos VariMix (Targo, Espanha);
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3[®] (Millipore, Bedford, MA, USA).
- ✓ Sistema LC-MS/MS: Cromatógrafo a Líquido Varian 320-MS, equipado com:
 - ⇒ Detector MS, 320-MS TQ *Mass Spectrometer* com fonte API, utilizando o modo de ionização por eletronebulização (Varian, EUA);
 - ⇒ Amostrador automático ProStar 410, bomba quaternária 212-LC, forno para coluna e sistema de desgaseificação (Varian, EUA);
 - ⇒ Coluna analítica Pursuit XRS C₁₈, (100 x 2,0 mm d.i) e 2,8 µm de tamanho de partícula (Varian, EUA)
 - ⇒ Sistema de aquisição de dados através do *Software MS Workstation Version 6.0* (Varian, EUA);
 - ⇒ Sistema gerador de nitrogênio da marca Domnick Hunter LC/MS 12/2.

3.2 Reagentes, solventes e materiais utilizados

- ✓ Acetato de sódio anidro p.a. (J.T. Baker, Estados Unidos);
- ✓ Acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt, NJ, USA);
- ✓ Ácido acético glacial 96% (Merck, RJ, Brasil);
- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3[®] (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- ✓ Citrato de sódio diidratado (Sigma Aldrich, Estados Unidos);
- ✓ Cloreto de sódio p.a. (Merck, Brasil);
- ✓ Extran[®] neutro (Merck, Brasil);
- ✓ Formiato de Amônio (Sigma Aldrich, Estados Unidos);
- ✓ Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 mL;
- ✓ Gás argônio 6.0 usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS (White Martins, Brasil);
- ✓ Hidrogenocitrato de sódio sesquidratado (Sigma Aldrich, Estados Unidos);
- ✓ Metanol grau HPLC (Mallinckrodt, NJ, USA);
- ✓ Padrões sólidos dos agrotóxicos, conforme Tabela 2.
- ✓ Sorvente C₁₈ com tamanho de partículas de 40 µm (Varian, Estados Unidos);
- ✓ Sorvente PSA com tamanho de partículas de 40 µm (Varian, Estados Unidos);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro (J.T. Baker, Japão);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ✓ Vidrarias comum de laboratório;

3.3 Processamento das amostras

As amostras “branco” das matrizes avaliadas neste estudo foram adquiridas em supermercados de Santa Maria e processadas conforme descrito abaixo:

a) carne, fígado e rim: porções de 500 g foram processadas até completa homogeneização, com auxílio do processador VariMix, e a seguir foram acondicionadas em freezer (abaixo de – 4 °C), até sua utilização.

b) ovo: as amostras de ovo (sem a casca), após homogeneização com o processador VariMix, foram imediatamente submetidas ao processo de extração.

c) leite: não foi realizada nenhuma etapa prévia de processamento.

3.4 Preparo das soluções analíticas

A Tabela 2 apresenta o nome, grau de pureza, classe, grupo químico e LMR dos padrões analíticos sólidos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho.

Para o preparo das soluções analíticas estoques, efetuou-se o cálculo para determinar a quantidade de cada padrão sólido a ser pesado, para se obterem-se soluções individuais de cada composto, na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Prepararam-se individualmente, 10 mL da solução estoque 1000 mg L^{-1} de cada pesticida e medicamento veterinário, considerando a pureza dos padrões sólidos. A massa do padrão sólido pesado foi dissolvida em metanol grau HPLC e as soluções estoque foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura menor que $-4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após, foram preparadas soluções analíticas individuais de cada composto em estudo, na concentração de 100 mg L^{-1} , em metanol. A partir destas soluções, preparou-se uma mistura na concentração 5 mg L^{-1} contendo todos os compostos.

Tabela 2 - Informações dos padrões analíticos sólidos de agrotóxicos e medicamentos veterinários utilizados

n ^o	Pesticida	Pureza (%)	Classe	Grupo Químico	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
					MAPA	CODEX
1	2,4 D	99,0	H	Ácido ariloxialcanóico		10(O)
2	2,4,5 T	98,5	H	Ácido ariloxialcanóico		
3	3-OH carbofurano	98,6	I	Carbamato		
4	atrazina	99,0	H	Triazina		
5	azinfos etílico	97,7	I	Organofosforado	20(M)/50(L)	
6	azinfos metílico	99,0	I	Organofosforado	40(M)/20(L)	
7	azoxistrobina	99,0	F	Estrobirulina		
8	bentazona	97,0	H	Benzotiadiazinona		50(O)
9	bispiribaque	99,0	H	Ácido pirimidiniloxibenzoico		
10	bitertanol	98,5	F	Triazol		10(O)
11	boscalida	99,5	F	Carboxamida		
12	bromoconazole	99,0	F	Triazol		
13	buprofezina	99,0	I	Tiadiazinona		
14	carbaril	98,5	I	Carbamato	20(L)/3000(R)	1000(F)
15	carbendazina	99,0	F	Benzimidazol		50(O)
16	carbofurano	98,5	I	Carbamato	100(M)(L)	
17	carboxim	99,9	F	Anilida		
18	cianizina	99,0	H	Clorotriazina		
19	clomazone	98,5	H	Triazina		
20	cloranfenicol	98,5	A	Aminopropanodiol	0,3(O)	
21	clorimurrom	97,0	H	Sulfoniluréia		
22	clorpirifos etílico	99,5	I	Organofosforado	10(M)(L)	10(O)
23	clorpirifos metílico	97,0	I	Organofosforado	10(M)(L)	50(O)
24	clorprofam	99,5	H	Carbanilato		200(L)
25	deltametrina	99,0	I	Piretróide	500(G)/30(R)(F)	50(F)(R)/30(M)(L)/500(G)/30(F)/20(O)/50(L)
26	diazinona	99,0	I	Organofosforado	10(M)(L)/30(R)(F)	2000(G)/30(F)/20(O)/10

27	diclofluanida	99,0	F	Sulfamida		
28	difenoconazole	99,0	F	Triazol		
29	dimetoato	98,0	I	Organofosforado	50(L)	50(O)
30	epoxiconazole	99,0	F	Triazol		
31	etiona	96,5	I	Organofosforado		
32	fempropatrina	99,5	I	Piretróide	10(O)	
33	fempropimorfe	94,5	F	Morfolina	50(50)/300(F)	10(O)
34	fenarimol	97,5	F	Pirimidina		
35	fentiona	97,0	I	Organofosforado		
36	fipronil	96,5	I	Pirazol		20(O)
37	fluquiconazole	98,5	F	Triazol		
38	fluroxipir	96,5	H	Piridina		
39	flutalonil	99,0	F	Carboxamida	100(R)/200(F)	50(O)
40	imazalil	97,5	F	Imidazol		
41	imidacloprido	98,0	I	Neonicotinoide		20(O)
42	iprovalicarbe	97,5	F	Carbamato		
43	linurom	99,4	H	Úreia		
44	malationa	99,0	I	Organofosforado		
45	mecarbam	98,0	I	Organofosforado		
46	mepronil	99,0	F	Carboxamida		
47	meticonazole	99,0	F	Triazol		
48	metalaxil	99,5	F	Fenilamida		
49	metamidofos	98,5	I	Organofosforado	20(M)/10(L)	
50	metiocarbe sulfona	99,0	I	Carbamato		
51	metiocarbe sulfoxido	95,0	I	Carbamato		
52	metsulfurom metilico	99,0	H	Sulfoniluréia		
53	mevinfos	92,0	I	Organofosforado	20(M)/50(L)	
54	miclobutanil	98,5	F	Triazol		
55	monensina	98,0	A	Ionóforo	10(F)	
56	monocrotofos	97,5	I	Organofosforado		
57	monolinurom	99,0	H	Uréia		
58	oxamil	97,0	I	Carbamato	50(M)(L)	20(O)
59	Paraoxon etílico	99,0	I	Organofosforado		
60	pendimetalina	98,0	H	Dinitroanilina		
61	piraclostrobina	97,5	F	Metoxicarbamato		50(O)

62	pirazofos	97,0	I	Organofosforado		
63	piridaben	99,0	H	Organoclorado		
64	piridafetiona	97,5	F	Organofosforado		
65	piridato	96,5	I	Piridazina		
66	pirimetanil	99,0	I	Anilinopirimidina		
67	pirimicarbe	98,5	F	Carbamato	10(O)	
68	pirimifos metilico	99,0	F	Organofosforado	10(M)/50(L)	10(O)
69	procloraz	97,0	H	Imidazol		100(O)
70	profenofos	98,0	Ac	Organofosforado		20(O)
71	profoxidim	97,5	F	Oxima		
72	propargito	96,0	H	Éster sulfito		
73	propiconazole	99,0	I	Triazol		10(O)
74	propizamida	99,5	H	Benzimidazol		
75	propoxur	99,0	F	Carbamato	50(M)(L)	
76	quinclorac	97,6	An	Ácido Quinolinocarboxil		
77	quinoxifeno	99,0	B	Quinolina		10(O) 50(O) 10(O)
78	robenidina	95,0	A	Guanidina		
79	salbutamol	99,0	H	Betagonista	5(F)/0,1(U)	
80	salinomicina	98,0	A	Ionóforo		
81	simazina	98,5	A	Clorotriazina		
82	sulfadimetoxina	97,5	A	Sulfonamida	100(F)(O)(L)	
83	sulfametazina	99,0	F	Sulfonamida	100(F)(L)	
84	sulfatiazol	99,5	I	Sulfonamida	100(F)(O)(L)	
85	tebuconazole	98,8	H	Triazol	30(L)	10(O)
86	terbufos	94,0	F	Organofosforado		10(O)
87	terbutilazina	99,0	I	Clorotriazina		
88	tetraconazole	98,5	I	Triazol		
89	tiacloprido	98,0	I	Neonicotinóide		
90	tiametoxam	98,0	F	Neonicotinóide		
91	tiodicarbe	99,5	F	Carbamato oxima		
92	Tolclofos metílico	99,5	F	Hidrocarboneto aromático		
93	triadimefom	99,5	I	Triazol		
94	triadimenol	98,0	I	Triazol		10(O)
95	triazofos	97,0	F	Organofosforado		

96	triclorfom	97,0	F	Organofosforado		
97	trifloxistrobina	99,0	A	Oximinoacetato	40(R)/50(F)	40(O)
98	triflumizole	98,5	I	Imidazol		
99	trimetroprima	99,5	A	Pirimidina		
100	vamidationa	98,0	F	Organofosforado		

*Todos os padrões sólidos foram adquiridos da empresa Dr. Ehrenstorfer
A (Antibiótico); Ac (Acaricida); An (Anticoccidiano) (H) Herbicida; (I) Inseticida; (F) Fungicida;
F(Fígado); G(Gordura); L(Leite); M(Músculo); O(Ovo); R(Rim)

A partir da mistura $5,0 \text{ mg L}^{-1}$, foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações de 2,0; 10,0; 20,0; 50,0; 100,0; 200,0; 400,0 e 500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ em acetoneitrila e nos extratos das matrizes avaliadas (carne, fígado, rim, leite e ovo). Para injeção no sistema LC-MS/MS, foram realizadas diluições na proporção 1:1 (v/v) destas soluções em fase móvel (solução 5 mmol L^{-1} de formiato de amônio e metanol), de modo que as concentrações finais das soluções de trabalho avaliadas foram 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0, 200,0 e 250,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estas soluções de trabalho foram utilizadas para o estudo da linearidade do método. Todas as soluções foram armazenadas em frascos âmbar e estocadas abaixo de $-4 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.5 Otimização do sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de origem animal

Neste trabalho, as análises foram realizadas empregando a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Série (LC-MS/MS). Este sistema apresenta maior detectabilidade e seletividade em relação aos sistemas acoplados a detectores convencionais. Além disso, LC-MS/MS possibilita eliminar interferências espectrais e minimizar o problema de co-eluição de substâncias encontradas, sendo o detector de massas uma ferramenta analítica essencial para análise e confirmação dos analitos de interesse em níveis de traços. A seguir, estão descritos os principais parâmetros do sistema cromatográfico LC-MS/MS que foram otimizados para a determinação dos compostos em estudo.

3.5.1 Escolha da fase móvel

A escolha da fase móvel foi realizada através de informações obtidas por meio de revisão bibliográfica sobre o assunto (PIZZUTTI, *et al.* 2007). Neste trabalho, a fase móvel empregada foi solução 5 mmol L⁻¹ de formiato de amônio (solvente A) e metanol (solvente B) Tabela 3, em uma programação linear.

Tabela 3. Gradiente utilizado para eluição dos compostos

	Tempo (min)	% A	% B
Gradiente 1	0,00	75	25
	2,00	75	25
	15,00	5	95
	20,00	5	95
	25,00	75	25
	30,00	75	25

% A: Solução 5 mmol L⁻¹ de formiato de amônio

% B: metanol

3.5.2 Condições do sistema de detecção

A fim de obterem as condições ótimas de análise de cada um dos compostos em estudo, foram realizadas injeções diretas no espectrômetro de massas, com solução analítica padrão 1,0 mg L⁻¹ de cada composto individualmente. A partir das infusões foi selecionado o modo de ionização da fonte (eletrobulização positiva e/ou eletronebulização negativa), voltagem do capilar, energias de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos, temperatura da fonte, temperatura e pressão do gás de dessolvatação para secagem do solvente.

Após a escolha destas condições, foram selecionados os íons a serem monitorados para quantificação e qualificação dos compostos estudados.

3.6 Otimização do método QuEChERS para análise simultânea de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de origem animal

Devido à complexidade das amostras em estudo (carne, fígado, rim, leite e ovo) e também aos baixos níveis de concentração em que estes compostos podem ser encontrados, o preparo de amostra se torna uma importante etapa da análise para a obtenção de resultados confiáveis.

Neste trabalho foram realizadas modificações no método QuEChERS original, proposto por ANASTASSIADES *et al.* (2003). Para isto, foram realizados alguns ensaios para obterem os melhores percentuais de extração dos compostos em estudo.

3.6.1 Ensaio 1

Para avaliar a eficiência da extração do método QuEChERS acetato (Figura 2), pesaram-se $15,0 \pm 0,1$ g de amostra, diretamente em tubo de polipropileno (capacidade 50 mL) com tampa rosqueada. Realizaram-se fortificações (n=6) no nível $25,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, contendo os agrotóxicos e os medicamentos veterinários em estudo. Após o tempo de contato de 30 min, adicionaram-se, 15 mL de acetonitrila (1% HAc) e realizou-se agitação manual e vigorosa por cerca de 1 min. Em seguida, acrescentaram-se 6,0 g de sulfato de magnésio anidro, 1,5 g de acetato de sódio, seguido de agitação manual por 1 min e centrifugação a 3500 rpm por 8 min.

Posteriormente, transferiram-se 4 mL do sobrenadante para outro tubo de polipropileno (capacidade de 15 mL), contendo 600 mg de sulfato de magnésio anidro e 200 mg de PSA, sendo novamente agitados manualmente por 1 min, e centrifugados como citado anteriormente. Após, o sobrenadante foi retirado e colocado em *vial* com capacidade para ± 2 mL, seguido de análise por LC-MS/MS.

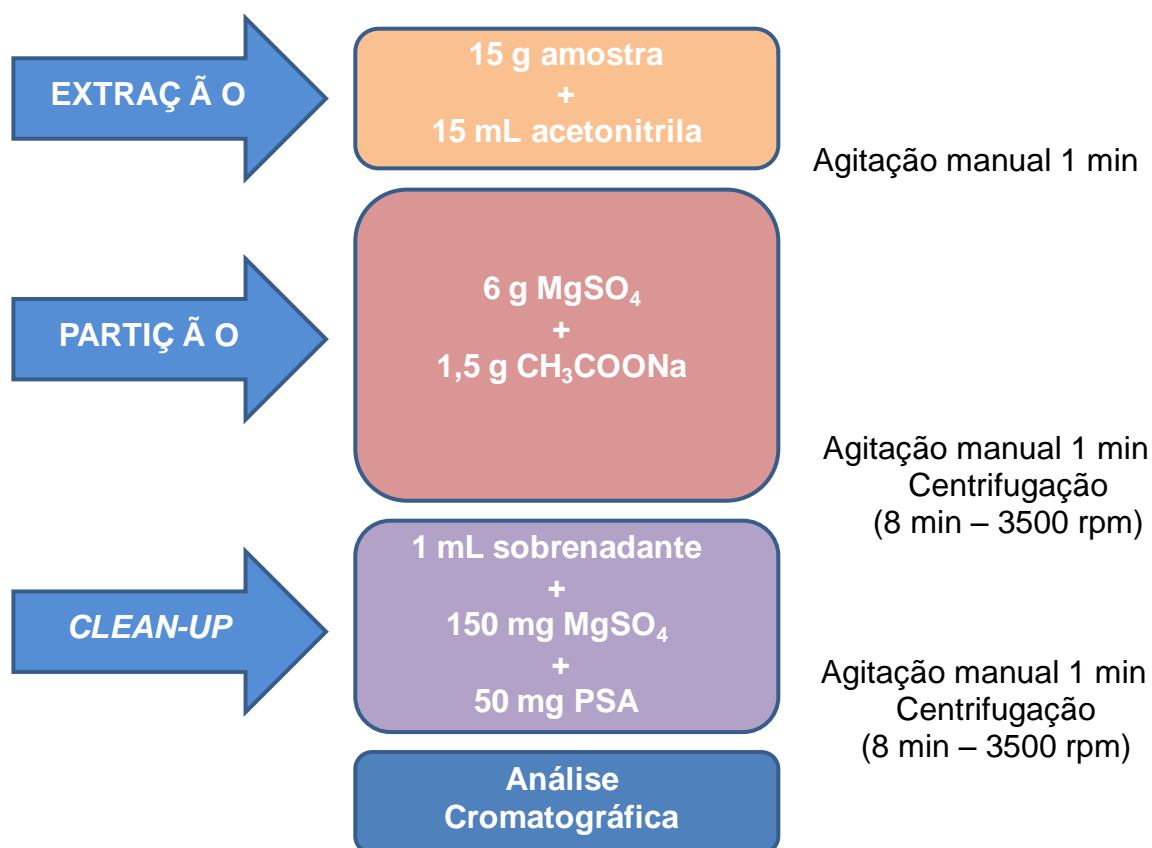


Figura 2. Representação esquemática do ensaio 1 (método QuEChERS acetato) para análise de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de origem animal.

3.6.2 Ensaio 2

No ensaio 2, buscou-se avaliar o método QuEChERS citrato (Figura 3). Pesou-se $10,0 \pm 0,1$ g de amostra, diretamente em tubo de polipropileno (capacidade 50 mL) com tampa rosqueada. Realizaram-se fortificações ($n=6$) no nível $25,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, contendo os agrotóxicos e os medicamentos veterinários em estudo. Após o tempo de contato de 30 min, adicionaram-se, 10 mL de acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético e realizou-se agitação manual e vigorosa por cerca de 1 min. Em seguida, acrescentaram-se 4,0 g de sulfato de magnésio anidro, 1,0 g de cloreto de sódio, 1 g de citrato de sódio diidratado e 0,5 g de hidrogenocitrato sesquidrato de sódio, seguido de agitação manual por 1 min e centrifugação a 3500 rpm por 8 min. Transferiram-se 4 mL do sobrenadante para

outro tubo com capacidade de 15 mL, contendo 600 mg de sulfato de magnésio anidro e 100 mg de C18, sendo novamente agitados manualmente por 1 min, e centrifugados como citado anteriormente. Após, o sobrenadante foi retirado e colocado em *vial* com capacidade para \pm 2 mL, seguido de análise por LC-MS/MS.

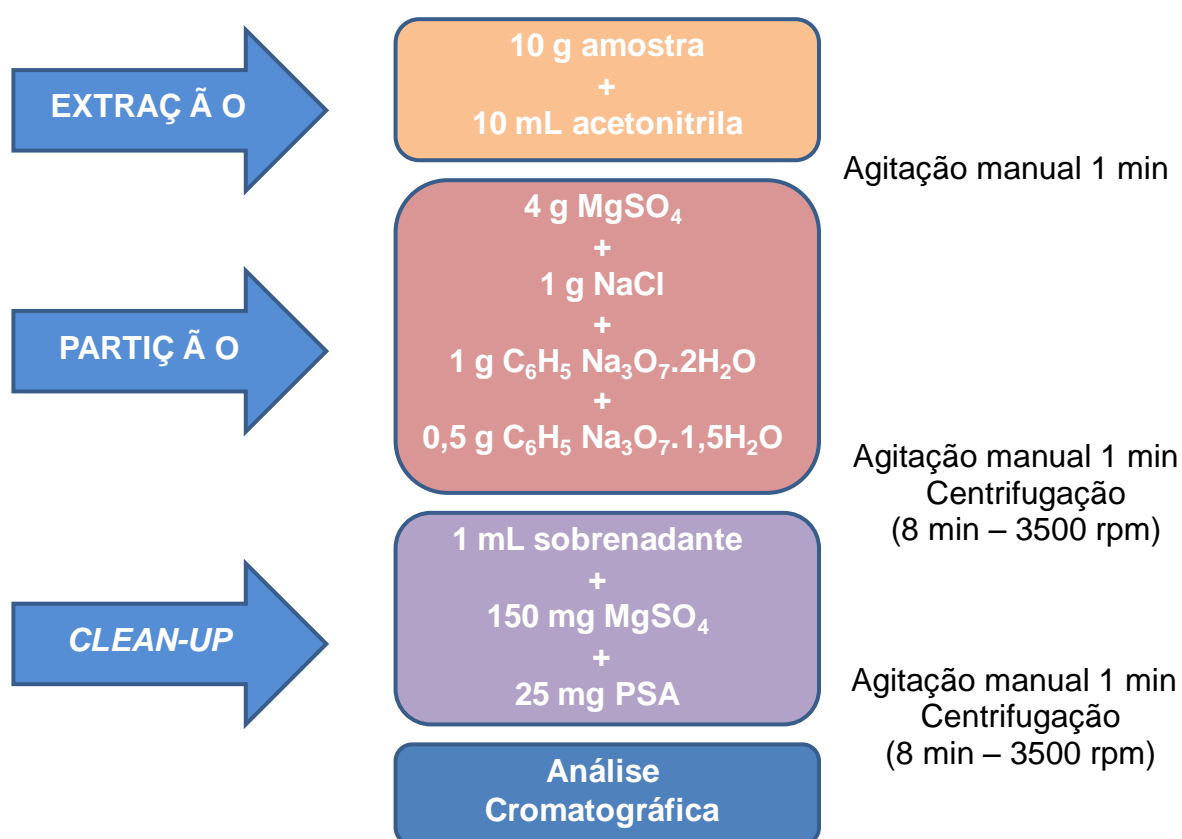


Figura 3. Representação esquemática do ensaio 2 (método QuEChERS citrato) para análise de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de origem animal.

