



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS E TECNOLOGIAS

ANÁLISE DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM FARINHA DE TRIGO
INTEGRAL USANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E
DETERMINAÇÃO POR LC-MS/MS

Aline Benedetti Bordin

Aline Benedetti Bordin

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias, orientada pelo Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva.

Caxias do Sul – 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

B729a Bordin, Aline Benedetti, 1978-
Análise de resíduos de pesticidas em farinha de trigo integral usando método QuEChERS modificado e determinação por LC-MS/MS / Aline Benedetti Bordin. – 2014.
86 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.
Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, 2014.
Orientador: Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva.

1. Produtos químicos agrícolas. 2. Produtos químicos. 3. Trigo. 4. Pesticidas. I. Título.

CDU 2. ed.: 661.15

Índice para o catálogo sistemático:

1. Produtos químicos agrícolas	661.15
2. Produtos químicos	661
3. Trigo	633.11
4. Pesticidas	632.95

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Ana Guimarães Pereira – CRB 10/1460

"DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM FARINHA DE TRIGO INTEGRAL POR MÉTODO QuEChERS MODIFICADO POR LC-MS/MS."

Aline Benedetti Bordin

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestra em Engenharia de Processos e Tecnologias, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos e Produtos Industriais.

Caxias do Sul, 03 de Outubro de 2014.

Banca Examinadora:



Dr. Sidnei Moura e Silva (Orientador)
Universidade de Caxias do Sul (UCS)



Dra. Eloane Malvessi
Universidade de Caxias do Sul (UCS)



Dra. Emilene Mendes Becker
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)



Dra. Márcia Foster Mesko
Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcuta

Ao meu filho Joaquim, que esteve presente desde o início desta jornada. À ti, que és a minha própria vida, não te ofereço esta minha conquista, mas te dou algo mais valioso, o exemplo de como lutar e superar o sofrimento e os obstáculos da vida, para que tu possas alcançar as tuas próprias e inumeráveis conquistas, sempre colocando Deus em tua vida, sem O qual não há felicidade completa!

Te amo muito meu filho!

AGRADECIMENTOS

À Deus dou toda a honra e a glória, não apenas por esta conquista, mas por todas as que já tive e as que ainda terei. Muito obrigada por Teu amor, misericórdia e presença constantes em minha vida, sem os quais eu não conseguiria viver.

À Universidade de Caxias do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias pela possibilidade de realização deste curso.

À EMBRAPA Meio Ambiente em nome da Pesquisadora Vera Lúcia Ferracini por terem cedido os padrões de pesticidas da marca *Dr. Ehrenstorter* para a realização deste trabalho.

À EMBRAPA Trigo em nome do Pesquisador Leandro Vargas por ter cedido o trigo para realizar os estudos propostos neste projeto.

Ao Laboratório de Análises e Pesquisas em Alimentos - LAPA, por ter cedido a estrutura do laboratório para realizar as extrações.

Ao professor Dr. Sidnei Moura e Silva agradeço a orientação neste estudo, e principalmente o apoio e incentivo neste projeto. Obrigado pela amizade e pela oportunidade de trabalho no LBIOP.

À Luciane Minetto pelo auxílio prestado nas análises, pelo conhecimento transmitido, e pela atenção dada.

À Jocelene Soares por ser sempre prestativa em receber e cuidar das amostras na primeira hora da manhã.

À Luciana Bavaresco Andrade Touguinha pelo auxílio nas centrifugações, pelo apoio e amizade.

Ao meu esposo Mauro por ter me apoiado a realizar este sonho, por ter me consolado nos momentos difíceis, por ter auxiliado a cuidar do nosso pequeno nos dias de aula e nos dias dos estudos experimentais. Te amo eternamente!

Aos meus pais Noemi e Ivani compartilho com vocês mais esta vitória que Deus me concede, por todo carinho e compreensão, abdicção, palavras e ações de incentivo, de ajuda e de amor verdadeiro. Agradeço a Deus a existência de vocês em minha vida!

Aos meus irmãos Adriana e André, pelo apoio dado. Peço desculpas por não poder participar de todos os nossos encontros, ao longo desse período.

À minha sogra Lourdes e à amiga e cunhada Juçara, agradeço o apoio incondicional, pela incansável torcida.