3.6.3 Ensaio 3

No ensaio 3, avaliaram-se os percentuais de recuperação obtidos através da utilização do método QuEChERS modificado (Figura 4). Desta maneira, pesaram-se $10,0 \pm 0,1$ g de amostra, diretamente em tubos de polipropileno com tampa rosqueada (capacidade de 50 mL). Realizaram-se fortificações (n=6) no nível 25,0

$\mu\text{g kg}^{-1}$, contendo os compostos estudados. Adicionaram-se, 10 mL de acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético e realizou-se agitação manual e vigorosa por cerca de 1 min. Em seguida, acrescentaram-se 4,0 g de sulfato de magnésio anidro e 1,7 g de acetato de sódio anidro, seguido de agitação manual por 1 min e centrifugação a 3500 rpm por 8 min. Na sequência, transferiram-se 4 mL do extrato líquido para outro tubo de polipropileno (capacidade de 15 mL), contendo 600 mg de sulfato de magnésio anidro e 500 mg de C_{18} , sendo novamente agitados manualmente por 1 min, e centrifugados como citado anteriormente. Após, o sobrenadante foi retirado e colocado em *vial* com capacidade para ± 2 mL, seguido de análise por LC-MS/MS.

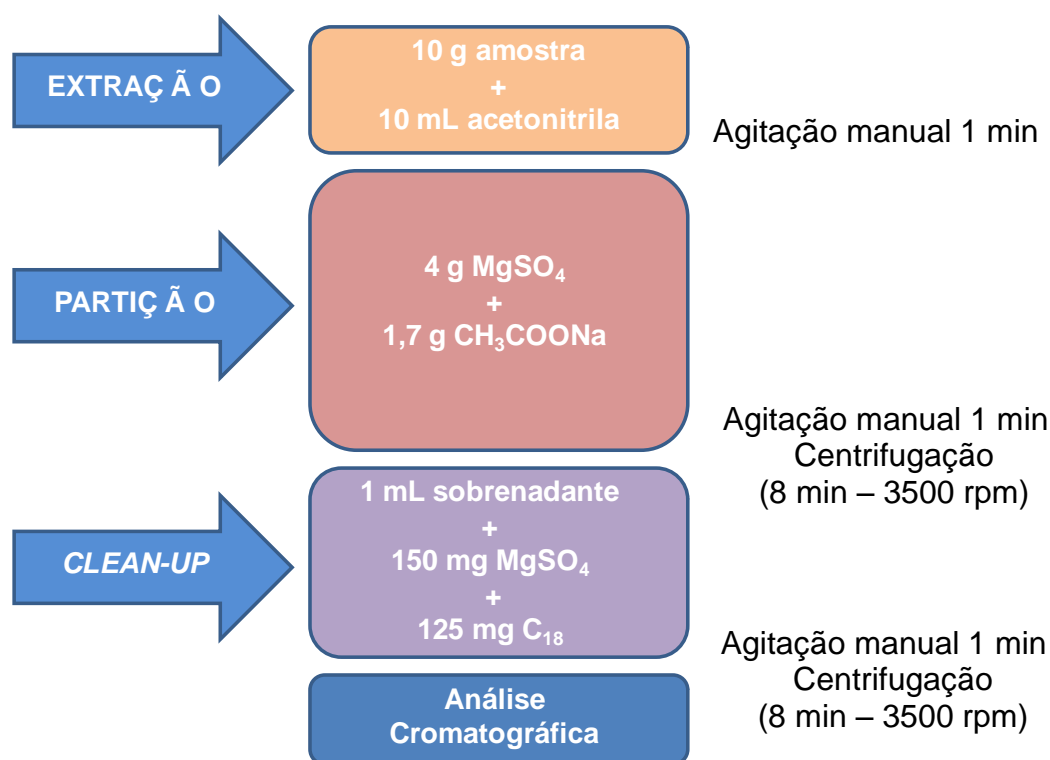


Figura 4. Representação esquemática do ensaio 3 (método QuEChERS modificado) para análise de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de origem animal.

3.7 Validação do método QuEChERS modificado para análise de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal.

Neste trabalho os parâmetros utilizados para a validação do método analítico foram: seletividade, curva analítica, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão (recuperação) e precisão (repetitividade e precisão intermediária) (SANCO, 2010; INMETRO, 2010; ANVISA, 2010).

3.7.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada por comparação dos cromatogramas obtidos por injeções no sistema LC-MS/MS de extratos de amostras branco e fortificadas. Este ensaio teve por objetivo avaliar a ocorrência de co-eluição de interferentes da matriz e dos analitos de interesse.

3.7.2 Determinação da Linearidade das Curvas Analíticas

Avaliou-se a linearidade das curvas analíticas a partir das soluções analíticas preparadas no item 3.3, tanto em solvente, quanto nos extratos da matriz, nas concentrações de 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0 e 250,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Posteriormente, realizaram-se os cálculos da média das áreas, do RSD (%), da equação da curva analítica bem como do coeficiente de determinação (r^2), e da faixa de linearidade, para cada composto analisado por LC-MS/MS.

3.7.3 Determinação da Estimativa do LOD e LOQ do Instrumento e do Método

A partir da avaliação dos dados de linearidade das curvas analíticas, de cada um dos compostos estudados, procedeu-se à determinação da estimativa do LOD do instrumento (LOD_i) e do método (LOD_m), bem como do LOQ do instrumento (LOQ_i) e do método (LOQ_m) (PIZZUTTI, 2007).

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

$$LOD_i (\mu\text{g mL}^{-1}) = 3 \times RSD \times C \quad (1)$$

onde:

RSD: Desvio padrão relativo das áreas obtidas;

C: Concentração da solução analítica.

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

A partir do LOD_i , aplicando-se a Equação 2, obtém-se o LOQ_i .

$$LOQ_i (\mu\text{g mL}^{-1}) = LOD_i \times 3,33 \quad (2)$$

Multiplicando-se o LOQ_i , pelo fator de concentração ou diluição do método de extração, obtém-se o LOQ_m estimado. Mas, se considera o valor verdadeiro do LOQ_m (em $\mu\text{g kg}^{-1}$), como sendo a menor concentração que, ao ser fortificada na matriz, apresentar recuperações entre 70 e 120%, com RSD% menor ou igual a 20%.

3.7.4 Ensaio de fortificação utilizando o Método QuEChERS modificado para avaliação da exatidão

Neste trabalho, para o estudo da exatidão do método, foram utilizados ensaios de fortificação, avaliando-se, dessa maneira, a recuperação dos compostos em estudo. Foram realizadas fortificações das amostras branco em três níveis de concentração 10; 25 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para carne, fígado, rim e ovo e 10; 25 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para leite.

A exatidão é expressa em percentagem e foi calculada conforme a Equação 3 (INMETRO, 2007):

$$R (\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração usada para fortificação.

O procedimento de extração das amostras fortificadas foi realizado utilizando amostras “branco”, isto é, livre da presença dos agrotóxicos e medicamentos veterinários em estudo.

Inicialmente, para o procedimento de extração do método QuEChERS modificado, pesaram-se $10,0 \pm 0,1$ g de amostra diretamente em tubos de polipropileno, com tampa rosqueada (capacidade de 50 mL). Logo após, efetuou-se a fortificação em 3 níveis, nas concentrações de 10; 25 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O tempo de contato entre a amostra e os analitos foi de 30 min. Após, adicionaram-se, 10 mL de acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético, efetuou-se agitação manual e vigorosa por 1 min. Decorrido este tempo, acrescentaram-se 4,0 g sulfato de magnésio anidro e 1,7 g de acetato de sódio. Novamente, efetuou-se agitação manual e vigorosa por 1 min e posterior etapa de centrifugação a 3500 rpm, durante 8 min.

Durante a etapa de limpeza dispersivo, transferiu-se 4 mL do sobrenadante para outro tubo de polipropileno (capacidade de 15 mL), contendo 600 mg de sulfato de magnésio anidro e 500 mg de C_{18} , sendo novamente agitados manualmente por 1 min, e centrifugados como citado anteriormente. Após, em *vial* com capacidade para ± 2 mL, realizou-se uma diluição na proporção 1:1 (v/v) do extrato final na fase móvel, no qual foram adicionados 0,5 mL do extrato obtido após o limpeza dispersivo e 0,5 mL de fase móvel (solução 5 mmol L^{-1} de formiato de amônio e metanol), seguido de análise por LC-MS/MS.

3.7.5 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

A precisão pode ser avaliada através de um valor numérico (RSD) que é calculado através da Equação 4.

$$\text{RSD (\%)} = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

s = estimativa de desvio padrão absoluto;

$$s = \{\sum(x_i - x_m)^2 / N - 1\}^{1/2};$$

x_i = valores individuais;

x_m = média das medidas em replicatas;

n = número de medidas.

Neste trabalho, o estudo da precisão do instrumento foi realizado efetuando-se três injeções de cada concentração das soluções analíticas preparadas no extrato da matriz, no sistema LC-MS/MS.

A precisão do método, em termos de repetitividade (RSD_r) foi efetuada procedendo-se a extração e análise das amostras fortificadas. Foram realizadas seis extrações de cada nível de fortificação e cada um dos extratos foi injetado uma vez.

A precisão intermediária (RSD_{pi}) do método foi avaliada utilizando dias diferentes para a injeção dos padrões dos agrotóxicos e das amostras fortificadas.

3.7.6 Avaliação do Efeito Matriz

Para a avaliação da existência do efeito matriz dos extratos obtidos, realizou-se a comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas (25,0; 10,0 e 5,0 µg L⁻¹) em solvente (acetonitrila) e daquelas obtidas com soluções analíticas preparadas nos extratos de carne, fígado, rim, leite e ovos. O cálculo foi efetuado através da Equação 5 (PIZZUTTI, 2007).

$$\text{EfeitoMatriz\%} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (5)$$

onde:

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

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

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

3.8 Aplicação do método

O método desenvolvido e validado foi aplicado para a determinação de resíduos dos agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne, fígado, rim, leite e ovo adquiridos em supermercados da região de Santa Maria-RS no período de janeiro e fevereiro de 2011.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Otimização do sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal

A Tabela 4 apresenta as condições empregadas no sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação dos agrotóxicos e medicamentos veterinários avaliados neste estudo.

Tabela 4. Condições empregadas no sistema cromatográfico LC-MS/MS

Parâmetros	LC-MS/MS
Coluna analítica	Pursuit XRS C ₁₈ (100 x 2,0 mm d.i, 2,4 µm)
Fase móvel	Formiato de Amônio 5 mmol L ⁻¹ (A) e Metanol (B)
Gradiente de eluição	75% (A) e 25% (B) de 0 a 2 min; alterando até 5% (A) e 95% (B) em 15 min (permanecendo até 20 min); alternando até atingir 75% (A) e 25% (B) em 25 min (permanecendo até 30 min).
Vazão	0,15 mL min ⁻¹
Volume de injeção	3 µL
Fonte de ionização	ESI
Detector	Espectrômetro de massas, do tipo Triplo Quadrupolo, operando no modo MS/MS

% A: formiato de amônio 5 mmol L⁻¹

% B: metanol

A análise cromatográfica dos 100 compostos avaliados por LC-MS/MS foi realizada em cerca de 23 min, sendo necessário mais 7,0 min para o reequilíbrio da coluna às condições iniciais do gradiente, resultando em um tempo total de análise de 30 min.

4.2 Condições de Análise por LC-MS/MS

A partir da realização das infusões, de cada um dos compostos, foram determinadas quais as melhores condições de fragmentação dos íons monitorados utilizando a fonte de ionização na temperatura de 50 °C, a temperatura do gás de dessolvatação (N₂) foi de 250 °C, a pressão do gás de dessolvatação foi de 40 psi, e a pressão do gás de secagem foi de 20 psi.

A fonte de ionização API foi empregada com interface ESI, devido à moderada polaridade da maioria dos analitos. ESI é a interface mais indicada para compostos neutros ou polares, que podem ser protonados ou desprotonados em condições apropriadas de pH. Na ESI ocorre a produção de íons do analito na fase líquida, a transformação destes em íons gasosos, que em seguida são introduzidos no espectrômetro de massas (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

A Tabela 5 apresenta os agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados por LC-MS/MS, usando modo de ionização ESI+ e ESI-, modo de aquisição MRM, os íons precursores e íons produtos, energia de colisão as transições monitoradas e tempo de retenção dos compostos estudados.

Para cada composto, quando possível, foram selecionadas duas transições características, como apresentado na Tabela 5. A transição mais intensa (mais estável) foi utilizada para a quantificação dos compostos e a segunda transição mais intensa para a confirmação dos mesmos.

A Figura 5 apresenta os cromatogramas de íons totais obtidos por LC-MS/MS para soluções analíticas (25 µg L⁻¹) preparadas no solvente (acetonitrila) e nas matrizes avaliadas (carne, fígado, rim, leite e ovo) contendo os 100 agrotóxicos e os medicamentos veterinários. A Figura 6 apresenta um cromatograma obtido por LC-MS/MS modo MRM (contendo as transições de quantificação), para soluções analíticas (25 µg L⁻¹) preparada no extrato “branco” de leite.

Tabela 5. Agrotóxicos e medicamentos veterinários quantificados por LC-MS/MS modo ESI (+/-) e modo de aquisição MRM, tempo de retenção, íons precursores, íons produtos e energia de colisão para as duas transições monitoradas

n ^o	t _R (min)	Compostos	(+/-)	1 ^a Transição Quantificação			2 ^a Transição Confirmação			
				Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Energia de Colisão (eV)	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Energia de Colisão (eV)	
0,0 – 5,5 min	1	2,581	metamidofos	+	142,0	93,8	12,5	142,0	124,8	12,5
	2	3,533	sulfatiazol	+	256,0	155,9	12,5	256,0	91,9	23,0
	3	3,610	salbutamol	+	240,0	147,9	13,0	240,0	222,0	7,0
	4	4,384	oxamil	+	237,0	71,9	5,5	237,0	89,9	5,0
	5	6,186	tiametoxam	+	292,0	210,9	11,0	292,0	181,0	19,5
	6	6,260	sulfametazina	+	279,0	185,9	15,0	279,0	155,9	17,0
	7	6,627	monocrotofos	+	224,0	192,9	7,0	224,0	126,9	13,5
	8	6,997	quinclorac	-	242,0	223,8	13,0	242,0	160,9	37,0
	9	7,146	bentazona	-	239,0	131,7	25,5	239,0	196,6	19,0
5,5 – 9,4 min	10	7,328	metsulfurom metilico	+	382,0	167,5	12,0	382,0	198,9	19,5
	11	7,393	fluroxipir	-	252,8	194,5	11,5	252,8	232,6	6,0
	12	7,782	imidacloprido	+	256,1	209,0	14,0	256,1	175,0	17,0
	13	7,928	sulfadimetoxina	+	311,0	155,9	17,5	311,0	107,9	25,5
	14	8,091	metiocarbe sulfoxido	+	275,0	258,0	8,5	275,0	201,0	14,0
	15	8,274	trimetroprima	+	291,0	230,0	21,5	291,0	260,9	23,5
	16	8,521	vamidationa	+	288,0	145,9	10,0	288,0	117,8	20,0
	17	8,702	3-OH	+	238,0	163,0	12,0	238,0	220,0	6,0
	18	8,872	triclorfom	+	257,0	108,8	15,5	257,0	220,8	11,0
	19	8,916	dimetoato metiocarbe	+	230,0	198,9	8,5	230,0	124,8	19,5
	20	8,962	sulfona	+	242,0	185,0	9,5	242,0	170,0	19,5
9,4 – 10,7 min	21	9,616	tiacloprido	+	252,9	125,8	18,0	252,9	185,9	12,5
	22	9,848	mevinfos	+	242,1	126,8	14,5	242,1	192,9	7,5
	23	9,903	cloranfenicol	-	321,0	151,7	16,5	321,0	256,7	10,5
	24	9,956	carbendazina	+	192,0	160,0	15,0	192,0	131,9	27,0
	25	11,079	2,4 D	-	219,0	194,5	11,0	219,0	158,6	28,0
10,75-13,50 min	26	11,136	cianizina	+	241,0	214,9	14,0	241,0	131,9	21,5
	27	11,406	clorimurom	+	415,0	186,0	15,0	415,0	277,9	15,0
	28	11,681	propoxur	+	210,0	110,9	10,0	210,0	168,0	5,0
	29	11,746	carbofurano	+	222,0	165,0	7,5	222,0	122,9	16,5
	30	11,853	simazina	+	202,0	131,9	19,5	202,0	123,9	18,0
	31	12,242	carboxim	+	236,0	142,8	10,5	236,0	86,8	21,0
	32	12,252	carbaril	+	202,0	144,9	8,0	202,0	126,9	26,5
	33	12,300	tiodicarbe	+	355,0	87,9	9,0	355,0	107,9	11,5

	34	12,651	monolinurom	+	215,0	125,8	15,0	215,0	147,9	12,0
	35	12,675	2,4,5 T	-	252,8	160,6	11,5			
	36	12,762	bispiribaque	+	453,0	296,6	17	453,0	179,0	18,5
	37	12,885	pirimicarbe	+	239,0	182,0	12,5			
	38	12,915	paraoxon	+	293,0	219,9	16,0	293,0	275,9	8,5
	39	13,241	pendimetalina	+	216,0	174,0	15,5	216,0	103,8	26,0
	40	13,242	atrazina	+	216,0	173,9	13,5	216,0	103,8	24,5
	41	13,273	metalaxil	+	280,0	220,0	12,0	280,0	248,0	9,0
	42	13,824	azinfos metilico	+	318,0	131,9	11,0	318,0	160,0	5,0
	43	13,834	azoxistrobina	+	404,0	372,0	14,5	404,0	328,9	30,0
	44	13,968	clomazone	+	240,0	124,9	18,0	240,0	88,9	39,5
	45	14,425	linurom	+	249,1	159,9	16,0	249,1	181,9	13,5
	46	14,467	boscalida	+	343,0	306,9	17,5	343,0	270,9	30,5
	47	14,548	terbutilazina	+	230,0	174,0	12,0	230,0	131,9	20,5
	48	14,599	flutalonil	+	324,2	261,9	16,5	324,2	241,9	23,0
	49	14,600	pirimetanil	+	200,0	106,9	21,0			
	50	14,681	malationa	+	331,0	126,9	9,0	331,0	284,9	8,0
	51	14,826	mepronil	+	270,0	228,0	15,0	270,0	118,9	20,5
	52	14,841	triadimefom	+	294,0	224,9	12,0	294,0	197,0	14,5
	53	14,852	piridafetiona	+	341,0	189,0	20,0	341,0	204,9	20,0
	54	14,880	miclobutanil	+	289,1	69,9	11,5	289,1	124,9	25,0
	55	14,983	propizamida	+	255,9	189,9	10,5	255,9	172,9	18,0
	56	14,986	clorprofam	+	214,0	171,9	6,0	214,0	153,9	14,0
	57	15,012	triazofos	+	314,0	162,0	16,0	314,0	118,9	32,0
	58	15,156	diclofluanida	+	350,0	223,8	14,0	350,0	332,8	7,5
	59	15,163	iprovalicarbe	+	321,0	203,0	8,0	321,0	118,9	14,0
	60	15,184	fluquiconazole	+	376,0	306,8	24,0	376,0	348,9	18,5
	61	15,227	triadimenol	+	296,0	69,9	5,5	296,0	227,1	9,0
	62	15,279	azinfos etilico	+	346,0	131,9	12,0	346,0	160,0	5,5
	63	15,296	tetraconazole	+	372,0	158,9	24,0			
	64	15,357	fenarimol	+	331,0	267,9	22,5	331,0	258,9	24,5
	65	15,381	mecarbam	+	330,0	226,9	7,0	330,0	198,9	13,0
	66	15,466	epoxiconazole	+	330,0	120,9	17,5	330,0	122,9	12,5
	67	15,656	fipronil	-	435,0	329,7	15,5	435,0	249,6	26,5
	68	16,248	imazalil	+	297,0	158,9	17,5	297,0	200,9	15,0
	69	16,270	tebuconazole	+	308,0	69,9	14,0	308,0	124,9	33,0
	70	16,295	bromoconazole	+	378,0	158,9	23,5	378,0	160,9	23,5
	71	16,373	fentiona	+	279,0	246,9	11,5	279,0	169,0	14,5
	72	16,396	diazinona	+	305,1	169,0	17,5	305,1	153,0	17,0
	73	16,425	propiconazole	+	342,0	158,9	25,5	342,0	69,0	14,0
	74	16,426	piraclostrobina	+	388,0	194,0	9,0	388,0	163,0	22,0
	75	16,612	bitertanol	+	338,0	269,1	8,0	338,0	251,0	9,5
	76	16,639	procloraz	+	376,0	307,8	11,0	376,0	265,8	16,5
	77	16,682	metaconazole	+	320,1	69,9	15,5	320,1	124,9	31,5
	78	16,781	pirazofos	+	374,0	222,0	19,0	374,0	194,0	30,0

13,50-15,85 min

15,85-18,35 min

	79	16,830	pirimifos metilico	+	306,0	164,0	19,5			
	80	16,885	tolclofos	+	300,9	268,7	15,5	300,9	124,8	13,5
	81	16,923	difenoconazole	+	406,0	250,9	24,0	406,0	336,9	15,5
	82	16,933	trifloxistrobina	+	409,0	186,0	14,0	409,0	206,0	11,0
	83	17,021	profoxidim	-	466,0	280,0	14,0	466,0	238,0	17,5
	84	17,030	robenidina	+	334,0	154,9	17,0	334,0	137,9	22,0
	85	17,272	clorpirifos	+	322,0	124,8	15,0	322,0	289,7	14,5
	86	17,298	triflumizole	+	346,0	278,0	10,5	346,0	220,2	13,5
	87	17,660	profenofos	+	375,0	304,7	19,5	375,0	346,7	12,0
	88	17,960	buprofezina	+	306,0	201,0	9,5	306,0	115,9	14,0
	89	18,012	terbufos	+	288,9	102,9	5,0	288,9	232,9	5,0
	90	18,104	etiona	+	384,9	198,9	7,0	384,9	170,9	13,0
	91	18,652	clorpirifos etilico	+	349,9	197,8	16,0	349,9	321,7	10,5
	92	18,704	quinoxifeno	+	308,0	196,9	29,0	308,0	271,9	24,5
	93	18,706	propargito	+	368,0	231,1	9,5	368,0	175,1	12,0
18,35-30 min	94	18,833	fempropatrina	+	367,2	124,9	12,5	367,2	350,7	7,0
	95	19,303	deltametrina	+	523,0	280,8	15,0	523,0	505,9	9,0
	96	19,872	piridaben	+	365,0	309,0	11,5	365,0	147,0	21,0
	97	20,304	monesina	+	693,5	461,0	45,0	693,5	675,5	28,5
	98	20,802	piridato	+	379,2	206,9	14,0	379,2	351,0	8,5
	99	21,646	salinomicina	+	773,5	431,2	45,0	773,5	531,7	40,5
	10	21,794	fempropimorfe	+	304,6	147,0	24,5	304,6	129,9	20,5

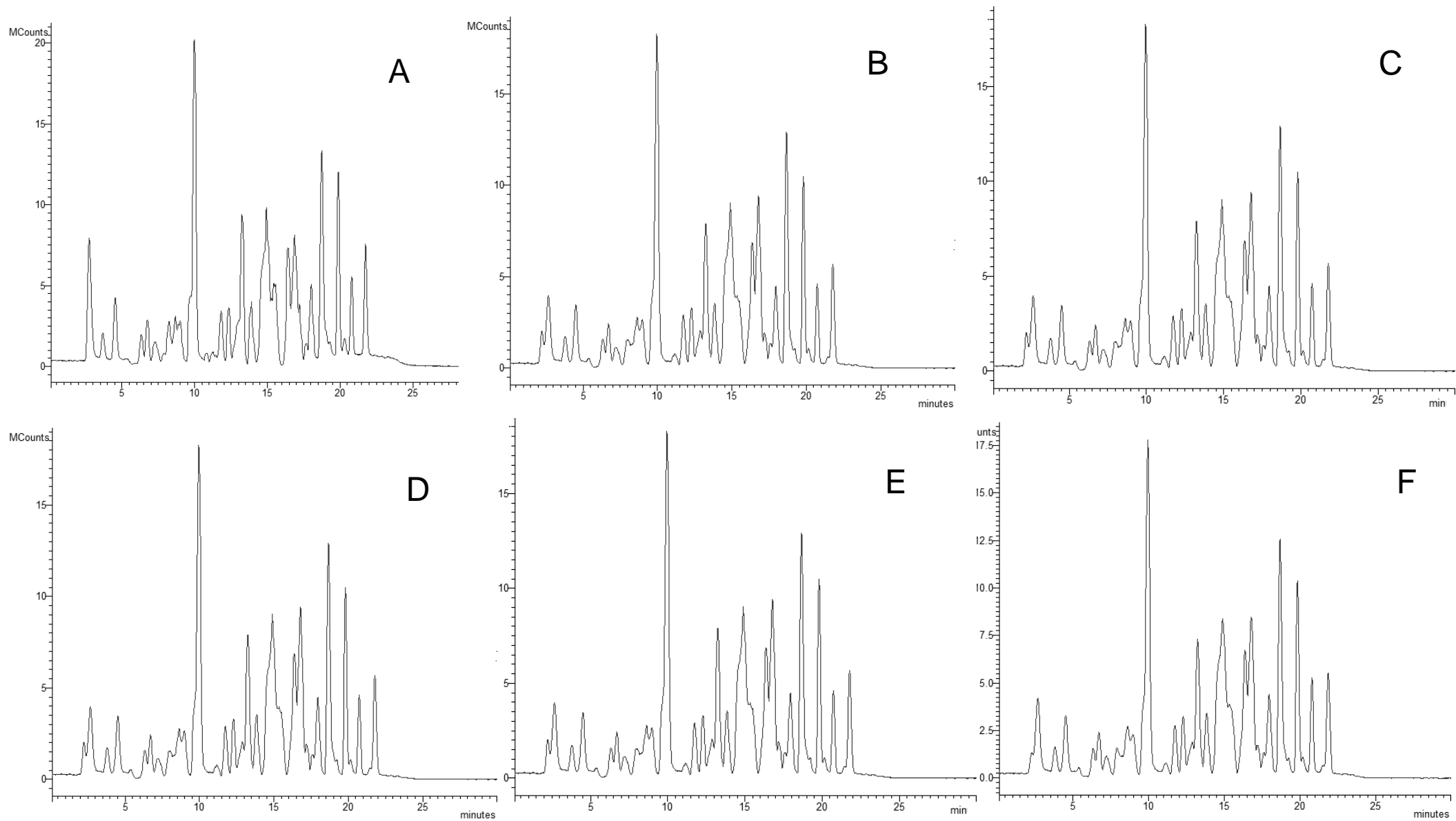


Figura 5 - Cromatogramas de íons totais obtidos por LC-MS/MS a partir de solução analítica ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) preparada em A) acetonitrila e nos extratos “branco”, obtidos pelo método QuEChERS modificado, em B) carne, C) fígado, D) rim, E) leite e F) ovo.

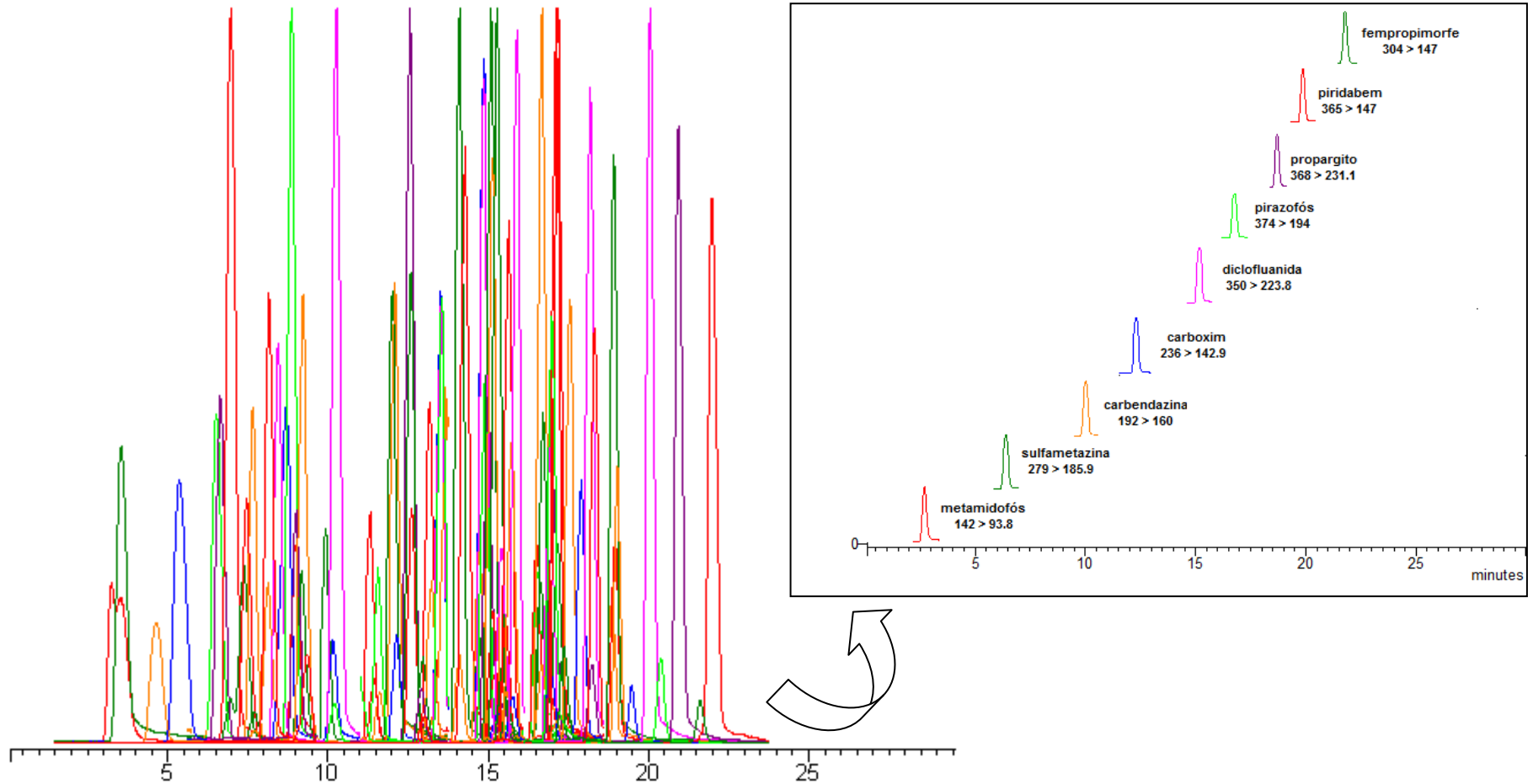


Figura 6 - Cromatograma obtido por LC-MS/MS modo MRM obtido para uma solução analítica ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) preparado em extrato de leite “branco”. Em destaque a visualização dos sinais individuais de alguns compostos com as respectivas transições de quantificação.

Observa-se que vários compostos co-eluíram, pois obtiveram tempos de retenção muito semelhantes, a detecção de agrotóxicos e/ou demais analitos em misturas ou em amostras mais complexas, pode ser um problema para a LC, quando a resolução dos cromatogramas não está adequada, com detectores tradicionais, como por exemplo, detector UV ou até mesmo detector DAD, os quais não são específicos suficientes quando as diferenças espectrais são pequenas, prejudicando a quantificação (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005; PICÓ *et al.*, 2004).

Entretanto, o emprego de LC-MS/MS pode contornar estes problemas de separação cromatográfica, pois o detector de massas em série operando no modo MRM é altamente seletivo para os analitos da mistura (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005; PICÓ *et al.*, 2004).

4.3 Método otimizado de extração QuEChERS modificado

4.3.1 Avaliação dos procedimentos de extração

Para avaliar os três procedimentos de extração realizados neste estudo, utilizaram-se amostras "branco" de carne, fígado, rim, leite e ovo fortificadas na concentração de $25,0 \mu\text{g kg}^{-1}$. A praticidade de execução do método QuEChERS pode ser observada na Figura 7. Os resultados destes ensaios de extração descritos no item 3.6, estão apresentados na Tabela 6. A partir destes testes preliminares, avaliaram-se quais dos métodos de extração apresentaram as melhores recuperações para os compostos em estudo.

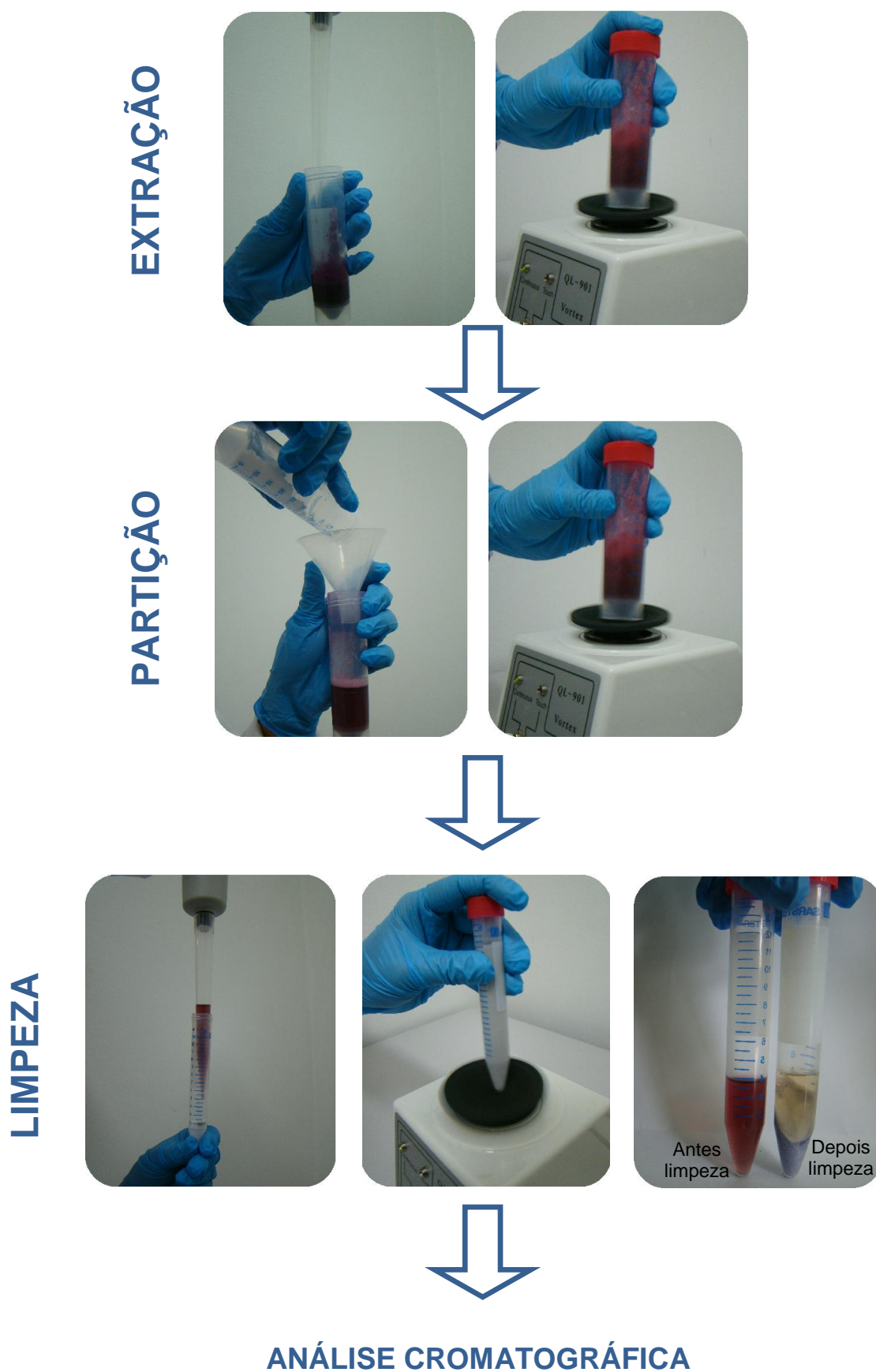


Figura 7. Representação da praticidade de operação do método QuEChERS.

Tabela 6. Percentual de compostos que apresentaram recuperações médias (70-120%) e RSD ($\leq 20\%$) obtidos para os três ensaios de extração.

Método	% Compostos
QuEChERS acetato	75
QuEChERS citrato	69
QuEChERS modificado	85

A partir destes resultados preliminares, optou-se pela validação do método de extração QuEChERS modificado.

4.4 Método de extração QuEChERS otimizado

A partir dos testes anteriormente apresentados, obteve-se o procedimento de extração otimizado, utilizado para a validação do método proposto e para a sua aplicação na determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de origem animal (carne, fígado, rim, leite e ovo).

O procedimento de extração otimizado está descrito no item 3.6.3. O método envolve uma etapa de extração com acetonitrila, seguida de uma etapa de partição com os sais sulfato de magnésio e acetato de sódio. A etapa de *clean-up* dispersivo é realizada com C₁₈ e sulfato de magnésio.

Durante a etapa de validação do método QuEChERS modificado utilizado neste estudo, amostras “branco” de carne, fígado, rim e ovo foram fortificadas em três níveis (10; 25 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$). A amostra “branco” de leite foi fortificada em três níveis (10; 25 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$).

A Figura 8 demonstra todas as etapas do método de extração otimizado (QuEChERS modificado) .

4.5 Validação do Método QuEChERS modificado

Todas as soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em solvente (acetonitrila) e nos extratos das matrizes (Método QuEChERS modificado), assim foi possível avaliar o efeito da presença do extrato da matriz na determinação dos valores de LOD e LOQ (instrumento e método), da linearidade das curvas analíticas (faixa linear, equação da curva e coeficiente de determinação), uma vez que o efeito matriz pode influenciar nos resultados, dependendo dos compostos e da técnica cromatográfica empregada. Sendo assim, foi realizada a validação do método QuEChERS modificado para a análise dos agrotóxicos e medicamentos veterinários, segundo os parâmetros descritos a seguir.

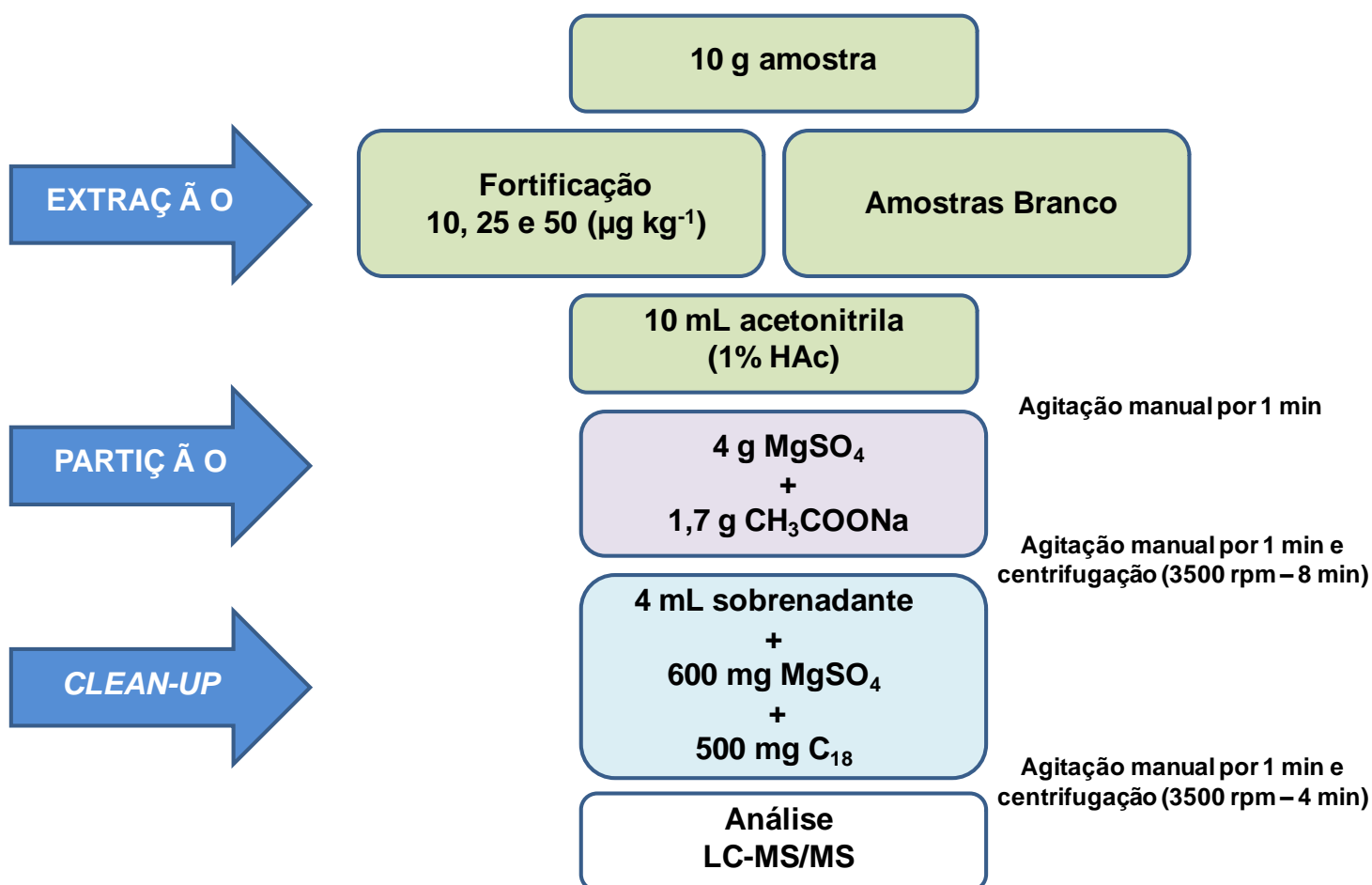


Figura 8. Representação do método QuEChERS modificado utilizado para extração dos agrotóxicos e medicamentos veterinários nas amostras de carne, fígado, rim, leite e ovo.

4.5.1 Seletividade

A análise por LC-MS/MS é considerada altamente seletiva. A seletividade do método foi assegurada pela ausência de interferentes com mesmos íons de quantificação e identificação no tempo de retenção dos analitos avaliados em amostras branco de cada uma das matrizes avaliadas neste estudo.

4.5.2 Curva analítica e linearidade

A Tabela 7 apresenta os valores de coeficiente de determinação (r^2) para as equações das curvas analíticas em solvente (acetonitrila) e nos extratos das matrizes de carne, fígado, rim, leite e ovo para os agrotóxicos e medicamentos veterinários estudados.

Tabela 7. Coeficientes de determinação (r^2) das curvas analíticas, obtidos para os agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados por LC-MS/MS, a partir das soluções de 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0 e 250,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

n ^o	Compostos	Coeficiente de determinação (r^2)					
		Solvente	Matriz				
			carne	fígado	rim	leite	ovo
1	2,4 D	0,9981	0,9970	0,9996	0,9980	0,9992	0,9979
2	2,4,5 T	0,9930	0,9991	0,9986	0,9990	0,9988	0,9973
3	3-OH Carbofuran	0,9981	0,9991	0,9953	0,9963	0,9985	0,9985
4	atrazina	0,9995	0,9975	0,9985	0,9955	0,9983	0,9986
5	azinfos etílico	0,9959	0,9969	0,9953	1,0000	0,9993	0,9965
6	azinfos metílico	0,9989	0,9977	0,9977	0,9987	0,9987	0,9945
7	azoxistrobina	0,9963	0,9992	0,9986	0,9980	0,9992	0,9995
8	bentazona	0,9978	1,0000	0,9952	0,9984	0,9939	0,9987
9	bispiribaque	0,9960	0,9962	0,9970	0,9949	1,0000	0,9973
10	bitertanol	0,9935	0,9990	0,9993	0,9992	0,9988	0,9976
11	boscalida	0,9924	0,9970	0,9993	0,9941	1,0000	0,9905
12	bromoconazole	0,9967	0,9997	0,9989	0,9997	0,9988	0,9973
13	buprofezina	0,9978	0,9999	0,9912	0,9999	1,0000	0,9972
14	carbaril	0,9994	0,9970	0,9982	0,9966	0,9950	0,9980
15	carbendazina	0,9968	0,9995	0,9956	0,9968	0,9984	0,9966
16	carbofurano	0,9959	0,9994	0,9945	0,9985	0,9915	0,9996
17	carboxim	0,9973	0,9989	0,9934	0,9978	0,9991	0,9986