À minha amiga Ina, pela experiência compartilhada, pela paciência, pelo apoio e pelas valorosas contribuições neste trabalho. Agradeço por você ter me acolhido tão bem e ter se tornado uma grande amiga. Sinto saudades da nossa convivência diária.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que me incentivaram e de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	TRIGO	19
3.2	RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM TRIGO E DERIVADOS.....	21
3.3	ANÁLISE DE AGROQUÍMICOS EM ALIMENTOS	26
3.3.1	Preparo das amostras para análise de pesticidas	27
3.3.2	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas	30
3.4	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	32
3.4.1	Seletividade.....	33
3.4.2	Linearidade e curva analítica.....	33
3.4.3	Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ).....	34
3.4.4	Precisão	34
3.4.5	Exatidão	35
3.4.6	Robustez	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	INSTRUMENTAÇÃO	36
4.2	REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS UTILIZADOS	37
4.3	PESTICIDAS ANALISADOS	38
4.4	PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS.....	40
4.5	OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA LC-ESI-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DOS AGROQUÍMICOS EM FARINHA DE TRIGO INTEGRAL.....	40
4.5.1	Escolha da fase móvel	41
4.5.2	Condições do espectrômetro de massas.....	42

4.6 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO QuEChERS EM AMOSTRAS DE FARINHA DE TRIGO INTEGRAL	42
4.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
5.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO LC-MS/MS EM FARINHA DE TRIGO INTEGRAL	46
5.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS	48
5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PROPOSTO	51
6 CONCLUSÕES	70
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
8 ANEXOS	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pesticidas selecionados para este estudo e Limites Máximos de Resíduos (LMR) em grão de trigo	23
Tabela 2. Levantamento de alguns agroquímicos detectados em alimentos no Brasil	26
Tabela 3. Pesticidas selecionados e analisados em LC-MS/MS	39
Tabela 4. Perfil de ionização dos agroquímicos quantificados por LC-MS/ em farinha de trigo integral	47
Tabela 5. Comparação método QuEChERS original e método proposto	49
Tabela 6. Coeficientes de determinação r^2 das curvas analíticas a partir das avaliações dos agroquímicos em farinha de trigo integral analisados por LC-MS/MS.	54
Tabela 7. Limites de detecção e quantificação instrumental e do método.	56
Tabela 8. Percentuais de recuperação e desvio padrão relativo (RSD) para a precisão intermediária	58
Tabela 9. Percentuais de recuperação e desvio padrão relativo para a repetitividade do método de extração de agroquímicos em farinha de trigo integral	60
Tabela 10. Efeito Matriz dos agroquímicos em farinha de trigo integral analisados por LC-MS/MS	63
Tabela 11. Valores de efeito em porcentagem para cada analito.	66
Tabela 12. Análise de resíduos de agroquímicos em amostras de farinha de trigo comerciais	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapeamento do cultivo de trigo no Brasil	20
Figura 2. Esquema do procedimento realizado para o método QuEChERS modificado	50
Figura 3. Representação do método QuEChERS modificado utilizado para a extração de agroquímicos nas amostras de farinha de trigo integral	51
Figura 4. Cromatograma obtido por LC-MS/MS das amostras branco da farinha de trigo integral.	52
Figura 5. Cromatograma obtido por LC-MS/MS do diluente utilizado nos ensaios.	52
Figura 6. Cromatograma obtido por LC-MS/MS das amostras fortificadas na concentração $10 \mu\text{gkg}^{-1}$ na farinha de trigo integral	53
Figura 7. Percentual de agroquímicos em farinha de trigo integral fortificadas e extraídos pelo método QuEChERS modificado, que apresentaram faixas de recuperação de <70%, 70-120% e >120%. As barras de erros indicam valores de RSD.	61
Figura 8. Percentual de efeito matriz em agroquímicos avaliados em farinha de trigo integral fortificadas e extraídos pelo método QuEChERS modificado.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ABRASCO – Associação Brasileira de Saúde Coletiva
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AOAC – Associação Químicos Analíticos Oficiais, do inglês, *Association of Official Analytical Chemists*
- APCI – Ionização química sob pressão atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*
- C18 – Octadecilsilano
- CCPR – Comitê do Codex Alimentarius sobre resíduos de pesticidas, do inglês *Codex Alimentarius Committee on Pesticide Residues*
- CEN – Comitê Europeu de Padronização, do inglês *European Committee for Standardisation*
- CI – Ionização Química, do inglês *Chemical Ionization*
- CN – ciano
- CONAB – Conselho Nacional do Abastecimento
- EI – Injeção Direta de Amostra, do inglês *Direct Sample Injection*
- 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 da América
- FAO – Organização para Agricultura e Alimentação, do inglês *Food and Agriculture Organization*
- GC-ECD - Cromatografia Gasosa acoplada a detector de captura de elétron, do inglês *Gas Chromatography Electron Capture Detector*
- GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*
- GC-MS/MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial, do inglês *Gas Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*