18	cianizina	0,9984	0,9949	0,9932	0,9974	0,9964	0,9953
19	clomazone	0,9955	0,9992	0,9945	0,9960	0,9981	0,9985
20	cloranfenicol	0,9933	0,9981	0,9987	0,9960	1,0000	0,9953
21	clorimurum	0,9930	0,9983	0,9992	0,9984	0,9954	0,9990
22	clorpirifos etilico	0,9895	0,9910	0,9973	0,9910	0,9994	0,9986
23	clorpirifos metil	0,9912	0,9952	0,9976	0,9952	0,9981	0,9976
24	clorprofam	0,9907	0,9948	0,9905	0,9933	0,9995	0,9962
25	deltametrina	0,9957	0,9981	0,9973	0,9981	0,9952	0,9971
26	diazinona	0,9958	0,9983	0,9972	0,9983	0,9944	0,9987
27	diclofluanida	0,9974	0,9985	0,9973	0,9993	0,9949	0,9968
28	difenoconazole	0,9953	0,9975	0,9976	0,9975	0,9992	0,9989
29	dimetoato	0,9981	0,9981	0,9905	0,9990	0,9994	0,9993
30	epoxiconazole	0,9982	0,9921	0,9973	0,9953	0,9984	0,9973
31	etiona	0,9980	0,9993	0,9972	0,9993	0,9989	0,9976
32	fempropatrina	0,9988	0,9989	0,9967	0,9989	0,9970	0,9905
33	fempropimorfe	0,9989	0,9912	0,9987	0,9912	0,9970	0,9973
34	fenarimol	0,9983	0,9982	0,9954	1,0000	0,9991	0,9972
35	fentiona	0,9997	0,9956	0,9932	0,9956	0,9929	0,9973
36	fipronil	0,9963	0,9975	0,9978	0,9975	0,9962	0,9977
37	fluquiconazole	0,9954	0,9984	0,9914	0,9967	0,9988	0,9986
38	fluroxipir	0,9904	0,9988	0,9943	0,9920	0,9913	0,9952
39	flutalonil	0,9978	0,9979	0,9919	0,9960	0,9975	0,9970
40	imazalil	0,9973	0,9966	0,9971	0,9966	0,9964	0,9993
41	imidacloprido	0,9957	0,9988	0,9920	0,9953	0,9971	0,9972
42	iprovalicarbe	0,9958	0,9998	0,9945	0,9994	0,9970	0,9983
43	linurom	0,9948	0,9984	0,9987	0,9971	0,9992	0,9981
44	malationa	0,9982	0,9935	0,9993	0,9983	0,9992	0,9990
45	mecarbam	0,9970	0,9987	0,9978	1,0000	0,9970	0,9994
46	mepronil	0,9915	0,9980	0,9930	0,9948	0,9984	0,9959
47	metaconazole	0,9985	0,9973	0,9910	0,9949	0,9979	0,9953
48	metalaxil	0,9977	0,9964	0,9946	0,9986	0,9987	0,9972
49	metamidofos	0,9962	1,0000	0,9989	0,9982	0,9999	0,9984
50	metiocarbe sulfona	0,9984	1,0000	0,9981	0,9942	0,9935	0,9975
51	metiocarbe sulfoxido	0,9995	1,0000	0,9993	0,9985	0,9980	0,9973
52	metsulfurom metilico	0,9916	0,9977	0,9953	0,9995	0,9997	0,9987
53	mevinfos	0,9966	0,9994	0,9958	0,9986	0,9982	0,9985
54	miclobutanil	0,9973	0,9945	0,9949	0,9988	0,9945	0,9967
55	monesina	0,9956	0,9993	0,9953	0,9953	0,9978	0,9984
56	monocrotofos	0,9989	0,9992	0,9997	0,9992	0,9948	0,9981
57	monolinurom	0,9959	0,9929	0,9958	0,9998	0,9989	0,9986
58	oxamil	0,9951	0,9983	0,9994	0,9956	0,9998	0,9998
59	paraoxon	0,9974	0,9987	0,9940	0,9992	0,9985	0,9968
60	pendimetalina	0,9972	0,9913	0,9988	0,9977	0,9950	0,9976
61	piraclostrobina	0,9957	0,9992	0,9914	0,9992	0,9984	0,9978
62	pirazofos	0,9977	0,9949	0,9989	0,9916	0,9960	0,9971

63	piridaben	0,9926	0,9953	0,9999	0,9993	0,9931	0,9986
64	piridafetiona	0,9983	0,9997	1,0000	0,9973	0,9897	0,9979
65	piridato	0,9973	0,9958	0,9967	0,9958	0,9982	0,9972
66	pirimetanil	0,9962	0,9994	0,9979	0,9987	0,9971	0,9983
67	pirimicarbe	0,9921	0,9988	0,9923	0,9974	0,9975	0,9954
68	pirimifos metilico	0,9905	0,9916	0,9950	0,9991	0,9955	0,9996
69	procloraz	0,9988	0,9992	0,9976	0,9973	0,9997	0,9984
70	profenofos	0,9932	0,9996	1,0000	0,9996	0,9912	0,9979
71	profoxidim	0,9986	0,9989	0,9974	0,9989	0,9956	0,9938
72	propargito	0,9982	0,9986	0,9970	0,9986	0,9980	0,9970
73	propiconazole	0,9977	0,9980	0,9994	0,9980	0,9992	0,9929
74	propizamida	0,9981	0,9978	0,9958	0,9923	0,9983	0,9967
75	propoxur	0,9929	0,9992	0,9986	0,9955	0,9992	0,9974
76	quinclorac	0,9959	0,9939	0,9982	0,9953	0,9973	0,9935
77	quinoxifeno	0,9949	0,9946	0,9985	0,9946	0,9949	0,9982
78	robenidina	0,9971	0,9945	0,9992	0,9921	0,9921	0,9955
79	salbutamol	0,9982	0,9992	0,9986	0,9996	0,9916	0,9664
80	salinomicina	0,9959	0,9974	0,9980	0,9974	0,9990	0,9950
81	simazina	0,9972	0,9984	0,9992	0,9997	0,9991	0,9962
82	sulfadimetoxina	0,9947	0,9984	0,9995	1,0000	0,9975	0,9950
83	sulfametazina	0,9919	0,9987	0,9991	0,9979	0,9945	0,9953
84	sulfatiazol	0,9972	0,9984	0,9964	0,9984	0,9989	0,9992
85	tebuconazole	0,9900	0,9912	0,9981	0,9912	0,9952	0,9987
86	terbufos	0,9977	0,9975	1,0000	0,9975	0,9993	0,9951
87	terbutilazina	0,9960	0,9987	0,9954	0,9951	0,9996	0,9984
88	tetraconazole	0,9974	0,9931	0,9994	1,0000	0,9999	0,9991
89	tiacloprido	0,9951	0,9954	0,9981	0,9969	0,9975	0,9991
90	tiametoxam	0,9969	0,9993	0,9995	0,9959	0,9993	0,9945
91	tidicarbe	0,9949	0,9986	0,8952	0,9952	0,9910	0,9995
92	tolclofos	0,9989	0,9991	0,9944	0,9990	0,9986	0,9955
93	triadimefom	0,9947	0,9982	0,9949	0,9974	0,9946	0,9952
94	triadimenol	0,9968	0,9960	0,9992	0,9015	0,9989	0,9908
95	triazofos	0,9966	0,9989	0,9985	0,9991	0,9981	0,9979
96	triclorfom	0,9928	0,9964	0,9950	0,9955	0,9993	0,9961
97	trifloxistrobina	0,9968	0,9921	0,9984	0,9945	0,9953	0,9980
98	triflumizole	0,9979	0,9993	0,9960	0,9993	0,9958	0,9985
99	trimetroprima	0,9902	0,9950	0,9976	1,0000	0,9974	0,9970
100	vamidationa	0,9981	0,9915	0,9954	0,9969	0,9912	0,9984

*Faixa linear: 1,0 – 250,0 µg L⁻¹ (para todos os compostos avaliados)

Através dos dados obtidos para a construção das curvas analíticas, e análise das equações das retas obtidas no LC-MS/MS é possível concluir que o modelo de regressão linear é adequado para as determinações analíticas em estudo. Os agrotóxicos e medicamentos veterinários presentes nas soluções analíticas apresentaram r^2 de no mínimo de 0,99, sendo que mais de 75% de todas as soluções apresentaram este parâmetro acima de 0,995. Desta forma, este parâmetro está de acordo com as orientações da ANVISA e do INMETRO. Todos os compostos analisados apresentaram faixa linear entre 1,0 – 250,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

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

Para a determinação da estimativa dos valores de LOD e LOQ (instrumento e método) utilizaram-se os valores de área obtidos através das 6 injeções, que foram realizadas para obtenção das curvas analíticas no solvente (acetonitrila) e no extrato de cada uma das matrizes avaliadas (carne, fígado, rim, leite e ovo).

Os valores calculados dos LOD e LOQ estimados, tanto para o instrumento quanto para o método, foram calculados conforme o item 3.7.3. As soluções preparadas respectivamente em acetonitrila e nos extratos das matrizes foram analisadas por LC-MS/MS modo ESI (+/-), conforme descrito no item, 3.4.1 e 3.4.2. Avaliando os resultados observa-se que todos os compostos foram detectados na faixa de concentração entre 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 250 $\mu\text{g L}^{-1}$, tanto nas soluções preparadas em acetonitrila como naquelas preparadas nos extratos das matrizes. Desta forma os valores estimados de LOD_i e LOQ_i para todos os compostos foram de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 3,3 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Estes valores foram estimados tanto nas soluções preparadas no solvente, como nos extratos obtidos a partir das matrizes avaliadas (carne, fígado, rim, leite e ovo).

O LOD_m e o LOQ_m foram avaliados conforme descrito no item 3.7.3. O método desenvolvido não apresenta fator de diluição e/ou concentração, sendo assim, todos os compostos apresentaram valores estimados de LOD_m e LOQ_m de 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 3,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para carne, fígado, rim, ovo e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 3,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para leite.

4.5.4 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão do método

As Tabelas 8, 9, 10, 11 e 12 apresentam os resultados das recuperações médias (n=6) percentuais, o RSD% e o LOQ_m para os 91 agrotóxicos e 9 medicamentos veterinários que foram fortificados em carne, fígado, rim e ovo, nos níveis de 10, 25 e 50 µg kg⁻¹ e leite (10, 25 e 50 µg L⁻¹), extraídos pelo método QuEChERS modificado.

Os valores de recuperação foram calculados utilizando-se as curvas analíticas preparadas nos extratos da matriz, de acordo com o método de extração utilizado. Neste trabalho, seguiu-se a recomendação de validação de métodos cromatográficos, na qual as recuperações devem estar entre 70 e 120% (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2010).

O valor do LOQ_m (em µg kg⁻¹ e/ou µg L⁻¹), foi determinado como sendo a menor concentração que, ao ser fortificada na matriz, apresentou recuperações entre 70 e 120%, com RSD% menor ou igual a 20% (PIZZUTTI *et al.*, 2007)

Tabela 8. Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carne

nº	Compostos	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ _m ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
		10		25		50		
		rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	
1	2,4 D	48,0	19,4	25,2	19,0	39,1	10,7	n.q.
2	2,4,5 T	101,3	11,3	71,7	11,9	70,1	8,1	10
3	3-OH Carbofuran	98,8	13,7	92,1	4,9	93,8	9,7	10
4	atrazina	84,2	7,4	90,6	4,7	93,6	8,1	10
5	azinfos etilico	92,8	14,7	104,6	3,3	104,5	7,6	10
6	azinfos metilico	87,3	12,3	106,3	4,7	94,4	7,2	10
7	azoxistrobina	93,2	10,7	100,7	2,5	94,8	7,3	10
8	bentazona	97,6	8,5	99,4	8,8	104,9	6,5	10
9	bispiribaque	74,8	14,0	78,1	3,8	75,5	7,8	10
10	bitertanol	90,9	16,0	92,5	7,9	108,8	11,2	10
11	boscalida	94,5	17,6	97,5	14,3	108,1	10,5	10
12	bromoconazole	81,3	8,6	85,4	5,6	82,8	4,5	10
13	buprofezina	76,7	13,6	84,5	6,3	78,6	5,5	10
14	carbaril	89,7	10,7	81,9	13,5	84,0	4,1	10
15	carbendazina	83,0	9,7	90,0	8,8	85,8	8,9	10
16	carbofurano	79,7	13,3	100,9	14,8	115,8	3,4	10
17	carboxim	82,8	9,0	98,5	6,6	97,2	5,3	10
18	cianizina	94,8	10,0	95,6	6,9	83,1	18,0	10
19	clomazone	82,6	14,7	101,0	3,8	94,9	7,2	10
20	cloranfenicol	98,2	6,6	100,3	8,4	95,6	2,3	10
21	clorimurom	72,7	16,2	94,3	5,8	97,7	4,7	10
22	clorpirifos etilico	71,9	5,0	105,6	10,2	104,0	10,0	10
23	clorpirifos metil	72,5	4,3	92,6	10,3	89,4	16,7	10
24	clorprofam	72,0	12,0	107,0	9,2	104,9	9,2	10
25	deltametrina	74,4	18,2	82,7	5,3	75,7	13,4	10
26	diazinona	80,6	12,8	91,4	7,7	95,4	8,4	10
27	diclofluanida	45,5	2,2	62,8	10,1	60,0	5,2	n.q.
28	difenoconazole	84,3	16,6	91,2	5,2	80,5	5,1	10
29	dimetoato	95,5	9,6	93,1	8,7	93,5	4,3	10
30	epoxiconazole	100,3	10,2	98,7	5,6	104,5	8,9	10
31	etiona	80,0	13,6	90,1	8,3	85,2	7,0	10
32	fempropatrina	76,5	13,9	87,1	3,4	80,2	11,2	10
33	fempropimorfe	58,1	15,7	81,9	11,9	79,6	7,3	25
34	fenarimol	98,7	18,3	112,0	18,9	110,7	10,2	10
35	fentiona	80,0	13,2	89,8	8,7	85,5	3,9	10
36	fipronil	76,0	9,2	94,1	0,7	89,3	10,4	10
37	fluquiconazole	82,3	13,5	103,5	6,5	102,6	6,1	10
38	fluroxipir	36,8	16,0	41,4	17,0	46,0	7,6	n.q.
39	flutalonil	94,8	11,3	99,3	11,7	106,4	18,5	10
40	imazalil	76,2	5,6	94,9	14,4	88,4	9,2	10

41	imidacloprido	93,2	9,7	90,0	5,3	86,9	8,2	10
42	iprovalicarbe	91,6	15,6	110,2	2,9	100,1	8,3	10
43	linurom	88,6	19,1	109,1	3,9	107,5	5,6	10
44	malationa	83,9	14,9	96,4	14,4	116,2	2,1	10
45	mecarbam	92,1	11,9	109,3	5,0	96,4	3,0	10
46	mepronil	93,2	12,2	99,5	7,3	90,5	4,9	10
47	metaconazole	87,9	16,7	93,6	6,0	88,3	1,8	10
48	metalaxil	88,0	12,7	94,3	7,7	91,7	3,9	10
49	metamidofos	76,7	7,0	72,1	6,7	70,0	4,4	10
50	metiocarbe sulfona	83,6	15,2	104,3	9,6	101,9	7,8	10
51	metiocarbe sulfoxido	89,9	4,6	118,8	3,8	106,1	8,3	10
52	metsulfurom metilico	76,0	8,0	79,8	5,1	75,8	3,7	10
53	mevinfos	92,5	4,9	90,7	4,8	98,2	7,6	10
54	miclobutanil	94,7	11,7	103,0	12,2	89,8	8,2	10
55	monesina	71,0	19,4	72,0	11,1	75,0	6,5	10
56	monocrotofos	85,8	5,9	86,6	1,2	87,6	11,6	10
57	monolinurom	91,8	12,5	100,8	16,3	102,8	5,2	10
58	oxamil	99,6	13,9	89,5	6,2	110,9	5,8	10
59	paraoxon	109,7	6,1	98,7	11,3	102,9	7,0	10
60	pendimetalina	82,5	9,5	102,0	3,0	92,0	15,1	10
61	piraclostrobina	83,6	14,4	89,9	9,0	106,3	7,1	10
62	pirazofos	90,7	14,0	95,0	3,4	85,5	3,9	10
63	piridaben	71,5	17,9	78,6	4,9	71,5	10,0	10
64	piridafetiona	97,5	12,6	108,9	3,1	102,6	1,4	10
65	piridato	63,1	14,2	71,6	5,5	73,0	13,4	25
66	pirimetanil	81,6	9,2	78,7	5,8	77,8	7,4	10
67	pirimicarbe	99,8	8,7	94,9	16,0	93,4	11,8	10
68	pirimifos metilico	85,2	10,2	89,9	9,7	93,4	3,4	10
69	procloraz	81,2	11,3	87,5	4,5	81,2	3,7	10
70	profenofos	77,5	14,9	82,8	6,8	79,9	3,6	10
71	profoxidim	73,6	17,4	87,2	5,9	74,9	15,1	10
72	propargito	82,1	14,1	86,4	3,7	79,9	10,1	10
73	propiconazole	89,7	13,3	94,8	9,5	87,5	3,4	10
74	propizamida	87,2	14,6	106,1	4,8	94,7	4,4	10
75	propoxur	92,0	10,7	106,9	1,8	103,4	5,7	10
76	quinclorac	30,3	18,0	30,7	19,0	45,0	11,7	n.q.
77	quinoxifeno	75,9	15,0	103,8	12,4	99,0	9,3	10
78	robenidina	75,5	5,8	80,7	4,4	81,0	12,1	10
79	salbutamol	75,0	12,0	81,0	8,0	85,0	13,0	10
80	salinomicina	45,1	13,6	61,9	19,3	45,1	16,9	n.q.
81	simazina	102,1	8,2	84,5	17,5	90,6	7,2	10
82	sulfadimetoxina	95,4	6,8	93,6	10,7	105,0	6,2	10
83	sulfametazina	94,8	9,4	90,2	4,1	87,4	7,6	10
84	sulfatiazol	81,4	6,4	86,8	15,9	97,1	7,4	10
85	tebuconazole	86,8	2,0	91,1	6,5	91,8	10,6	10
86	terbufos	82,6	14,1	85,5	10,9	94,0	13,3	10
87	terbutilazina	83,1	11,6	104,4	3,6	97,4	7,8	10

88	tetraconazole	97,8	12,8	112,4	3,0	101,6	4,0	10
89	tiacloprido	92,6	7,6	83,3	50,1	106,8	7,3	10
90	tiametoxam	93,1	8,6	96,0	5,8	96,1	11,9	10
91	tidicarbe	42,0	13,7	70,7	17,6	74,0	5,5	25
92	tolclofos	97,9	13,3	83,6	20,0	78,6	14,9	10
93	triadimefom	91,5	12,4	101,9	10,2	97,1	9,9	10
94	triadimenol	92,8	11,1	98,4	4,3	92,2	6,0	10
95	triazofos	93,2	14,5	108,3	3,8	100,4	1,7	10
96	triclorfom	87,6	11,9	84,4	49,7	94,7	7,2	10
97	trifloxistrobina	91,6	13,0	95,7	1,9	86,7	9,4	10
98	triflumizole	79,9	13,7	83,5	5,3	79,5	4,0	10
99	trimetroprima	86,3	8,1	80,4	4,5	75,0	3,8	10
100	vamidationa	90,2	7,2	94,5	12,2	101,8	6,4	10

* n= 6 (6 extrações x 1 injeção de cada extrato)

n.q.= não quantificado com confiança nos níveis de fortificação avaliados

A Tabela 8, mostra que 84% dos agrotóxicos avaliados na matriz carne apresentaram percentuais de recuperação entre 70-120% ($RSD \leq 20\%$) e LOQ_m de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura 9). Por outro lado, os compostos fempropimorfe, piridato e tidicarbe apresentaram LOQ_m de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os agrotóxicos 2,4D, diclofluanida, fluroxipir e quinclorac, não foram quantificados com segurança nos níveis de fortificação avaliados, uma vez que apresentaram valores médios de recuperação fora da faixa permitida para análise de resíduos (70-120%) e/ou valores de $RSD > 20\%$. Dos 9 medicamentos veterinários analisados, somente o composto salinomicina não apresentou percentuais de recuperação e RSD considerados satisfatórios.

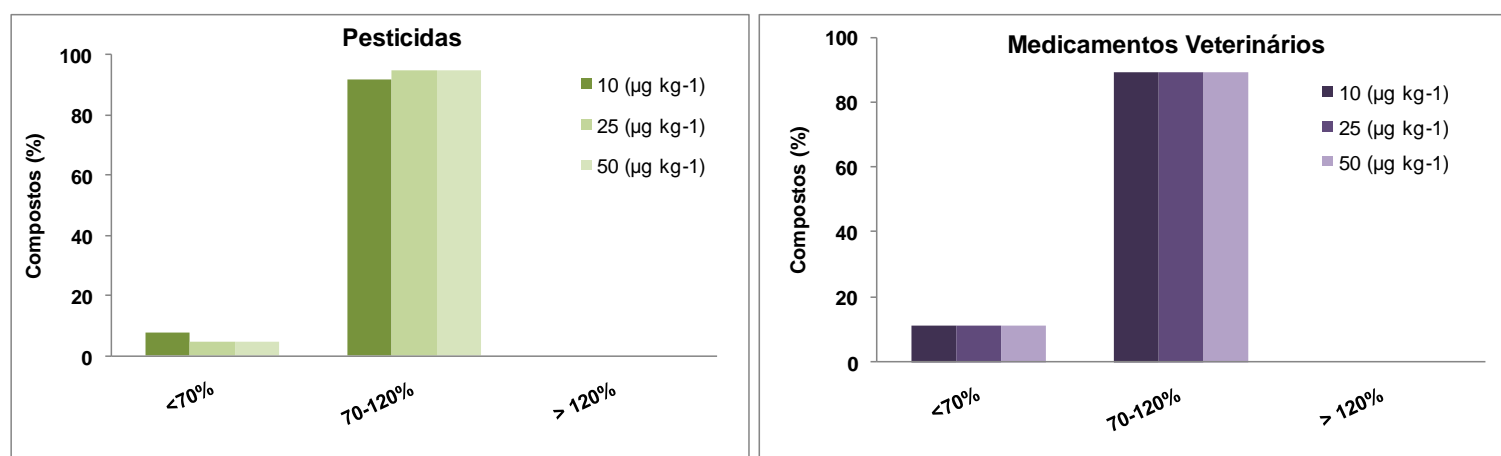


Figura 9. Percentual de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carne, que apresentaram faixas de recuperação de <70%, 70-120% e >120%, após ensaios de fortificação e recuperação, extraídos com método QuEChERS modificado.

Tabela 9. Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em fígado

Compostos	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ _m ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	10		25		50		
	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	
2,4 D	64,0	14,0	43,9	14,0	31,1	14,3	n.q.
2,4,5 T	47,7	5,8	40,8	18,4	20,0	0,3	n.q.
3-OH Carbofuran	89,0	4,2	97,3	3,5	89,0	0,1	10
atrazina	73,5	14,0	82,5	6,0	93,3	1,0	10
azinfos etílico	88,1	13,0	100,4	0,5	98,7	2,8	10
azinfos metílico	71,3	19,0	100,9	0,3	93,1	1,9	10
azoxistrobina	75,4	9,2	92,2	10,2	86,6	2,5	10
bentazona	83,1	1,5	94,4	16,8	93,0	1,4	10
bispiribaque	93,8	2,2	75,7	3,5	52,5	5,9	10
bitertanol	95,8	1,6	73,8	12,7	82,5	4,2	10
boscalida	80,9	12,0	98,9	2,1	95,3	3,0	10
bromoconazole	81,1	3,5	85,5	1,4	82,4	3,6	10
buprofezina	92,0	8,5	80,0	9,0	70,1	0,1	10
carbaril	75,6	12,7	86,6	6,9	84,8	3,0	10
carbendazina	96,4	5,1	98,4	2,1	83,1	1,5	10
carbofurano	89,3	5,1	101,4	9,4	93,4	2,4	10
carboxim	85,2	2,3	95,0	6,5	83,9	0,5	10
cianizina	84,5	14,4	90,8	1,9	90,4	0,9	10
clomazone	88,0	9,0	94,4	12,8	84,8	0,3	10
cloranfenicol	108,8	2,8	100,1	1,9	86,9	0,7	10
clorimurrom	88,3	6,9	80,6	14,4	78,4	3,3	10
clorpirifos etílico	83,9	16,7	90,0	22,5	110,8	0,2	10
clorpirifos metil	75,7	4,2	85,7	24,4	78,6	6,0	10
clorprofam	75,3	10,1	103,1	0,2	97,1	1,3	10
deltametrina	79,9	4,8	81,5	3,0	72,9	9,1	10
diazinona	91,6	2,8	81,8	0,9	79,6	0,1	10
diclofluanida	64,8	9,9	43,8	14,4	51,4	19,8	n.q.
difenoconazole	89,7	7,7	86,6	3,5	80,5	0,1	10
dimetoato	87,7	5,2	97,5	9,4	89,8	1,1	10
epoxiconazole	72,3	10,3	98,4	0,1	98,8	3,7	10
etiona	80,1	5,8	81,0	21,3	79,9	3,3	10
fempropatrina	93,1	8,5	85,5	1,8	70,9	10,6	10
fempropimorfe	50,5	0,6	93,9	7,4	73,0	10,2	25
fenarimol	79,4	9,5	111,7	10,0	93,5	0,6	10
fentiona	84,0	4,3	83,0	12,9	86,4	6,5	10
fipronil	104,5	0,7	98,7	6,9	89,1	1,4	10
fluquiconazole	75,4	18	104,3	5,8	72,5	14,4	10
fluroxipir	45,0	5,4	66,9	19,0	23,7	7,1	n.q.
flutalonil	80,9	10,7	104,5	10,6	96,7	3,9	10
imazalil	107,1	4,5	87,6	11,9	78,9	1,5	10
imidacloprido	108,5	17,1	79,2	8,4	91,8	2,2	10

iprovalicarbe	76,4	8,9	105,7	7,4	103,6	4,2	10
linurom	70,7	9,4	98,5	10,9	90,1	5,6	10
malationa	74,0	9,5	100,8	2,0	90,3	4,4	10
mecarbam	79,0	5,6	110,8	8,2	98,7	2,6	10
mepronil	72,8	11,4	101,2	11,5	92,3	1,0	10
metaconazole	99,7	4,6	89,4	4,2	82,1	0,2	10
metalaxil	88,7	0,8	85,9	7,0	87,1	1,6	10
metamidofos	75,0	2,3	77,3	7,9	76,9	3,2	10
metiocarbe sulfona	78,5	3,6	80,3	3,5	89,4	1,2	10
metiocarbe sulfoxido	85,8	2,9	102,1	15,7	87,6	3,7	10
metsulfurom metilico	81,3	2,1	77,5	2,3	82,2	1,5	10
mevinfos	73,2	11,0	85,8	2,8	89,2	0,6	10
miclobutanil	74,3	12,0	112,2	19,8	96,3	4,4	10
monesina	83,1	4,3	66,0	4,4	74,2	5,4	10
monocrotofos	84,7	8,9	76,8	17,3	83,7	2,9	10
monolinurom	81,1	4,1	92,1	1,4	84,5	6,7	10
oxamil	87,1	2,2	90,1	2,1	103,9	0,7	10
paraoxon	86,0	3,5	99,9	9,5	93,6	1,5	10
pendimetalina	86,0	3,1	93,0	15,5	85,5	3,4	10
piraclostrobina	95,6	11,2	97,3	7,2	85,6	3,3	10
pirazofos	100,2	4,8	91,8	3,4	85,0	1,2	10
piridaben	77,1	2,0	80,9	5,4	72,5	2,6	10
piridafetiona	80,3	12,0	113,7	11,8	94,8	3,0	10
piridato	61,7	19,0	66,8	1,0	76,0	4,8	50
pirimetanil	70,5	3,2	74,2	0,9	79,6	10,4	10
pirimicarbe	97,3	7,4	92,6	6,6	84,0	2,3	10
pirimifos metilico	83,0	8,2	81,2	1,0	85,9	1,2	10
procloraz	84,6	0,7	84,3	4,0	80,2	0,8	10
profenofos	74,8	3,0	78,0	7,4	75,3	1,1	10
profoxidim	76,7	2,4	87,4	5,3	75,2	0,2	10
propargito	75,9	13,0	83,0	1,4	77,1	2,2	10
propiconazole	86,2	4,8	91,5	3,0	82,7	1,3	10
propizamida	87,9	10,3	107,6	5,1	89,2	0,3	10
propoxur	80,2	2,8	101,0	7,4	91,3	0,6	10
quinclorac	65,0	12,0	23,7	10,7	50,1	5,2	n.q.
quinoxifeno	86,7	2,0	86,4	2,3	79,1	2,7	10
robenidina	85,7	1,9	79,7	0,1	81,3	1,2	10
salbutamol	76,7	8,0	75,7	7,9	80,0	5,0	10
salinomicina	55,1	10,0	53,5	0,9	47,3	4,2	n.q.
simazina	75,0	8,6	78,3	13,5	88,5	0,8	10
sulfadimetoxina	88,2	4,5	119,4	14,0	93,9	1,2	10
sulfametazina	98,5	0,2	89,8	1,2	90,6	1,9	10
sulfatiazol	89,5	1,8	89,0	2,4	97,2	0,4	10
tebuconazole	88,5	2,3	90,8	10,7	89,1	0,9	10
terbufos	78,3	2,6	86,4	3,1	76,2	1,7	10
terbutilazina	73,2	11,7	93,9	10,2	85,1	0,9	10
tetraconazole	76,0	10,7	115,4	1,5	105,9	3,6	10

tiacloprido	76,0	7,4	90,2	2,3	87,2	0,8	10
tiametoxam	94,2	13,6	94,7	0,6	92,2	4,1	10
tidicarbe	55,8	1,9	50,6	3,8	58,8	14,0	n.q.
tolclofos	95,1	5,2	103,6	13,8	102,6	2,3	10
triadimefom	74,5	3,1	113,1	9,2	93,0	1,6	10
triadimenol	78,3	10,7	100,7	11,0	100,2	5,3	10
triazofos	88,2	8,3	109,5	8,5	99,6	2,3	10
triclorfom	92,2	18,4	93,6	6,2	93,5	1,1	10
trifloxistrobina	87,2	5,2	93,9	1,0	88,1	1,0	10
triflumizole	81,1	17,5	80,5	1,3	78,3	4,2	10
trimetoprima	76,5	4,8	71,0	7,06	84,5	0,6	10
vamidationa	107,7	1,7	87,9	0,5	87,9	0,7	10

* n= 6 (6 extrações x 1 injeção de cada extrato)

n.q.= não quantificado com confiança nos níveis de fortificação avaliados

A Tabela 9, mostra que 84% dos agrotóxicos avaliados na matriz fígado apresentaram percentuais de recuperação entre 70-120% ($RSD \leq 20\%$) e LOQ_m de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura 10). Por outro lado, os compostos fempropimorfe e piridato e apresentam LOQ_m de 25 e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Os agrotóxicos 2,4D, 2,4,5 T, fluroxipir, quinclorac e tidicarbe, não foram quantificados com segurança nos níveis de fortificação avaliados, uma vez que apresentaram valores médios de recuperação fora da faixa permitida para análise de resíduos (70-120%) e/ou valores de $RSD > 20\%$. Dos 9 medicamentos veterinários analisados, somente o composto salinomicina não apresentou percentuais de recuperação e RSD considerados satisfatórios.

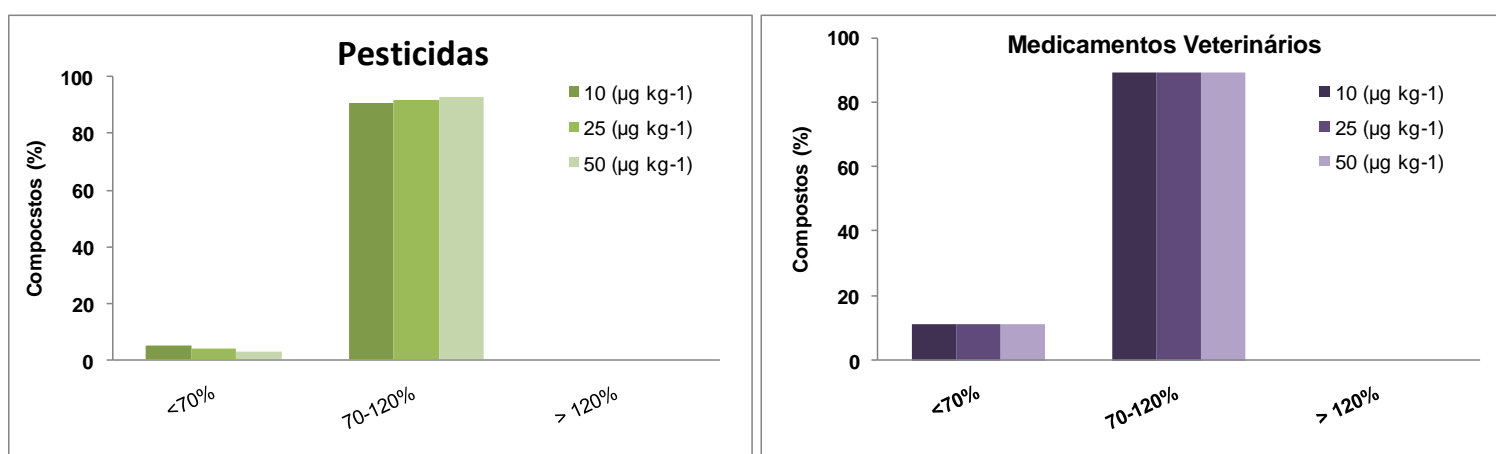


Figura 10. Percentual de agrotóxicos e medicamentos veterinários em fígado, que apresentaram faixas de recuperação de <70%, 70-120% e >120%, após ensaios de fortificação e recuperação, extraídos com método QuEChERS modificado.

Tabela 10. Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em rim

Compostos	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)						LOQ _m ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	10		25		50		
	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	
1 2,4 D	-		-		-		n.q.
2 2,4,5 T	28,2	12,0	29,4	15,1	49,0	3,1	n.q.
3 3-OH Carbofuran	84,5	13,7	91,3	7,6	90,5	10,6	10
4 atrazina	90,8	3,6	83,6	5,0	88,6	6,4	10
5 azinfos etílico	107,0	6,3	112,7	11,2	88,7	8,6	10
6 azinfos metílico	70,0	7,0	96,1	7,5	92,3	4,5	10
7 azoxistrobina	95,1	3,0	89,4	3,2	89,6	5,4	10
8 bentazona	79,3	3,2	74,3	9,0	82,4	11,1	10
9 bispiribaque	70,3	19,8	73,0	16,2	77,0	8,2	10
10 bitertanol	95,6	11,5	96,4	9,2	82,1	5,0	10
11 boscalida	100,6	10,2	82,3	2,2	93,2	7,0	10
12 bromoconazole	83,2	8,4	82,9	7,1	82,6	7,0	10
13 buprofezina	84,7	12,4	76,0	5,6	76,7	7,6	10
14 carbaril	86,4	18,4	92,3	1,2	93,3	6,7	10
15 carbendazina	100,2	12,7	101,8	13,5	100,6	10,5	10
16 carbofurano	94,5	2,1	93,2	5,7	88,9	3,7	10
17 carboxim	88,1	2,9	85,1	3,3	85,6	5,2	10
18 cianizina	91,8	14,6	86,8	7,5	106,1	8,7	10
19 clomazone	86,2	4,6	80,6	4,5	83,9	6,2	10
20 cloranfenicol	94,7	8,9	96,6	1,6	92,9	13,9	10
21 clorimurum	87,0	4,8	80,6	6,9	99,5	18,4	10
22 clorpirifos etílico	92,3	10,5	98,8	13,9	106,8	10,6	10
23 clorpirifos metil	90,3	14,5	83,5	13,2	79,7	16,3	10
24 clorprofam	96,0	16,6	106,8	5,5	103,2	13,9	10
25 deltametrina	81,8	7,7	77,6	6,6	79,9	5,0	10
26 diazinona	87,3	7,6	80,8	6,0	89,7	7,0	10
27 diclofluanida	60,7	18,0	56,2	14,1	62,0	18,0	n.q.
28 difenoconazole	96,9	10,0	88,7	4,6	92,1	13,6	10
29 dimetoato	88,7	5,8	88,9	6,8	85,2	5,3	10
30 epoxiconazole	91,6	10,5	103,8	3,7	90,5	7,1	10
31 etiona	85,8	4,4	76,0	9,6	72,3	14,9	10
32 fempropatrina	91,8	4,1	82,0	4,9	82,0	4,3	10
33 fempropimorfe	67,4	11,6	77,6	9,0	75,0	16,8	25
34 fenarimol	92,5	13,0	96,1	7,5	85,4	11,6	10
35 fentiona	88,7	12,1	70,9	10,3	87,3	10,4	10
36 fipronil	102,3	5,5	96,9	4,2	97,0	7,0	10
37 fluquiconazole	90,0	13,0	108,2	11,1	80,1	8,6	10
38 fluroxipir	-		-		-		n.q.
39 flutalonil	92,6	3,6	91,2	5,4	92,5	4,6	10
40 imazalil	73,3	7,3	79,1	6,4	81,3	5,2	10

41	imidacloprido	93,3	2,8	80,6	10,0	88,5	7,4	10
42	iprovalicarbe	87,1	5,2	105,5	6,0	88,7	3,0	10
43	linurom	70,8	13,0	82,9	8,4	84,9	7,1	10
44	malationa	93,2	7,3	103,1	8,7	90,4	8,6	10
45	mecarbam	87,4	16,0	109,9	5,7	87,4	7,1	10
46	mepronil	89,1	6,0	110,3	4,1	94,4	7,2	10
47	metaconazole	100,6	2,8	85,9	6,6	83,3	7,6	10
48	metalaxil	92,3	2,8	91,9	2,6	88,4	6,7	10
49	metamidofos	74,9	6,3	77,2	5,7	78,6	12,9	10
50	metiocarbe sulfona	89,9	18,6	78,6	18,1	73,5	12,8	10
51	metiocarbe sulfoxido	87,0	5,0	88,7	5,8	87,3	8,7	10
52	metsulfurom metilico	79,9	2,8	76,2	7,7	78,2	10,7	10
53	mevinfos	75,3	9,6	85,6	3,0	77,7	14,6	10
54	miclobutanil	99,4	8,7	114,3	7,0	95,6	12,7	10
55	monesina	70,0	5,4	73,0	7,2	76,0	3,7	10
56	monocrotfos	84,4	5,1	70,0	2,6	83,0	7,5	10
57	monolinurom	89,6	4,1	87,4	7,5	75,0	18,9	10
58	oxamil	91,9	6,1	87,5	4,5	96,5	7,4	10
59	paraoxon	88,4	7,4	98,2	10,5	90,3	3,8	10
60	pendimetalina	85,3	2,9	86,1	3,8	88,2	7,6	10
61	piraclostrobina	87,8	4,7	90,0	3,3	84,3	7,4	10
62	pirazofos	102,2	6,5	95,7	3,1	93,3	5,8	10
63	piridaben	73,6	4,3	75,0	8,4	75,3	4,4	10
64	piridafetiona	92,1	4,4	119,2	2,8	93,3	6,2	10
65	piridato	55,7	4,3	59,9	5,5	59,9	13,4	n.q.
66	pirimetanil	78,3	4,3	81,2	6,7	80,2	13,8	10
67	pirimicarbe	89,0	7,7	86,6	4,7	85,8	11,2	10
68	pirimifos metilico	84,7	6,9	82,6	5,6	82,4	4,3	10
69	procloraz	84,6	6,6	83,7	2,5	80,1	5,2	10
70	profenofos	82,9	12,4	75,9	6,3	78,8	10,7	10
71	profoxidim	85,6	5,5	79,6	5,5	79,3	5,5	10
72	propargito	82,7	11,4	84,4	3,1	74,4	17,9	10
73	propiconazole	85,9	11,8	88,4	3,9	86,6	10,8	10
74	propizamida	96,9	6,5	114,3	6,5	87,3	3,3	10
75	propoxur	93,5	6,9	91,1	5,7	92,0	8,0	10
76	quinclorac	-	-	-	-	-	-	n.q.
77	quinoxifeno	70,3	13,9	75,0	6,8	76,7	9,9	10
78	robenidina	70,5	14,9	73,5	7,3	70,9	13,6	10
79	salbutamol	87,0	18,0	92,0	16,0	79,0	12,0	10
80	salinomicina	43,8	13,2	54,7	4,2	54,8	15,6	n.q.
81	simazina	84,6	7,3	70,0	1,4	90,1	17,2	10
82	sulfadimetoxina	106,3	4,5	90,7	4,0	84,8	16,5	10
83	sulfametazina	92,1	7,1	87,3	3,9	87,5	8,2	10
84	sulfatiazol	90,0	6,9	79,0	5,2	87,8	7,8	10
85	tebuconazole	78,4	13,0	88,9	10,7	87,4	17,2	10
86	terbufos	76,1	11,0	85,6	9,4	76,3	14,8	10
87	terbutilazina	85,2	3,0	86,3	6,0	82,1	6,3	10

88	tetraconazole	107,6	6,6	107,5	8,2	88,8	13,9	10
89	tiacloprido	88,8	3,6	85,4	3,9	86,3	9,7	10
90	tiametoxam	87,9	2,6	88,0	6,1	84,3	6,7	10
91	tidicarbe	56,9	4,0	53,5	19,2	86,6	3,9	50
92	tolclofos	91,7	7,2	98,2	10,4	92,8	16,0	10
93	triadimefom	84,3	13,1	118,8	1,7	93,9	8,6	10
94	triadimenol	94,0	7,0	105,6	8,2	86,1	13,4	10
95	triazofos	99,3	9,1	117,8	5,4	89,9	13,0	10
96	triclorfom	102,0	5,7	88,9	10,7	91,3	10,5	10
97	trifloxistrobina	90,6	10,0	90,8	5,1	86,1	5,8	10
98	triflumizole	90,8	6,3	80,6	4,9	75,8	14,9	10
99	trimetroprima	93,0	13,4	72,7	7,1	82,9	6,6	10
100	vamidationa	92,2	9,9	88,4	1,8	92,4	7,3	10

* n= 6 (6 extrações x 1 injeção de cada extrato)

n.q.= não quantificado com confiança nos níveis de fortificação avaliados

A Tabela 10 apresenta os resultados das recuperações médias (n=6) percentuais e o RSD% para os 100 compostos que foram fortificados em rim nos níveis de 10, 25 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Cerca de 80% dos agrotóxicos apresentaram percentuais de recuperação entre 70-120% e valores de RSD $\leq 20\%$ (LOQ_m de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Os compostos fempropimorfe e tiodicarbe apresentaram LOQ_m de 25 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Um total de 89% dos medicamentos veterinários avaliados apresentou a faixa de 70-120% de recuperação e RSD $\leq 20\%$ (LOQ_m de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (Figura 11). Os agrotóxicos diclofluanida, 2,4,5 T, fluroxipir, quinclorac, 2,4D, piridato e o medicamento veterinário salinomicina, não foram quantificados.

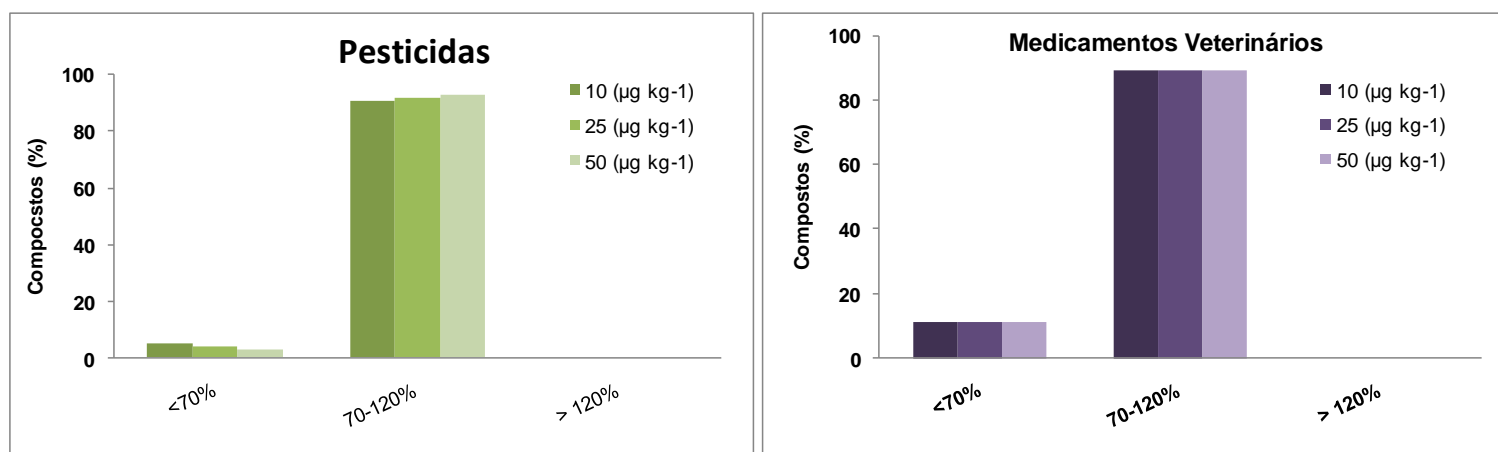


Figura 11. Percentual de agrotóxicos e medicamentos veterinários em rim, que apresentaram faixas de recuperação de <70%, 70-120% e >120%, após ensaios de fortificação e recuperação, extraídos com método QuEChERS modificado.