GC-NPD – Cromatografia Gasosa acoplada a detector de nitrogênio e fósforo, do inglês *Gas Chromatography Nitrogen and Phosphorus Detector*

GCB - Carbono grafitizado

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia

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*

LMR – Limite Máximo de Resíduo

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*

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeCN - Acetonitrila

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

MSPD – Dispersão da matriz em fase sólida, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*

m/z – razão massa/carga

-NH₂ - amino

n.q. – não quantificado

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONG – Organização Não Governamental

pH – Potencial hidrogeniônico

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

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

r² - Coeficiente de determinação

rpm – Rotação por minuto

RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

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

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

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

t_R – Tempo de retenção

UE – União Européia

RESUMO

Devido ao uso frequente de agroquímicos, é importante o controle dos mesmos. Desta forma, métodos analíticos instrumentais, principalmente quando envolvem as análises por cromatografia líquida, são capazes de avaliar qualitativa e quantitativamente misturas destas substâncias. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método de extração para determinação simultânea de resíduos de agroquímicos em farinha de trigo integral. O método QuEChERS foi modificado na etapa de extração, usando no lugar do sulfato de magnésio, o sulfato de sódio na primeira etapa, além disso o método modificado não realizou a etapa de *clean up*. Após foi validado o método modificado e as condições cromatográficas utilizadas. Para a extração foi usado acetonitrila contendo 1% de ácido acético, sulfato de sódio, acetato de sódio e citrato de sódio sesquihidratado. Na etapa de validação foi seguido os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez. A faixa linear avaliada neste trabalho foi de 1,0 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os agroquímicos analisados apresentaram r^2 de no mínimo 0,99, foi considerado aceitável pelas normas da ANVISA. O limite de quantificação do método apresentou valores iguais e/ou menores que os limites máximos de resíduos estabelecidos pela legislação brasileira (ANVISA). Dos agroquímicos analisados na farinha de trigo integral, 84% destes apresentaram percentuais de recuperação entre 70-120%, com repetibilidade e precisão intermediária com $\text{RSD} \leq 20\%$. Os agroquímicos 2,4-D, Cartap Hidrocloride, Ciproconazol, Etil Paraquat, Fenitrotiona e Parationa-metílica, não foram quantificados com segurança nos níveis de fortificação avaliados apresentando valores médios de recuperação, fora da faixa confiável para análise de resíduos. Avaliando as amostras coletadas na região da Serra Gaúcha, todos os agroquímicos detectados nas farinhas de trigo integrais, foram Carbendazim, Clorpirifos, Deltamitrina, Imidacloprido, Malationa, Pendimetalina, Pirimifos-metil, Triamedifom e Triadimenol, apresentaram valores abaixo do LMR estabelecido pela ANVISA, *Codex Alimentarius* e União Européia. O método desenvolvido e validado mostrou-se adequado podendo assim ser aplicado na determinação de resíduos de agroquímicos em de farinha de trigo integral.