Tabela 11. Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em leite

nº	Compostos	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)						LOQ _m ($\mu\text{g L}^{-1}$)
		10		25		50		
		rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	
1	2,4 D	22,0	16,0	46,0	15,0	50,0	11,1	n.q.
2	2,4,5 T	81,7	15,5	88,4	10,3	80,6	6,2	10
3	3-OH Carbofuran	83,3	17,7	100,1	12,3	82,9	5,0	10
4	atrazina	90,8	15,7	96,9	13,9	82,3	1,6	10
5	azinfos etílico	87,3	15,2	94,0	14,2	109,4	5,8	10
6	azinfos metílico	81,5	14,2	88,7	8,6	82,8	4,8	10
7	azoxistrobina	76,5	12,9	85,3	15,7	83,4	1,1	10
8	bentazona	90,1	15,0	96,2	8,9	103,3	14,8	10
9	bispirabaque	89,0	18,8	96,1	13,8	83,6	6,4	10
10	bitertanol	89,5	14,6	92,9	8,0	89,9	6,3	10
11	boscalida	100,6	11,8	104,6	12,1	103,5	9,0	10
12	bromoconazole	74,4	13,1	87,6	13,8	73,8	4,0	10
13	buprofezina	73,7	15,8	80,3	19,9	71,0	3,1	10
14	carbaril	77,9	10,2	102,6	18,7	78,9	3,4	10
15	carbendazina	74,6	19,3	97,4	14,4	79,0	1,6	10
16	carbofurano	90,1	13,6	106,4	15,3	84,3	2,2	10
17	carboxim	79,0	19,2	98,2	8,0	82,4	3,7	10
18	cianizina	82,0	14,1	102,7	12,2	84,8	3,6	10
19	clomazone	85,5	16,6	101,3	15,8	85,5	2,2	10
20	cloranfenicol	93,5	17,2	96,8	14,9	77,2	3,0	10
21	clorimurom	98,2	13,2	83,7	16,0	100,9	9,3	10
22	clorpirifos etílico	96,0	9,0	99,6	2,6	98,7	11,4	10
23	clorpirifos metil	87,4	6,4	90,0	5,1	93,3	9,4	10
24	clorprofam	98,7	15,1	79,1	3,4	84,3	3,7	10
25	deltametrina	61,2	13,0	86,5	16,6	74,3	4,1	25
26	diazinona	79,7	19,0	86,6	13,5	77,5	2,9	10
27	diclofluanida	46,5	5,5	30,7	9,7	49,8	56,3	n.q.
28	difenoconazole	73,3	12,3	88,9	18,3	77,9	2,8	10
29	dimetoato	86,6	12,8	101,1	10,3	85,0	3,0	10
30	epoxiconazole	101,8	12,0	105,7	13,9	96,2	11,2	10
31	etiona	74,0	1,6	102,5	10,3	79,6	1,9	10
32	fempropatrina	68,9	10,6	91,7	14,4	77,7	3,1	25
33	fempropimorfe	104,2	2,0	102,2	8,4	95,2	1,8	10
34	fenarimol	98,5	14,9	96,7	16,8	87,8	7,5	10
35	fentiona	78,8	14,0	90,9	15,2	85,6	5,6	10
36	fipronil	79,6	10,3	84,8	14,9	83,8	1,7	10
37	fluquiconazole	118,9	1,3	106,9	13,3	98,8	19,1	10
38	fluroxipir	42,5	13,0	44,3	19,0	8,0	15,7	n.q.
39	flutalonil	99,6	3,9	99,4	13,8	97,6	11,6	10
40	imazalil	72,1	17,8	91,2	13,7	75,6	5,9	10
41	imidacloprido	94,6	19,2	96,5	6,6	80,4	4,5	10

42	iprovalicarbe	82,4	4,1	89,3	15,5	88,1	7,8	10
43	linurom	92,0	14,9	104,4	19,7	81,8	4,0	10
44	malationa	98,0	12,3	107,2	6,9	104,8	6,0	10
45	mecarbam	77,1	5,5	97,0	19,9	90,0	4,4	10
46	mepronil	87,3	6,7	83,0	13,0	85,1	5,6	10
47	metaconazole	85,7	16,9	91,3	19,5	73,4	6,4	10
48	metalaxil	77,1	9,1	95,7	10,9	84,0	1,3	10
49	metamidofos	87,0	17,8	101,2	13,9	72,3	2,8	10
50	metiocarbe sulfona	102,4	13,5	92,9	10,7	104,0	7,8	10
51	metiocarbe sulfoxido	99,5	14,7	101,9	6,6	98,0	9,5	10
52	metsulfurom metilico	79,0	11,8	96,4	17,1	82,6	3,2	10
53	mevinfos	85,1	16,8	97,5	6,6	80,2	4,5	10
54	miclobutanil	103,4	9,2	97,4	4,5	87,7	19,2	10
55	monesina	71,0	11,6	78,1	14,8	79,0	2,7	10
56	monocrotofos	82,2	14,5	98,8	5,3	81,9	2,5	10
57	monolinurom	83,2	13,7	100,4	19,6	85,8	3,6	10
58	oxamil	91,8	12,2	106,5	7,3	89,5	3,0	10
59	paraoxon	108,1	5,6	110,1	8,0	101,8	13,0	10
60	pendimetalina	77,6	10,5	91,1	15,0	82,3	2,3	10
61	piraclostrobina	92,1	13,8	101,5	14,8	95,2	6,3	10
62	pirazofos	78,1	14,5	85,0	14,3	80,0	2,0	10
63	piridaben	60,6	7,1	94,0	14,6	71,4	1,7	25
64	piridafetiona	95,2	15,1	96,9	13,5	83,6	9,3	10
65	piridato	58,0	6,0	63,5	15,7	68,0	3,1	n.q.
66	pirimetanil	80,3	17,1	99,7	17,1	78,3	3,8	10
67	pirimicarbe	85,8	18,8	105,8	18,0	76,9	3,1	10
68	pirimifos metilico	72,1	8,5	84,2	15,4	78,2	2,3	10
69	procloraz	70,6	12,7	92,1	19,6	79,1	3,1	10
70	profenofos	74,5	5,3	89,5	19,9	78,3	4,7	10
71	profoxidim	93,3	18,3	89,5	17,7	78,2	2,3	10
72	propargito	78,3	19,9	99,3	11,0	80,9	2,7	10
73	propiconazole	84,9	16,6	87,7	18,9	76,4	2,3	10
74	propizamida	88,4	15,8	94,9	17,8	91,7	9,6	10
75	propoxur	85,6	15,3	104,4	12,8	81,4	4,0	10
76	quinclorac	40,0	20,7	67,0	16,5	56,0	3,1	n.q.
77	quinoxifeno	62,4	11,8	80,8	11,7	75,7	3,5	25
78	robenidina	74,3	18,4	80,6	16,6	74,7	1,8	10
79	salbutamol	84,8	18,5	86,0	13,0	87,0	10,0	10
80	salinomicina	55,6	9,4	56,2	18,0	58,4	3,0	n.q.
81	simazina	75,9	5,2	100,6	13,6	86,1	4,0	10
82	sulfadimetoxina	105,8	12,0	108,2	4,7	104,6	2,6	10
83	sulfametazina	98,2	14,7	99,9	9,7	81,5	1,3	10
84	sulfatiazol	92,1	17,2	99,8	14,0	81,4	1,3	10
85	tebuconazole	86,1	8,1	88,9	14,8	77,8	5,9	10
86	terbufos	70,7	13,1	83,3	16,3	76,4	2,2	10
87	terbutilazina	88,6	19,0	105,0	14,4	87,0	7,4	10
88	tetraconazole	98,0	11,7	87,6	16,5	84,6	10,5	10

89	tiacloprido	82,5	18,6	101,2	10,2	83,3	2,0	10
90	tiametoxam	99,0	12,4	102,7	9,1	81,3	2,8	10
91	tidicarbe	79,2	16,7	102,2	17,4	80,8	4,5	10
92	tolclofos	106,6	9,8	111,9	13,6	74,4	8,6	10
93	triadimefom	81,6	5,7	106,3	6,0	93,0	8,8	10
94	triadimenol	103,2	6,1	92,7	11,3	84,0	0,7	10
95	triazofos	90,4	14,2	101,2	14,5	86,2	6,7	10
96	triclorfom	83,6	10,7	109,0	11,0	82,9	5,3	10
97	trifloxistrobina	76,6	12,8	104,4	13,5	81,2	3,6	10
98	triflumizole	70,0	9,2	105,7	12,8	75,2	2,4	10
99	trimetroprima	84,2	12,9	94,0	12,5	77,7	1,7	10
100	vamidationa	88,2	14,1	97,1	9,9	84,5	1,5	10

* n= 6 (6 extrações x 1 injeção de cada extrato)

n.q.= não quantificado com confiança nos níveis de fortificação avaliados

Observou-se que na matriz leite os compostos salinomicina, quinclorac, fluroxipir, diclofluanida e 2,4D não puderam ser quantificados em função de apresentarem valores percentuais de recuperação menores que 70%. Por outro lado, 83% dos agrotóxicos e 89% dos medicamentos veterinários apresentaram valores de LOQ_m de 10 µg L⁻¹, isto significa que apresentaram percentuais de recuperação e RSD% considerados satisfatórios neste nível de fortificação 70-120% de recuperação e RSD ≤ 20% (Figura 12).

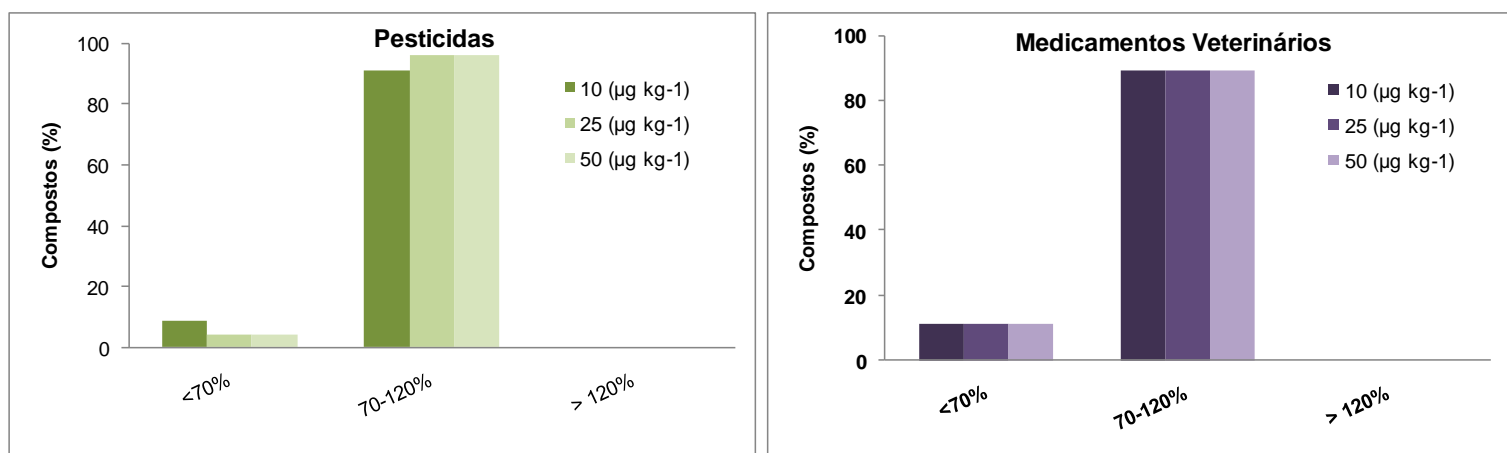


Figura 12. Percentual de agrotóxicos e medicamentos veterinários em leite, que apresentaram faixas de recuperação de <70%, 70-120% e >120%, após ensaios de fortificação e recuperação, extraídos com método QuEChERS modificado.

Tabela 12. Percentuais de recuperação e RSD para a repetitividade do método de extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em ovo

nº	Compostos	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)						LOQ _m ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
		10		25		50		
		rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	
1	2,4 D	20,5	13,0	23,6	12,0	25,0	15,0	n.q.
2	2,4,5 T	32,5	13,0	43,0	14,7	48,0	7,2	n.q.
3	3-OH Carbofuran	108,7	6,0	102,9	2,2	89,7	1,8	10
4	atrazina	106,0	6,8	95,9	2,5	88,5	4,6	10
5	azinfos etílico	113,2	4,1	97,3	6,0	98,9	1,7	10
6	azinfos metílico	109,9	5,8	101,6	2,4	88,2	6,6	10
7	azoxistrobina	100,9	15,5	105,6	5,5	83,1	5,9	10
8	bentazona	105,6	8,1	90,1	4,5	89,4	4,6	10
9	bispiribaque	83,7	5,7	86,0	6,1	83,0	8,3	10
10	bitertanol	109,5	6,6	97,2	5,6	79,9	7,0	10
11	boscalida	111,5	5,7	96,4	6,7	91,8	4,3	10
12	bromoconazole	95,6	5,3	88,7	3,3	81,4	2,6	10
13	buprofezina	79,6	6,8	70,5	3,4	70,0	1,1	10
14	carbaril	111,3	4,7	97,2	4,2	86,8	4,3	10
15	carbendazina	104,0	1,7	93,6	2,2	81,9	1,8	10
16	carbofurano	106,1	4,9	98,6	3,9	92,0	2,6	10
17	carboxim	94,4	5,5	92,8	2,2	84,5	2,3	10
18	cianizina	107,9	6,8	104,8	3,3	88,9	3,1	10
19	clomazone	106,2	5,2	94,6	3,5	83,8	1,9	10
20	cloranfenicol	115,5	3,2	93,1	3,8	87,4	2,4	10
21	clorimurom	106,8	5,3	86,7	3,9	79,6	3,7	10
22	clorpirifos etílico	102,1	13,0	99,6	4,3	108,4	3,5	10
23	clorpirifos metil	109,1	6,1	79,7	14,1	75,8	9,3	10
24	clorprofam	98,3	15,4	93,2	7,5	93,0	5,0	10
25	deltametrina	88,7	4,8	76,0	4,2	71,0	5,5	10
26	diazinona	101,4	6,2	88,2	2,5	80,5	2,0	10
27	diclofluanida	33,0	2,0	27,0	3,0	21,0	4,0	n.q.
28	difenoconazole	114,4	3,6	95,9	2,2	79,9	2,3	10
29	dimetoato	108,9	3,6	97,0	2,8	88,6	2,5	10
30	epoxiconazole	106,2	8,6	101,9	5,8	98,8	2,5	10
31	etiona	104,1	4,8	84,7	2,8	78,3	3,3	10
32	fempropatrina	95,2	8,8	75,2	2,6	71,4	5,7	10
33	fempropimorfe	85,5	5,8	90,8	2,8	73,0	8,5	10
34	fenarimol	99,8	16,4	84,9	4,2	96,0	4,4	10
35	fentiona	103,3	4,8	93,1	4,3	82,6	5,2	10
36	fipronil	110,7	4,6	102,9	2,0	88,4	2,0	10
37	fluquiconazole	101,9	10,9	109,0	6,9	94,4	7,7	10
38	fluroxipir	39,8	19,0	25,1	15,0	38,0	10,7	n.q.
39	flutalonil	117,2	1,6	106,7	2,8	94,9	3,0	10
40	imazalil	94,6	5,7	84,3	4,6	76,2	4,3	10
41	imidacloprido	110,5	5,8	102,0	4,1	90,6	3,2	10

42	iprovalicarbe	107,1	9,6	90,9	17,6	101,9	2,8	10
43	linurom	111,8	5,7	92,7	4,9	88,8	4,0	10
44	malationa	109,5	8,9	100,8	1,7	92,3	3,7	10
45	mecarbam	114,3	4,8	100,0	4,0	96,7	2,5	10
46	mepronil	107,8	9,6	102,2	1,5	91,8	0,8	10
47	metaconazole	114,2	1,7	94,0	4,0	79,8	4,3	10
48	metalaxil	112,2	6,5	104,2	2,5	87,2	1,3	10
49	metamidofos	92,4	7,5	85,6	2,9	76,8	3,3	10
50	metiocarbe sulfona	108,1	9,0	100,9	4,7	86,5	4,0	10
51	metiocarbe sulfoxido	111,6	6,1	98,6	4,4	87,1	2,1	10
52	metsulfurom metilico	104,9	2,9	89,1	3,8	82,0	2,1	10
53	mevinfos	112,4	4,5	94,1	4,6	87,8	3,3	10
54	miclobutanil	112,5	3,7	104,2	4,8	93,5	3,8	10
55	monesina	101,6	4,6	79,3	5,2	73,4	4,4	10
56	monocrotofos	109,1	2,3	96,1	2,8	83,5	1,8	10
57	monolinurom	110,5	6,3	94,4	5,3	84,7	5,4	10
58	oxamil	108,5	9,0	99,2	3,3	98,9	8,8	10
59	paraoxon	114,5	1,9	105,1	2,9	92,3	1,8	10
60	pendimetalina	108,5	3,9	93,1	1,8	84,5	2,4	10
61	piraclostrobina	113,3	2,7	96,9	3,4	84,9	3,0	10
62	pirazofos	106,3	7,6	100,6	3,9	86,8	2,2	10
63	piridaben	79,7	5,2	75,0	2,9	74,0	2,1	10
64	piridafetiona	106,8	6,9	102,9	2,5	92,8	3,7	10
65	piridato	67,1	5,1	48,1	4,2	45,9	4,7	n.q.
66	pirimetanil	94,9	8,1	83,1	2,2	78,0	6,0	10
67	pirimicarbe	106,5	7,7	95,2	4,8	83,5	3,7	10
68	pirimifos metilico	98,0	4,5	86,4	3,2	84,2	2,9	10
69	procloraz	107,8	6,3	91,4	2,8	80,1	0,7	10
70	profenofos	92,5	8,2	82,4	2,0	74,8	2,0	10
71	profoxidim	86,4	4,9	76,0	2,5	76,1	2,9	10
72	propargito	105,0	4,3	81,1	3,5	76,3	1,5	10
73	propiconazole	111,0	7,2	91,6	5,5	83,2	2,8	10
74	propizamida	110,4	6,4	95,4	5,7	89,3	5,9	10
75	propoxur	114,5	4,4	96,2	2,3	90,6	1,9	10
76	quinclorac	30,0	11,0	20,8	6,2	19,6	6,3	n.q.
77	quinoxifeno	64,0	5,0	60,6	3,9	58,2	3,1	n.q.
78	robenidina	88,8	13,6	79,2	4,9	80,6	4,8	10
79	salbutamol	76,0	10,0	78,0	9,0	74,0	9,0	10
80	salinomicina	69,0	9,1	54,6	6,8	46,7	5,9	n.q.
81	simazina	97,0	10,6	97,6	11,0	86,8	2,1	10
82	sulfadimetoxina	109,9	5,8	96,6	1,4	93,4	1,7	10
83	sulfametazina	112,9	4,0	99,5	5,3	92,2	2,8	10
84	sulfatiazol	105,3	3,4	94,5	4,1	93,5	6,4	10
85	tebuconazole	109,7	6,3	96,2	4,0	87,3	3,3	10
86	terbufos	107,2	12,5	84,4	6,0	77,6	3,6	10
87	terbutilazina	109,5	3,0	83,1	19,2	84,5	1,1	10
88	tetraconazole	110,4	3,7	111,5	5,3	105,1	3,5	10

89	tiacloprido	114,0	2,3	100,0	1,7	86,7	1,4	10
90	tiametoxam	112,5	2,9	103,6	4,1	89,6	3,7	10
91	tiodicarbe	46,0	17,0	42,0	2,0	47,0	18,5	n.q.
92	tolclofos	107,6	4,6	102,6	7,2	104,0	5,7	10
93	triadimefom	111,8	7,8	95,4	3,0	89,9	3,6	10
94	triadimenol	111,7	4,4	94,4	6,4	98,9	4,2	10
95	triazofos	117,4	0,9	100,8	3,6	97,5	2,6	10
96	triclorfom	109,5	5,0	99,1	4,5	92,1	5,1	10
97	trifloxistrobina	109,7	9,8	100,5	2,5	86,3	1,9	10
98	triflumizole	102,5	4,2	88,7	2,3	78,4	3,7	10
99	trimetroprima	93,7	10,1	90,2	2,7	84,4	3,8	10
100	vamidationa	111,5	3,1	98,9	2,3	86,8	1,6	10

n= 6 (6 extrações x 1 injeção de cada extrato)

A Tabela 12 apresenta os resultados dos percentuais de recuperação e RSD% obtidos após fortificação ($10, 25$ e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras “branco” de ovo. Resultados similares foram obtidos quando se comparam os dados obtidos na amostra ovo com as demais matrizes. Nos três níveis avaliados, 91% dos compostos apresentam percentuais de recuperação na faixa de 70-120% e $\text{RSD} \leq 20\%$ (Figura 13). Observa-se que os compostos diclofluanida, fluroxipir, tiodicarbe, quinclorac, salinomicina, quinoxifeno, 2,4,5 T e 2,4D, também apresentaram problemas de quantificação na amostra ovo, em função de seu baixo percentual de recuperação ($<70\%$).

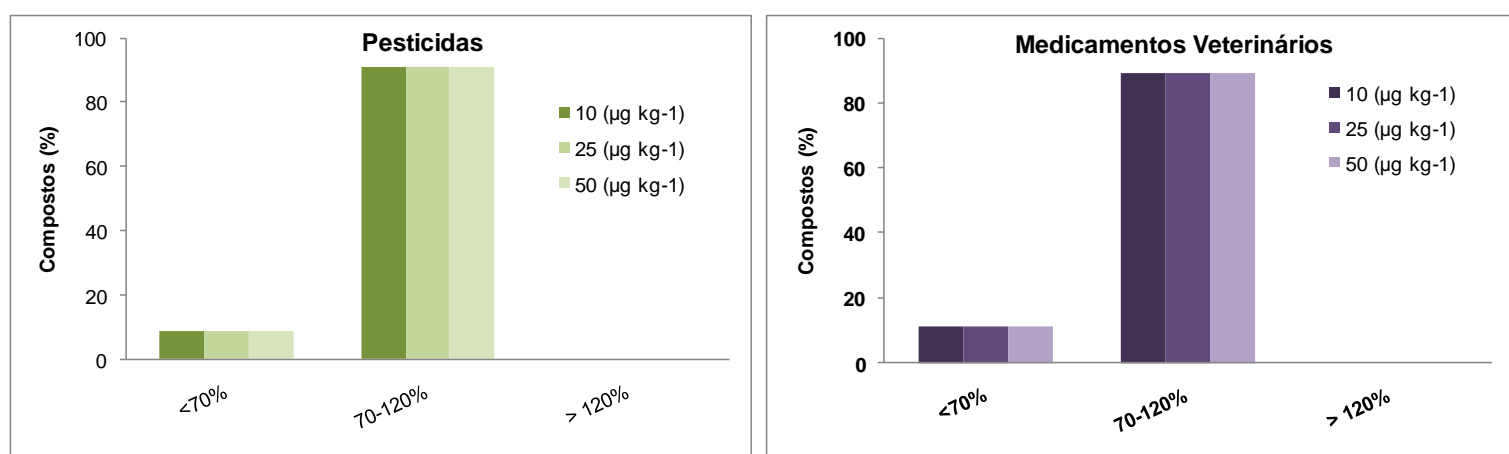


Figura 13. Percentual de agrotóxicos e medicamentos veterinários em ovo, que apresentaram faixas de recuperação de $<70\%$, 70-120% e $>120\%$, após ensaios de fortificação e recuperação, extraídos com método QuEChERS modificado.

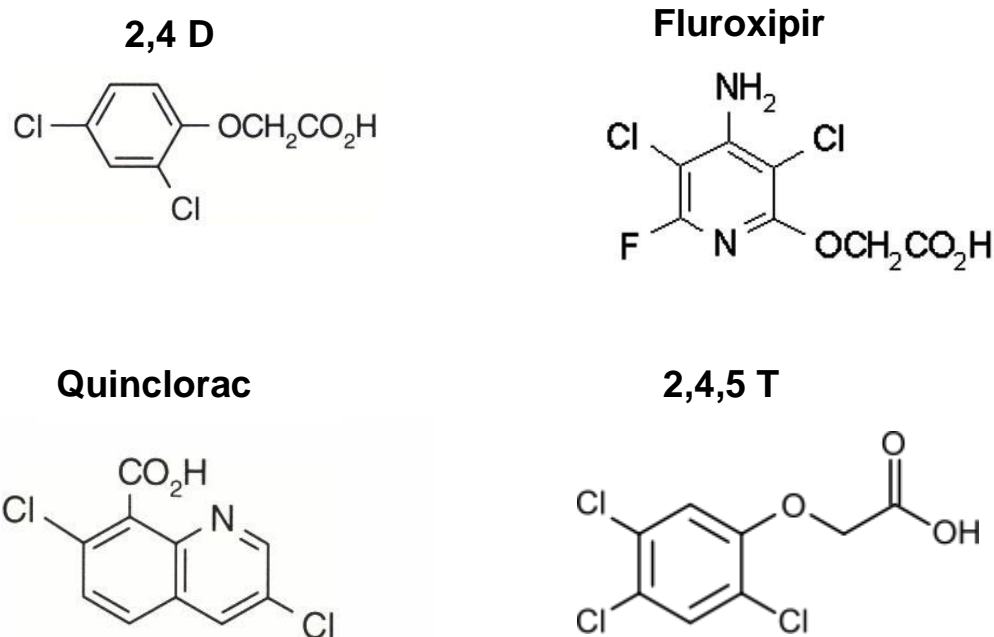


Figura 14. Estruturas químicas dos compostos 2,4D, fluroxipir, quinclorac e 2,4,5 T.

Na Figura 14 estão representadas as estruturas químicas dos compostos 2,4 D, fluroxipir, quinclorac e 2,4,5 T. Estes compostos são fenóxi-ácidos e apresentaram baixos percentuais de recuperação (<70%) nas matrizes avaliadas durante este estudo.

A natureza polar destes compostos e sua alta solubilidade em água fazem com que a extração específica destes compostos seja extremamente difícil. Eles são ácidos relativamente fortes ($pK_a < 4$) os quais, são mais estáveis em pH baixo. Portanto, o pH da extração é um importante fator o qual, deve ser adequadamente controlado. O monitoramento de fenóxi-ácidos ao nível de traços é um grande desafio, no caso de matrizes complexas devido à natureza química e física destes compostos, bem como, ao grande número de co-extrativos da matriz que podem afetar adversamente a eficiência de extração e o desempenho do instrumento utilizado para a detecção quantitativa.

4.5.5 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

A precisão do método QuEChERS modificado foi avaliada em função da repetitividade e da precisão intermediária, estimadas de acordo com as recomendações da ANVISA. Os valores mais detalhados de RSD_r e RSD_{pi} são apresentados juntamente aos resultados de recuperação, nas Tabelas 8, 9, 10, 11, 12 e 13.

Os valores para o estudo da repetitividade e precisão intermediária dos agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de carne, fígado, rim, leite e ovo ficaram abaixo de 20 % para a maioria dos compostos avaliados. Para matrizes ambientais e de alimentos, a precisão é dependente da matriz da amostra, da concentração do analito e da técnica de análise, podendo variar entre 2% e mais de 20% (SANCO, 2010).

Para validação de métodos cromatográficos, na faixa de concentração avaliada nesse trabalho, recomenda-se que a precisão deve apresentar $RSD \leq 20\%$ (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2010). Portanto, todos os resultados obtidos estão dentro dos limites sugeridos para a maioria dos compostos analisados.

Tabela 13. Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método QuEChERS modificado, no nível de fortificação de 25 µg kg⁻¹ (n=6)

nº	Compostos	Nível de Fortificação de 25 µg kg ⁻¹									
		Carne		Fígado		Rim		Leite*		Ovo	
		rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
1	2,4 D	15,4	35,4	19,5	14,4	27,9	10,0	92,1	35,8	15,8	44,9
2	2,4,5 T	65,3	1,1	87,0	11,4	22,3	6,4	89,7	13,2	19,5	3,3
3	3-OH Carbofuran	89,7	2,1	110,2	3,6	84,4	6,7	90,0	5,8	101,2	2,3
4	atrazina	87,4	0,6	107,5	8,8	83,0	6,3	86,3	3,1	94,5	3,8
5	azinfos etílico	104,4	1,5	85,2	0,6	104,3	8,6	102,9	14,6	93,8	2,2
6	azinfos metílico	105,5	1,6	92,4	10,5	98,4	9,0	84,9	5,6	102,9	1,1
7	azoxistrobina	98,7	0,1	108,7	10,5	91,3	3,2	77,7	3,3	103,8	7,6
8	bentazona	98,1	2,7	92,4	8,3	74,7	12,3	52,0	14,0	86,5	4,4
9	bispiribaque	77,3	1,8	105,9	11,0	70,9	1,4	86,2	1,2	63,3	4,4
10	bitertanol	92,6	3,8	98,4	0,1	96,4	14,6	87,4	7,7	94,0	6,9
11	boscalida	109,7	1,9	110,6	0,2	83,4	3,8	98,7	18,6	92,3	1,7
12	bromoconazole	82,3	1,0	96,5	11,2	81,9	10,0	78,6	0,1	87,8	2,4
13	buprofezina	82,3	1,2	92,8	12,4	79,5	8,3	67,8	3,8	70,6	2,0
14	carbaril	82,2	0,1	119,0	4,0	91,7	0,1	86,2	0,6	95,8	6,9
15	carbendazina	84,5	0,0	109,3	2,7	107,8	1,6	85,6	5,3	93,1	1,5
16	carbofurano	107,2	0,3	119,8	1,5	98,2	6,3	93,1	9,5	96,0	2,1
17	carboxim	99,5	0,1	114,9	6,0	84,7	0,6	81,5	1,4	92,6	0,1
18	cianizina	94,3	1,8	113,0	1,9	89,2	11,6	92,4	6,6	107,4	2,3
19	clomazone	99,5	1,2	114,7	3,0	81,1	3,7	87,9	7,2	93,5	2,2
20	cloranfenicol	103,2	0,6	109,2	1,0	95,6	0,8	84,4	3,5	91,3	2,3
21	clorimurom	56,0	0,3	111,5	2,9	82,3	11,1	55,9	14,1	85,3	0,0

22	clorpirifos etilico	109,9	1,8	98,7	1,9	107,7	9,8	100,6	3,7	96,7	3,5
23	clorpirifos metil	93,5	2,6	93,4	0,4	82,5	14,8	86,6	4,6	81,7	9,4
24	clorprofam	98,9	1,5	100,3	27,2	108,4	8,7	78,1	3,8	93,2	7,7
25	deltametrina	80,6	0,4	86,5	16,6	78,0	3,5	58,8	8,7	66,1	0,2
26	diazinona	84,4	0,9	95,2	11,2	81,3	10,6	78,0	0,7	88,8	1,5
27	diclofluanida	59,0	1,0	97,6	5,4	59,5	20,7	83,8	4,1	33,4	9,6
28	difenoconazole	86,4	0,8	102,7	4,2	86,2	4,7	75,0	2,3	96,1	0,3
29	dimetoato	101,4	0,9	109,0	4,3	92,7	1,3	93,2	7,9	94,4	3,1
30	epoxiconazole	95,5	1,1	116,3	4,1	105,7	2,3	95,1	14,0	99,2	5,2
31	etiona	92,1	0,4	102,5	10,3	60,7	13,4	71,5	0,4	85,7	1,9
32	fempropatrina	86,7	0,9	91,7	14,4	81,2	4,0	65,5	8,3	73,8	0,9
33	fempropimorfe	83,2	6,6	105,3	0,3	72,5	8,9	99,0	13,6	88,1	0,4
34	fenarimol	104,9	4,9	110,5	0,2	100,6	1,9	82,8	6,1	83,5	2,5
35	fentiona	88,1	1,0	98,4	18,0	62,0	0,8	83,4	7,2	89,3	3,3
36	fipronil	93,9	0,1	93,5	13,6	96,4	4,7	76,1	5,5	100,7	0,7
37	fluquiconazole	54,3	35,4	117,8	2,6	97,7	9,6	95,9	11,2	106,7	3,1
38	fluroxipir	33,5	35,4	52,9	141,4	5,3	108,9	113,7	91,8	19,1	49,0
39	flutalonil	109,2	1,0	98,0	2,5	90,7	5,6	100,7	23,3	106,6	0,0
40	imazalil	85,3	4,0	101,7	1,8	81,8	8,4	80,8	6,7	87,7	3,2
41	imidacloprido	85,0	0,4	101,5	1,3	84,3	16,9	91,6	5,0	101,6	1,1
42	iprovalicarbe	109,6	0,5	92,5	24,6	102,5	6,2	86,1	4,3	99,5	3,3
43	linurom	110,0	1,3	121,8	2,4	77,6	3,6	86,9	7,5	90,3	1,2
44	malationa	82,4	0,8	104,9	8,3	100,2	8,9	109,5	7,4	100,6	1,6
45	mecarbam	103,4	0,3	113,1	7,7	108,0	5,9	80,9	3,2	97,0	1,1
46	mepronil	92,6	0,1	76,0	12,5	113,0	2,5	89,9	9,0	102,0	1,0
47	metaconazole	87,7	0,4	106,5	4,2	86,5	1,5	76,2	3,8	91,9	1,5
48	metalaxil	91,3	3,7	104,2	3,2	93,2	1,2	87,2	5,8	101,6	0,5
49	metamidofos	70,7	1,2	113,3	2,6	79,8	2,9	89,1	1,5	85,2	0,8

50	metiocarbe sulfona	108,8	3,3	92,7	6,2	90,9	15,2	93,2	17,5	100,7	2,6
51	metiocarbe sulfoxido	114,6	0,4	106,5	1,0	93,0	2,0	97,2	7,1	97,1	8,9
52	metsulfurom metilico	77,6	0,6	110,0	8,0	77,3	6,8	82,8	1,6	89,4	3,5
53	mevinfos	86,9	0,2	103,0	1,8	86,0	4,8	92,0	1,3	91,1	2,4
54	miclobutanil	96,0	0,2	98,9	6,6	110,1	5,6	95,9	2,5	103,5	1,1
55	monesina	65,8	1,0	83,9	9,8	60,3	3,7	59,5	16,8	79,5	2,0
56	monocrotofos	86,2	0,1	102,1	3,1	67,5	5,7	95,4	5,5	93,8	1,1
57	monolinurom	102,8	3,4	117,3	1,0	86,1	8,5	83,5	4,6	89,9	2,1
58	oxamil	89,0	1,0	111,0	0,6	89,0	1,7	102,0	9,7	96,8	1,6
59	paraoxon	108,3	0,6	106,9	13,0	102,6	11,6	113,3	0,6	103,9	0,2
60	pendimetalina	102,7	0,2	97,5	19,1	88,9	0,1	84,8	9,0	93,8	1,0
61	piraclostrobina	90,5	4,6	114,5	2,1	88,6	1,8	88,5	1,1	99,5	5,5
62	pirazofos	91,8	0,9	92,8	15,2	94,8	0,3	77,2	0,3	100,5	3,3
63	piridaben	76,9	0,4	94,0	14,6	70,6	4,7	64,9	2,9	64,8	1,5
64	piridafetiona	105,6	0,5	105,6	13,8	116,1	1,8	88,3	1,3	102,2	4,5
65	piridato	69,6	1,2	81,8	12,0	59,1	3,4	57,9	4,3	49,7	5,7
66	pirimetanil	74,5	0,3	114,3	4,3	83,5	9,3	85,2	0,6	82,7	3,6
67	pirimicarbe	98,4	0,6	116,7	2,9	83,5	5,7	81,7	4,2	93,3	2,3
68	pirimifos metilico	88,9	2,8	108,2	11,8	81,2	2,6	76,7	0,2	84,8	1,3
69	procloraz	84,1	0,9	107,3	6,7	83,8	0,1	76,9	1,5	90,1	0,9
70	profenofos	81,1	0,4	103,9	9,5	75,1	8,7	75,0	5,5	82,4	2,1
71	profoxidim	87,0	1,5	102,4	7,4	77,9	1,3	76,6	7,4	76,7	2,4
72	propargito	82,7	0,2	99,3	11,0	83,4	3,5	71,6	1,4	79,5	2,3
73	propiconazole	87,8	0,7	99,5	16,0	89,8	0,9	75,8	2,8	87,8	5,3
74	propizamida	101,9	0,6	101,9	22,3	110,0	2,6	87,9	13,4	93,3	0,5
75	propoxur	107,4	0,4	115,9	1,8	88,6	2,2	92,9	2,6	94,4	1,6
76	quinclorac	33,6	7,6	86,4	7,3	79	20,0	66,8	11,2	20,2	1,4
77	quinoxifeno	103,6	0,1	88,7	4,3	67,3	0,7	72,8	1,9	61,0	3,1

78	robenidina	78,3	0,7	89,8	14,8	74,3	4,2	71,4	6,7	76,0	5,0
79	salbutamol	70,0	12,0	56,00	17,0	56,3	7,5	45,0	17,0	58,0	10,0
80	salinomicina	54,9	0,6	63,2	13,8	56,6	0,4	49,1	11,4	56,7	5,0
81	simazina	88,6	1,1	112,0	5,2	60,5	6,6	89,2	3,3	95,8	15,4
82	sulfadimetoxina	75,0	0,4	112,2	2,9	89,7	1,8	104,2	1,6	95,6	1,2
83	sulfametazina	88,1	1,0	108,2	2,7	83,7	1,8	91,7	1,0	99,4	5,0
84	sulfatiazol	91,0	4,2	111,2	2,1	77,4	6,2	88,3	8,7	93,2	2,8
85	tebuconazole	88,8	2,0	98,7	11,5	90,1	2,2	79,1	3,1	100,1	3,5
86	terbufos	80,2	1,9	94,5	7,8	78,7	8,0	72,2	0,6	86,2	7,3
87	terbutilazina	101,3	0,2	117,9	0,1	86,8	10,9	92,1	4,4	90,8	1,7
88	tetraconazole	112,8	0,4	90,8	26,3	102,8	12,0	84,3	4,6	107,9	4,0
89	tiacloprido	94,5	1,1	108,7	4,5	85,3	1,6	93,7	8,9	98,6	0,3
90	tiametoxam	94,0	0,4	110,2	5,5	89,6	6,3	95,2	1,1	102,5	2,6
91	tidicarbe	61,3	1,8	117,2	6,4	54,7	11,0	87,3	2,2	3,7	13,5
92	tolclofos	85,5	3,3	111,9	13,6	91,0	4,4	60,8	28,5	105,5	4,8
93	triadimefom	94,9	4,1	110,1	7,1	117,3	1,5	102,4	1,0	94,1	0,1
94	triadimenol	98,6	2,1	94,3	18,8	113,8	0,1	91,2	3,1	92,7	8,7
95	triazofos	104,7	0,6	113,7	0,8	118,0	6,7	88,7	5,7	100,1	3,7
96	triclorfom	99,0	0,5	118,3	0,3	88,3	5,7	99,7	9,4	103,0	3,6
97	trifloxistrobina	94,5	0,1	104,4	13,5	89,3	8,3	73,2	4,4	100,2	2,2
98	triflumizole	82,4	0,5	105,7	12,8	79,5	1,9	71,1	3,0	87,6	0,9
99	trimetroprima	76,7	0,1	101,2	13,8	73,7	11,8	86,7	3,8	87,4	0,5
100	vamidationa	91,4	1,3	101,8	9,4	89,6	1,4	92,3	10,5	101,7	0,6

* ($\mu\text{g L}^{-1}$)

4.5.6 Efeito Matriz em LC-MS/MS

A taxa de recuperação em alimentos, nem sempre é satisfatória devido aos efeitos de matriz da análise cromatográfica (Tabela 14). A quantificação dos compostos pode ser afetada pela presença de compostos co-extraídos da matriz.

O efeito matriz nos resultados pode ser significativo (>10%) e deve ser determinado cuidadosamente. A avaliação exata do efeito matriz pode evitar estimativas errôneas dos teores dos analitos, além de ser mais confiável. Para redução do efeito matriz é recomendável o uso de curva analítica preparada em extratos da matriz isenta de agrotóxicos (RIBANI *et al.*, 2004), ou ainda submeter os extratos a novos processos de limpeza. O efeito matriz sempre sofre variações ao longo do tempo e também varia dependendo da condição do instrumento utilizado, devendo, por isso, ser constantemente avaliado, tanto na etapa de desenvolvimento do método quanto na aplicação deste método nas análises de rotina (PRESTES, 2007).

Tabela 14. Avaliação do efeito matriz percentual dos agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados por LC-MS/MS modo EI (+/-), a partir de soluções preparadas em acetonitrila e nos extratos das matrizes avaliadas.

nº	Compostos	Efeito Matriz (%)														
		Carne			Fígado			Rim			Leite			Ovo		
		25,0	10,0	5,0	25,0	10,0	5,0	25,0	10,0	5,0	25,0	10,0	5,0	25,0	10,0	5,0
1	2,4 D	0	5	18	-74	-70	-62	1	-1	62	1	-1	62	-1	-3	0
2	2,4,5 T	1	-5	25	-77	-75	-69	10	16	60	10	16	60	23	1	-6
3	3-OH Carbofuran	14	22	13	5	9	36	17	-2	103	17	-2	103	4	-1	-18
4	atrazina	-14	-4	3	-70	-76	-60	-1	-1	29	-1	-1	29	12	-15	-18
5	azinfos etílico	-3	-4	21	10	3	26	0	6	33	0	6	33	39	-4	3
6	azinfos metílico	7	12	47	-6	0	18	-1	11	-11	-1	10	-11	-1	-6	15
7	azoxistrobina	-2	15	33	0	13	43	-3	-2	13	-3	-2	13	10	-52	-52
8	bentazona	5	4	23	-3	24	21	15	-13	105	15	-13	105	16	2	6
9	bispiribaque	4	12	39	0	20	37	-9	1	38	-9	1	38	-1	8	24
10	bitertanol	0	-6	16	-3	0	-41	3	-5	37	3	-5	37	10	11	24
11	boscalida	30	37	65	1	-6	1	2	8	28	2	8	28	16	0	12
12	bromoconazole	5	6	26	-1	-18	29	-17	-24	15	-17	-24	15	0	-1	9
13	buprofezina	9	6	25	-15	-18	21	9	9	41	9	9	41	13	6	2
14	carbaril	8	2	22	-4	3	-4	-2	6	42	-2	6	42	24	12	-5
15	carbendazina	-14	11	-35	-6	15	34	5	14	26	5	14	26	20	-2	13
16	carbofurano	17	20	80	-52	-52	-60	-11	-7	-8	-11	-7	-8	0	0	5
17	carboxim	-75	-75	-74	2	6	14	14	-7	34	14	-7	34	-6	1	-5
18	cianizina	0	-15	18	8	24	41	4	12	31	4	12	31	-18	14	22
19	clomazone	-13	-4	29	11	24	30	8	15	55	8	15	55	-18	-14	-4
20	cloranfenicol	-13	-4	-20	0	12	32	8	20	52	8	20	52	3	-3	-4
21	clorimurom	5	12	37	-1	9	16	-5	8	18	-5	8	18	16	7	12

22	clorpirifos etilico	-14	9	12	6	2	28	10	17	43	10	17	43	-3	-11	-15
23	clorpirifos metil	-10	5	24	12	-5	71	8	15	25	8	15	25	-12	-6	0
24	clorprofam	8	13	33	-2	13	16	8	12	30	8	12	30	27	24	14
25	deltametrina	3	-2	24	0	5	18	-3	13	20	-3	13	20	7	-2	5
26	diazinona	-11	0	12	1	-5	25	-5	18	11	-5	18	11	12	15	4
27	diclofluanida	-18	-1	29	14	22	13	12	32	31	12	32	31	47	33	23
28	difenoconazole	-3	14	-27	-14	-4	3	-1	9	19	-1	9	19	-4	-3	9
29	dimetoato	-7	2	30	-3	-4	21	29	3	17	29	3	17	-10	0	2
30	epoxiconazole	-3	-12	27	7	12	47	-4	-10	4	-4	-10	4	4	31	17
31	etiona	-11	-6	24	-2	15	33	-3	0	31	-3	0	31	-4	-3	9
32	fempropatrina	-15	0	14	5	4	23	9	2	17	9	2	17	-10	0	2
33	fempropimorfe	-7	-1	23	4	12	39	-1	10	16	-1	10	16	4	31	17
34	fenarimol	-1	-9	25	0	-6	16	1	1	17	1	1	17	-7	15	23
35	fentiona	-36	-41	-20	30	37	65	-16	-14	29	-16	-14	29	-1	49	-15
36	fipronil	-10	-6	23	5	6	26	2	14	44	2	14	44	23	17	-75
37	fluquiconazole	-20	-11	17	9	6	25	-2	1	15	-2	1	15	4	20	-75
38	fluroxipir	-21	-10	11	8	2	22	4	16	28	4	16	28	12	80	-74
39	flutalonil	6	6	-38	-14	11	-35	6	0	40	6	0	40	39	-2	-17
40	imazalil	10	15	49	17	20	80	-2	2	19	-2	2	19	-1	2	-8
41	imidacloprido	-12	23	-15	-75	-75	-74	-17	-8	21	-17	-8	21	10	19	21
42	iprovalicarbe	-10	-5	-17	0	-15	18	2	8	36	2	8	36	16	-8	9
43	linurom	-12	-8	25	-13	-4	29	0	13	31	0	13	31	-1	25	33
44	malationa	-7	9	33	-13	-4	-20	-4	5	-19	-4	5	-19	10	-13	-13
45	mecarbam	-11	-6	9	5	12	37	-9	-9	36	-9	-9	36	16	-4	-4
46	mepronil	13	6	45	-14	9	12	-9	7	20	-9	7	20	-3	-5	12
47	metaconazole	-15	-2	8	-10	5	24	4	16	48	4	16	48	13	18	32
48	metalaxil	-8	23	28	8	13	33	-3	22	46	-3	22	46	20	11	31
49	metamidofos	-15	-2	140	3	-2	24	-3	-1	38	-3	-1	38	-18	-3	-7

50	metiocarbe sulfona	-19	1	3	-11	0	12	-6	6	10	-6	6	10	-1	14	2
51	metiocarbe sulfoxido	-3	13	20	-18	-1	29	-19	-9	1	-19	-9	1	29	-27	30
52	metsulfurom metilico	-5	18	11	-3	14	-27	6	-1	27	6	-1	27	-19	6	-15
53	mevinfos	12	32	31	-7	2	30	-15	-6	26	-15	-6	26	-9	-1	-6
54	miclobutanil	-1	9	19	-3	-12	27	5	11	33	5	11	33	1	27	26
55	monesina	29	3	17	-11	-6	24	-10	-2	25	-10	-2	25	-19	6	-15
56	monocrotofos	-4	-10	4	-15	0	14	-25	-5	5	-25	-5	5	-9	-1	-6
57	monolinurom	-3	0	31	-7	-1	23	-11	-6	23	-11	-6	23	1	27	26
58	oxamil	9	2	17	-1	-9	25	-17	8	19	-17	8	19	-9	4	-3
59	paraoxon	-1	10	16	-36	-41	-20	-8	-2	26	-8	-2	26	7	16	22
60	pendimetalina	1	1	17	-10	-6	23	-22	-23	8	-22	-23	8	20	48	46
61	piraclostrobina	-16	-14	29	-20	-11	17	-17	-8	-4	-17	-8	-4	-8	-15	-19
62	pirazofos	2	14	44	-21	-10	11	-12	7	49	-12	7	49	23	-2	1
63	piridaben	-2	1	15	6	6	-38	3	20	56	3	20	56	28	140	3
64	piridafetiona	4	16	28	10	15	49	2	14	18	2	14	18	-5	-9	6
65	piridato	6	0	40	-12	23	-15	9	4	1	9	4	1	10	13	10
66	pirimetanil	-2	2	19	-10	-5	-17	3	17	8	3	17	8	-4	50	31
67	pirimicarbe	-17	-8	21	-12	-8	25	6	8	5	6	8	5	-5	-9	6
68	pirimifos metilico	2	8	36	-7	9	33	14	10	20	14	10	20	10	13	10
69	procloraz	0	13	31	-11	-6	9	13	10	15	13	10	15	-4	50	31
70	profenofos	-4	5	-19	13	6	45	-6	3	14	-6	3	14	-15	5	-10
71	profoxidim	-9	-9	36	-15	-2	8	-7	-17	18	-7	-17	18	-6	11	-2
72	propargito	-9	7	20	-8	23	28	-5	10	-4	-5	10	-4	26	33	25
73	propiconazole	4	16	48	-15	-2	140	-9	13	50	-9	13	50	31	-19	36
74	propizamida	-3	22	46	-19	1	3	6	10	31	6	10	31	0	-4	-9
75	propoxur	-3	-1	38	40	6	0	40	-8	14	-5	-8	14	13	5	-9
76	quinclorac	-6	6	10	19	-2	2	19	-7	27	0	-7	27	31	-19	36
77	quinoxifeno	-19	-9	1	21	-17	-8	21	17	68	5	17	68	-66	5	8