Palavras-chave: LC-MS/MS, resíduos de agroquímicos, farinha de trigo integral, método QuEChERS

ABSTRACT

Due to the frequent use of agrochemicals, it is important to control the same. Thereby, instrumental analytical methods, particularly liquid chromatography analyzes, are able to qualitatively and quantitatively evaluate mixtures of these substances. The objective of this study was to develop and validate a method of extraction for simultaneous determination of pesticide residues in whole wheat flour. The QuEChERS method was modified in the extraction stage using in place of magnesium sulfate, sodium sulfate in the first step also the modified method not performed the step of clean up. After the modified method was validated and the chromatographic conditions used. For the extraction was used acetonitrile with 1% acetic acid, sodium sulfate, sodium acetate and sodium citrate sesquihydrate. Was not carried out the clean up step. The method was validated by evaluating the following parameters: selectivity, linearity, limit of detection, limit of quantification, precision, accuracy and robustness. The linear range evaluated in this study was 1.0 to 200 mg L⁻¹. Agrochemicals analyzed showed r² of at least 0.99 is considered acceptable by the rules of ANVISA. The quantification limit of the modified QuEChERS method showed equal and/or lower than the maximum residue limits established by Brazilian legislation (ANVISA) values. Of agrochemicals analyzed in whole wheat flour, 84% presented with percentage recovery between 70-120%, with repeatability and intermediate precision with RSD ≤ 20%. The 2,4-D agrochemicals, Cartap Hydrochloride, Cyproconazole, Ethyl Paraquat, Parathion-methyl and fenitrothion, were not quantified with safety in fortification levels evaluated presenting mean recovery values outside the reliable range for residue analysis. Evaluating the samples collected in Serra Gaucha region, all agrochemicals detected in whole-wheat flour, were carbendazim, chlorpyrifos, Deltamitrina, Imidacloprid, Malathion, Pendimetalina, Pirimiphos-methyl, and Triamedifom Triadimenol, had values below the MRL established by ANVISA, Codex Alimentarius and the European Union. The developed and validated method was adequate and can therefore be applied in the determination of agrochemicals residues in whole wheat flour.

Key-words: LC-MS/MS, agrochemicals residues, whole wheat flour, QuEChERS method

1 INTRODUÇÃO

Entre os alimentos mais consumidos mundialmente está o trigo. Este cereal é o segundo mais produzido no mundo, perdendo somente para a soja. Segundo FAO, em 2013, este cereal teve uma produção de 740 milhões de toneladas. Neste mesmo período a produção de arroz atingiu cerca de 477,3 milhões de toneladas e a produção de soja atingiu respectivamente 985,4 milhões de toneladas (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; *Food and Agriculture Organization*, 2014).

No Brasil, são produzidas em torno de 8 milhões de toneladas de trigo ao ano, enquanto que a soja tem uma produção de 74,0 milhões de toneladas, e o arroz com 7,3 milhões de toneladas ao ano (CONAB, 2014).

O trigo é uma espécie de cereal que possui um ciclo anual de produção, com cultivo realizado entre as estações de inverno e primavera. Este cereal passa por um processo de moagem, resultando em farinha, farinha integral, e farelo. Destes produtos processados podem ser elaborados pães, bolos, biscoitos e massas, e também pode ser comercializado para ração animal (EMBRAPA, 2014).

Para atender a qualidade no processo de produção desta cultura, tem-se observado o uso elevado de pesticidas para o controle de pragas durante o cultivo e armazenamento (SILVA et al., 1996).

Tem-se registrado no período da pós-colheita, a utilização de inseticidas organofosforados e piretróides para o controle de pragas em grãos armazenados. Dentre eles destacam-se os compostos Clorpirifos, Deltametrina e Pirimifos-metil (EMBRAPA, 2014).

A determinação destes resíduos de pesticidas é realizada através de técnicas e métodos altamente sensíveis, capazes de identificar e quantificar a concentração destes resíduos (KOLBERG, 2008).

A avaliação dos níveis destes resíduos faz-se necessário, pelo fato dos produtores não obedecerem ao intervalo de segurança ou período de carência dos pesticidas, o qual ocorre entre a última aplicação do agroquímico e a colheita do grão. Uma vez que para evitar as perdas no campo têm sido descumpridas às normas, como aplicação de quantidades acima dos limites estipulados pela

legislação brasileira, bem como pela aplicação de produtos não permitidos para a referida cultura (BARBOSA, 2004).

Ao longo dos últimos anos tem-se observado o desenvolvimento de técnicas e métodos para o preparo de amostra, em análise de resíduos de pesticidas, baseados na redução do uso de solventes orgânicos para a extração de agrotóxicos. Um exemplo dessas técnicas, é o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). Este método é baseado em uma extração a base de acetonitrila, seguida de partição líquido-líquido, com adição de $MgSO_4$ e/ou $NaCl$, e por fim seguida de uma etapa de purificação com extração em fase sólido dispersiva. Foi adotado nos Estados Unidos como o método oficial da *Association of Official Analytical Chemists* para a determinação de resíduos de pesticidas em alimentos.

O método QuEChERS sofreu diversas modificações, ao longo de seu desenvolvimento, com o objetivo de ser empregado como um método multirresíduo para a extração de agrotóxicos em alimentos, usando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas.

Na determinação de resíduos de pesticidas, o desenvolvimento de métodos analíticos constitui-se de uma etapa muito importante, onde a investigação deve incluir a validação do método desenvolvido. Desta forma, se um método existente for modificado, deve-se assegurar de que as características de desempenho do método atendam aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (INMETRO, 2011).

O desenvolvimento de novos métodos de extração e análise de resíduos de pesticidas se faz necessário para reduzir o uso de reagentes químicos e solventes orgânicos, e até mesmo reduzir etapas de extração.

Neste trabalho investigou-se uma modificação do método QuEChERS para a determinação de 37 pesticidas em farinha de trigo por LC-MS/MS, com o intuito de omitir e substituir etapas analíticas complicadas empregadas nos métodos tradicionais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método de extração para determinação simultânea de resíduos de agroquímicos em farinha de trigo integral por LC-MS/MS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método de extração de resíduos de agroquímicos em farinha de trigo integral;
- Desenvolver e otimizar um método de cromatografia líquida acoplada a analisador de massas sequencial para analisar resíduo de pesticidas em farinha de trigo integral;
- Validar o método de acordo com os parâmetros da Resolução n° 899, de 29 de maio 2003 – “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” da ANVISA.
- Demonstrar a aplicabilidade do método na determinação de resíduos de pesticidas em amostras de farinha de trigo integral.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A seguir será apresentada uma revisão da literatura contendo tópicos relacionados ao desenvolvimento do método.

3.1 TRIGO

O cultivo do trigo segue paralelo à história da antiguidade e da modernidade. Foi registrado o plantio desta cultura no Egito, em jazigos de múmias, na Suíça em habitações lacustres (BRUM & MÜLLER, 2008).

Por volta do ano de 1534, foi registrado o uso do trigo no Brasil, quando as caravelas de Martim Afonso de Souza transportavam os primeiros grãos, os quais foram lançados nas terras da Capitania de São Vicente, que atualmente é localizada no litoral dos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (KOLBERG, 2008).

O trigo é considerado o cereal mais importante para a alimentação humana, produzido nas regiões de clima temperado, sua produção está em torno de 18% em relação a produção mundial de cereais. Em segundo lugar aparece o arroz com 13% da produção. Após vem o milho com 12% em relação a produção de grãos (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, 2014).

A produção mundial de trigo para a safra 2013-2014 foi de 740 milhões de toneladas (CONAB, 2013). Dentro desta produção os Estados Unidos é o maior produtor deste grão, com uma produção de 57,97 milhões de toneladas ao ano (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, 2014).

O Brasil produz anualmente cerca de 5 a 6 milhões de toneladas de trigo. Em torno de 90% da produção deste cereal é cultivado na região sul do país. Segundo a CONAB, os estados do Paraná e Rio Grande do Sul são os maiores produtores de trigo, (Figura 1) (CONAB, 2013).