78	robenidina	6	-1	27	36	2	8	36	5	18	-6	5	18	-53	16	-2
79	salbutamol	-15	-6	26	31	0	13	31	-66	-53	-76	-66	-53	-76	-1	-11
80	salinomicina	5	11	33	-19	-4	5	-19	5	16	-1	5	16	-66	5	8
81	simazina	-10	-2	25	36	-9	-9	36	8	-2	-11	8	-2	-53	16	-2
82	sulfadimetoxina	-25	-5	5	20	-9	7	20	-11	0	12	-6	38	2	9	3
83	sulfametazina	-11	-6	23	48	4	16	48	-18	-1	29	-19	10	14	4	17
84	sulfatiazol	-17	8	19	46	-3	22	46	-3	14	-27	6	1	18	1	8
85	tebuconazole	-8	-2	26	38	-3	-1	38	-7	2	30	-15	27	0	5	-6
86	terbufos	-22	-23	8	10	-6	6	10	-3	-12	27	5	26	-7	17	5
87	terbutilazina	-17	-8	-4	1	-19	-9	1	-11	-6	24	-10	33	27	68	18
88	tetraconazole	-12	7	49	27	6	-1	27	-15	0	14	-25	25	23	-5	-8
89	tiacloprido	3	20	56	-5	-8	14	15	-7	-1	23	-11	5	-1	-36	-10
90	tiametoxam	2	14	18	0	-7	27	23	-1	-9	25	-17	23	-9	-41	-6
91	tidicarbe	9	4	1	5	17	68	-5	-36	-41	-20	-8	19	25	-20	23
92	tolclofos	3	17	8	-6	5	18	-8	-10	-6	23	-22	-12	-17	-8	-22
93	triadimefom	6	8	5	-76	-66	-53	9	-20	-11	17	-17	3	23	19	-12
94	triadimenol	14	10	20	-1	5	16	-76	-21	-10	11	-12	2	6	14	13
95	triazofos	13	10	15	40	-12	23	-15	9	4	1	9	9	8	10	10
96	triclorfom	-6	3	14	19	-10	-5	-17	3	17	8	3	3	5	20	15
97	trifloxistrobina	-7	-17	18	21	-12	-8	25	6	8	5	6	6	-76	-1	40
98	triflumizole	-5	10	-4	36	-7	9	33	14	10	20	14	14	-66	5	-12
99	trimetroprima	-9	13	50	31	-11	-6	9	13	10	15	13	13	-53	5	16
100	vamidationa	6	10	31	-19	13	6	45	-6	3	14	-6	8	9	-12	23

4.6 Aplicação do método

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em 7 amostras de carne, 5 de fígado, 5 de rim, 16 amostras de leite e 8 de ovo obtidas em supermercados da cidade de Santa Maria-RS. Em nenhuma das amostras analisadas, foram quantificados resíduos acima de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ (carne, fígado, rim e ovo) ou $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (leite). Porém, em 3 amostras de carne, 2 de fígado e 1 de rim, foram detectados (>LOQ) os medicamentos veterinários sulfatiazol e sulfametazina.

5 CONCLUSÕES

O método de extração QuEChERS modificado, otimizado neste trabalho, tem como vantagem ser um procedimento moderno e dinâmico, que pode ser aplicado em qualquer laboratório, devido a simplificação de etapas lentas e trabalhosas, geralmente empregadas em outros métodos de extração. Dessa forma, o método de extração proposto apresenta como vantagens ser um procedimento simples e rápido, com um menor número de etapas analíticas, o que diminui a probabilidade de erros, além de ser barato e ambientalmente correto, devido ao baixo consumo de solventes orgânicos (somente 10 mL de acetonitrila).

Além disso, contribui no sentido do desenvolvimento de metodologias analíticas validadas empregando técnicas modernas de extração, e também devido a existência de poucos trabalhos científicos publicados até o momento sobre a extração conjunta de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras utilizando o método QuEChERS.

O pequeno consumo de reagentes e menor geração de resíduos tornam o método QuEChERS modificado vantajoso em comparação com os métodos de extração convencionais, atendendo portanto aos princípios da química verde, podendo o mesmo ser utilizado como um protocolo para investigar a presença multirresíduo de agrotóxicos e medicamentos veterinários simultaneamente em amostras de origem animal (carne, fígado, rim, leite e ovo).

Destaca-se, também a vantagem do método de extração ser unificado para as diferentes matrizes avaliadas, simplificando a aplicação em rotina.

O método proposto demonstrou ser eficiente, apresentando bons resultados de recuperação (70-120%) e de precisão (< 20%) para a maioria dos compostos avaliados, comprovando a confiabilidade do método.

Os valores de limite de quantificação do método variaram entre $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, permitem que sejam determinados resíduos destes compostos em amostras de alimentos de origem animal, visando averiguar a observância dos limites legais de resíduos permitidos.

A determinação dos agrotóxicos em estudo por LC-MS/MS foi adequada, permitindo a realização de uma análise qualitativa, obtida a partir de fragmentos de massa característicos de cada analito, e quantitativa, através do modo de aquisição

MRM. As condições cromatográficas otimizadas para determinação por LC-MS/MS permitiram a identificação e quantificação dos 100 compostos estudados, em um tempo total de análise de 30 min.

As curvas analíticas apresentaram linearidade entre 1,0 e 250,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, com valores de coeficiente de determinação maiores que 0,995 para a grande maioria dos compostos avaliados.

Portanto, conclui-se que o método mostrou-se adequado à análise simultânea dos agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (carne, fígado, rim, leite e ovo) podendo ser usado na rotina de laboratórios de análises de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários, visto que todos os parâmetros de validação encontraram-se dentro dos limites exigidos para validação de métodos cromatográficos, atendendo satisfatoriamente os objetivos traçados para este trabalho.

TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

As atividades laboratoriais normalmente geram consideráveis quantidades de resíduos líquidos e sólidos proveniente dos ensaios analíticos, que devem ser tratados e descartados de forma adequada.

Neste trabalho, os resíduos líquidos foram recolhidos, colocados em recipientes separados e rotulados como halogenados e não-halogenados e logo após, encaminhados para o Almoxarifado, responsável pelo tratamento final dos resíduos gerados, no Departamento de Química da UFSM.

Já os resíduos sólidos, foram colocados em sacos plásticos de cor preta, devidamente rotulados e logo em seguida, encaminhados ao Almoxarifado do Departamento de Química da UFSM.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Ampliação do escopo de agrotóxicos e medicamentos veterinários a serem analisados;
- Avaliar a possibilidade de aplicação deste método em outras matrizes de origem animal, por exemplo, mel, derivados do leite e produtos cárneos processados;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDUSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE). Disponível em <<http://www.abiec.com.br>>. Acesso em janeiro de 2011.

ALDER, L.; GREULICH, K.; KEMPE, G.; VIETH, B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS? **Mass Spectrometry Reviews**, 25 (2006) 838.

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**, 86 (2003) 412.

ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM E.; TASDELEN, B.; STAJNBAHER, D., *Crop Protection, Public Health, Environmental Safety*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2007) 439.

ANDERSSON, A.; PALSHEDEN, H. Comparison of the efficiency of different GLC multi-residue methods on crops containing pesticide residues. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, 339 (1991) 365.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em janeiro de 2011.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA); *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, RE nº 899, de 29/05/2003a.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA), Resolução RE nº 899 de 29 de Maio, 2003b.

AOAC (Official Method 2007.01: *Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulphate*, AOAC International (2007).

ARCURI, P.B.; & MANTOVANI, H.C. Por que utilizar antibióticos em animais produtores de alimentos. Disponível em <<https://www.cptcursospresenciais.com.br/bovinos/?pagina=artigos&>>. Acesso em janeiro de 2011.

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

BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; JANSSEN, H.G.; CRAMERS, C. Study into the Equilibrium Mechanism between Water and Poly(dimethylsiloxane) for Very Apolar Solutes: Adsorption or Sorption? **Analytical Chemistry**, 71 (1999) 5213.

BANCO DO BRASIL. Diretoria do Agronegócio. **Política Agrícola**, 4 (2004) 4.

BARAKAT, A.A., BADAWEY, H.M.A.; SALAMA, E.; ATTALLAH, E.; MAATOOK G. Simple and rapid method of analysis for determination of pesticide residues in honey using dispersive solid phase extraction and GC determination. **International Journal of Food, Agriculture & Environmental**, 5 (2007) 97.

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

BCPC (BRITISH CROP PRODUCTION COUNCIL). Disponível em <<http://www.bcpc.org/>>. Acesso em janeiro de 2011.

BEGUIN, S.; JADAS-HÉCART, A.; TABET, J.C. Protocols for optimizing MS/MS parameters with an ion-trap GC-MS instrument. **Journal of Mass Spectrometry**, 41 (2006) 1304.

BRAZILIAN CHIKEN (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBA) E ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGOS). Disponível em <<http://www.brazilianchicken.com.br/>>. Acesso em janeiro de 2011.

CAMEL, V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, 19 (2000) 229.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R.; RODRÍGUEZ-GONZALO, E.; REVILLA-RUIZ, P.; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ; J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. **Journal of Chromatography A**, 1089 (2005) 1.

CEN (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION), CEN/TC 275 15662:2008: *Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method*, European Union, 2008.

CHASIN, A.M.; NASCIMENTO, E.S.; NETO, L.M.R.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ANDRAUS, M.H.; SALVADOR, M.C.; FERNÍCOLA, N.A.G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, 11 (1998) 1.

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

CNA (CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL). Disponível em <<http://www.cna.org.br>>. Acesso em janeiro de 2011.

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

CUNHA, S.C.; LEHOTAY, S.J., MASTOVSKA; K.; FERNANDES J.O.; Beatriz M.; OLIVEIRA, P.P. Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. **Journal of Separation Science**, 30 (2007) 620.

CVUA (CHEMISCHEN UND VETERINÄRUNTERSUCHUNGSÄMTER). Disponível em <<http://www.quechers.com>>. Acesso em fevereiro de 2011.

DENOBILO, M., NASCIMENTO, E. S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina e doxitetraciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 40 (2004) 209.

DIEZ, C.; TRAAG, W.A.; ZOMMER, P.; MARINERO, P.; ATIENZA, J. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. **Journal of Chromatography A**, 1131 (2006) 11.

DOLE, M.; MACK, L.L.; HINES, R. L.; MOBLEY, R.C.; FERGUNSON, L.D.; ALICE, M.B. "Molecular beams of macroions". **Journal of Chemical Physics**, 49 (1968) 2240.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA PESQUISA AGROPECUÁRIA). Disponível em <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/panorama/conjuntura19.html>>. Acesso em janeiro de 2011.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). Disponível em <<http://www.fao.org>>. Acesso em janeiro de 2011.

FDA (UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). Disponível em <<http://www.fda.gov>>. Acesso em janeiro de 2011.

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

FVO (FOOD AND VETERINARY OFFICE). Disponível em <<http://www.who.int/foodsafety/chem/en/>>. Acesso em janeiro de 2011.

GARRIDO-FRENICH, A.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, I.; ARREBOLA, F.J.; MARINEZ-VIDAL, J.L. Potentiality of Gas Chromatography–Triple Quadrupole Mass Spectrometry in Vanguard and Rearguard Methods of Pesticide Residues in Vegetables. **Analytical Chemistry**, 77 (2005) 4640.

GARRIDO-FRENICH, A.; MARTÍNEZ-VIDAL, J.L.; LÓPEZ-LÓPEZ, T.; CÓRTEZ-AGUADO, S.; MARTÍNEZ-SALVADOR, I. Monitoring multi-class pesticide residues in fresh fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1048 (2004) 199.

GIHP (General Inspectorate for Health Protection). *Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs, General Inspectorate for Health Protection*, 6th ed., The Hage, 1996.

GUANZIROLI, C.E. Agronegócio no Brasil: perspectivas e limitações. Disponível em <http://www.uff.br/econ/download/tds/UFF_TD186.pdf>. Acesso em setembro de 2008.

HERNÁNDEZ-BORGES, J.; BORGES-MIQUEL, T. M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A.; CIFUENTES, A. Sample treatments prior to capillary electrophoresis–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1153 (2007) 214.

HERNÁNDEZ-BORGES, J.; CABRERA, J.C.; RODRÍGUEZ-DELGADO; M.A, HERNÁNDEZ-SUAREZ, E.M.; SAÚCO, V.G. Analysis of pesticide residues in bananas harvested in the Canary Islands (Spain). **Food Chemistry**, 113 (2009) 313.

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

HILL, A. R. C., REYNOLDS, S. L. Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds. **The Analyst**, 124 (1999) 953.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC-GC International**, 2 (1998) 96.

HYÖTYLÄINEN, T. On-line coupling of extraction with gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1186 (2008) 39.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em janeiro de 2011.

ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE). Disponível em <<http://www.ich.org/>>. Acesso em janeiro de 2011.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL). Disponível em <<http://www.inmetro.gov.br>>. Acesso em janeiro de 2011.

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

IRIBARNE, J.V.; THOMSON, B.A. On the evaporation of small ions from charged droplets. **Journal of Chemical Physics**, 64 (1976) 2287.

ISI OF KNOWLEDGE. Disponível em <<http://www.isiknowledge.com>>. Acesso em fevereiro de 2011.

ISO (INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION). *General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories*, ISO/EC 17025, 2005.

IUPAC (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY). Disponível em <<http://goldbook.iupac.org/R05305.html>>. Acesso em janeiro de 2011.

KOESUKWIWAT, U.; LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKA, K.; DORWEILER, K.J.; LEEPIPATPIBOON, N. Extension of the QuEChERS Method for Pesticide Residues

in Cereals to Flaxseeds, Peanuts, and Doughs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58 (2010) 5950.

KOESUKWIWAT, U.; SANGUANKAEW, K.; LEEPIPATPIBOON, N. Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta** 626 (2008) 10.

KRIJGSMAN, W.; VAN DE KAMP, C. G.; *Journal of Chromatography* 171 (1976) 201.

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

LANÇAS, F.M.; *Extração em Fase Sólida (SPE)*, 4ª ed., São Carlos, Editora RiMa, 2004.

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

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

LEHOTAY, S., Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, 90 (2007) 485.

LEHOTAY, S.J., HIEMSTRA, M., BODEGRAVEN, P., KOK, A. Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. **Journal of AOAC International**, 88 (2005a) 595.

LEHOTAY, S.J., in MARTINEZ VIDAL, J.L.; GARRIDO FRENICH, A. (Eds.), Pesticide Protocols, Methods in Biotechnology Series 19, Humana Press, Totowa, NJ, USA, 2006, p. 239.

LEHOTAY, S.J., IN: ZWEIGENBAUM, J. (Ed.), Pesticide Protocols, Methods in Biotechnology Series, Humana Press, Totowa, NJ, USA, 2010b.

LEHOTAY, S.J., LIGHTFIELD, A.R., HARMAN-FETCHO, J.A., DONOGHUE, D.J., Analysis of Pesticide Residues in Eggs by Direct Sample Introduction/Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49 (2001) 4589.

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

LEHOTAY, S.J., MASTOVSKA, K., YUN, S.J. Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue Analysis in Fatty Food Matrixes. *Journal of AOAC International* 88 (2005) 630.

LEHOTAY, S.J.; SON, K. A.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U.; FU, W.; MASTOVSKA, K.; HOH, E.; LEEPIPATPIBOON, N.; Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal Chromatography A**, 1217 (2010a) 2548.

LOURENÇO, J. C.: "Agronegócio brasileiro: projeções de crescimento e entraves de infra-estrutura logística" (2009). Disponível em <<http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/br/09/jcl.htm>>. Acesso em janeiro de 2011.

LUKE, M.; FROBERG, J. E.; MASUMOTO, H.T. Extraction and clean up of organochlorine, organophosphate, organonitrogen and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. **Journal of AOAC**, 58 (1975) 1020.

LUKE, M.A.; DOOSE, G.M. A modification of the Luke multiresidue procedure for low moisture, non fatty products. **Bulletin of Environmental and Contamination Toxicology**, 30 (1983) 110.

MAJORS, R.E. QuEChERS - A New Sample Preparation Technique for Multiresidue Analysis of Pesticides in Foods and Agricultural Samples (2007). Disponível em <<http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/article/articleDetail.jsp?id=429505>>. Acesso em janeiro de 2011.

MAJORS, R.E. The QuEChERS Revolution (2010). Disponível em <<http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/GC/The-QuEChERS-Revolution/ArticleStandard/Article/detail/704028>>. Acesso em janeiro de 2011.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em janeiro de 2011.

MARTÍNEZ-GALERA, M.; GIL-GARCIA, M.D.; SANTIAGO-VALVERDE, R. Determination of photoirradiated high polar benzoylureas in tomato by HPLC with luminol chemiluminescence detection. **Talanta**, 76 (2008) 815.

MARTINEZ-VIDAL, J. L.; ARREBOLA, F. J.; MATEU-SANCHEZ, M. Application to routine analysis of a method to determine multiclass pesticide residues in fresh vegetables by gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 16 (2002) 1106.

MARTINEZ-VIDAL, J.L.; ARREBOLA-LIËBANAS, F.J., GONZALEZ-RODRIGUEZ, M.J.; GARRIDO-FRENICH, A.; FERNÁNDEZ-MORENO, J.L. Validation of a gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry based method for the quantification of pesticides in food commodities. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 20 (2006) 365.

MASTOVSKA, K.; DORWEILER, K.J.; LEHOTAY, S.J.; WEGSCHEID, J.S., SZPYLKA, K.A. Pesticide Multiresidue Analysis in Cereal Grains Using Modified

QuEChERS Method Combined with Automated Direct Sample Introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58 (2010) 5959.

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S.J. Determination of photoirradiated high polar benzoylureas in tomato by HPLC with luminol chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, 1040 (2004) 259.

MENDIOLA, J. A.; HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. **Journal of Chromatography A**, 1152 (2007) 234.

MERCER, G. E. Determination of 112 Halogenated Pesticides Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Selected Ion Monitoring. **Journal of AOAC International**, 88 (2005) 1452.

MILLS, P.A; ONLEY, J.H.; GUITHER, R.A. Rapid method for chlorinated pesticide residues in non fatty foods. **Journal of AOAC**, 50 (1963) 430.

NÚÑEZ, O., MOYANO, E., GALCERAN, M. T., LC-MS/MS analysis of organic toxics in food. **Trends in Analytical Chemistry**, 24 (2005) 683.

OLIVEIRA, L.M.; SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; CUNHA, D.G.; MOREIRA, C.Q.; LEMOS, A.B. Diagnóstico da qualidade tecnológica de embalagens plásticas barreira a gases utilizadas para preservação de produtos cárneos. Relatório final FAPESP, processo 2000/09565-0. Campinas, CETEA – ITAL, p. 61, 2003.

PAYÁ P., ANASTASSIADES, M.; MACK D., SIGALOVA I.; TASDELEN, B., OLIVA, J.; BARBA, A.; Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 389 (2007) 1697.

PIZZUTTI, I.R.; KOK, A.; ZANELLA, R.; ADAIME, M.B.; HIEMSTRA, M.; WICKERT, C.; PRESTES, O.D. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya

grain, without clean up, by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. **Journal of Chromatography A**, 1142 (2007) 123.

PASCHOAL J.A.R.; RATH, S.; AIROLDI, F.P.S.; REYES, F.G.R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, 31 (2008) 1190.

PONCHIO, L. A.; GOMES, A. L.; PAZ, E. Perspectivas de consumo de leite no Brasil. Disponível em <http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/artigo_leite_04.pdf>. Acesso em janeiro de 2011.

PRESTES, O.D.; Friggi, C.A.; Adaime, M,B.; Zanella, R. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, 32 (2009) 1620.

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

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

ROMERO-GONZALEZ, R.; PASTOR-MONTORO, E.; MARTÍNEZ-VIDAL, J.L.; GARRIDO-FRENICH, A. Application of hollow fiber supported liquid membrane extraction to the simultaneous determination of pesticide residues in vegetables by liquid chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** 20 (2006) 2701.

SAITO, Y; KODAMA S.; MATSUNAGA, A.; YAMAMOTO, A. Multiresidue Determination of Pesticides in Agricultural Products by Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Large Volume Injection. **Journal of AOAC International**, 87 (2004) 1356.

SANCO (EUROPEAN COMMISSION), Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis, 3^a Edição, Documento N° SANCO/10476/2003, 5 de Fevereiro 2004, Bruxelas, Bélgica. 2010

SCHENCK, F.J.; BROWN, A.N.; PODHORNIAK, L.V.; PARKER A.; RELIFORD M.; WONG, J.W. A Rapid Multiresidue Method for Determination of Pesticides in Fruits and Vegetables by Using Acetonitrile Extraction/Partitioning and Solid-Phase Extraction Column Cleanup. **Journal of AOAC International**, 91 (2008) 422.

SHIMELIS, O.; YANG, Y; STERNERSON, K.; KANEKO, T.; YE, M. Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis. **J. Chromatography A**, 1165 (2007) 18.

SPISSO, B. F.; NOBREGA, A. W.; MARQUES, M. A. S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Ciência & Saúde Coletiva**, 14 (2009) 2091.

STAN, H.J. Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection: State-of-the-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evaluation. **Journal of Chromatography A**, 892 (2000) 347.

STOLKER, A.M.; BRINKMAN, U.A.Th. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - a review. **Journal of Chromatography A**, 1067 (2005) 15.

STORHERR, R.W.; OTT, P.; WATTS, R.R. A general method for organophosphorus pesticide residues in non fatty foods. **Journal of AOAC**, 54 (1971) 513.

UENO E.; OSHIMA, H., SAITO, I., MATSUMOTO, H., YOSHIMURA, Y.; NAKAZAWA, H. Multiresidue Analysis of Pesticides in Vegetables and Fruits by Gas Chromatography/Mass Spectrometry after Gel Permeation Chromatography and

Graphitized Carbon Column Cleanup. **Journal of AOAC International**, 87 (2004) 1003.

WARDENCKI, W.; MICHULEC, M., CURYŁO, J., *Int. J. Food Sci. Technol.*, 39 (2004) 703.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Disponível em <<http://www.who.int/foodsafety/en/>>. Acesso em janeiro de 2011.

ZOCCAL, R.; CARNEIRO, A. V. Uma análise conjuntural da produção de leite brasileira. Disponível em <<http://www.cileite.com.br/artigos/artigo.php?id=1>>. Acesso em janeiro de 2011.