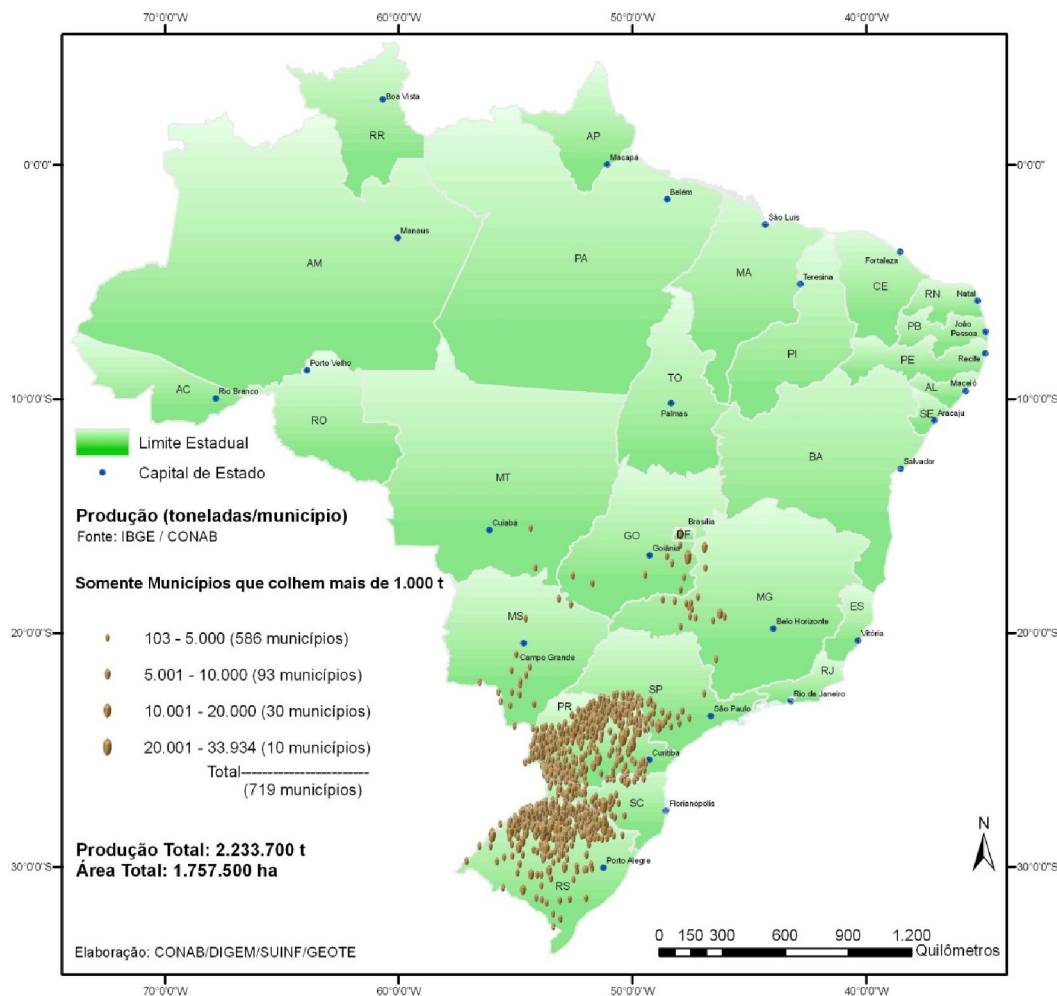


Figura 1. Mapeamento do cultivo de trigo no Brasil

Fonte: www.conab.gov.br

Existem mais de 20 mil variedades de grão de trigo. O gênero *Triticum aestivum* L., é a espécie mais cultivada no mundo, o equivalente a quatro quintos da produção mundial. Este gênero é frequentemente usado em fabricação de bolos, pães e produtos de confeitaria, por ser uma variedade de baixa dureza, denominada trigo mole e por conter um elevado conteúdo de amido. Contudo o gênero *Triticum durum* é utilizado na produção de massas em geral, como lasanhas, macarrão, por ser uma espécie que forma um glúten mais resistente, permitindo uma textura firme após o cozimento (ABITRGO, 2014).

A farinha de trigo, em base seca, é composta por aproximadamente 78% de carboidratos, 1,5% de resíduo mineral, 13% de proteínas, 3% de lipídios, essa

composição pode alterar conforme a variedade do trigo e a safra dos mesmos (NEVES, 2013).

A composição do grão de trigo é composta de endosperma (83%), farelo (14%) e germe (3%). O endosperma inclui o endosperma amiláceo e a camada de aleurona. Já o farelo é composto por seis tecidos diferentes e o germe geralmente inclui o escutelo e o embrião. Da moagem do trigo é obtida a farinha, e para a obtenção da farinha integral, o trigo é processado com a casca, amido e germe (Figura 2) (EMBRAPA, 2014).

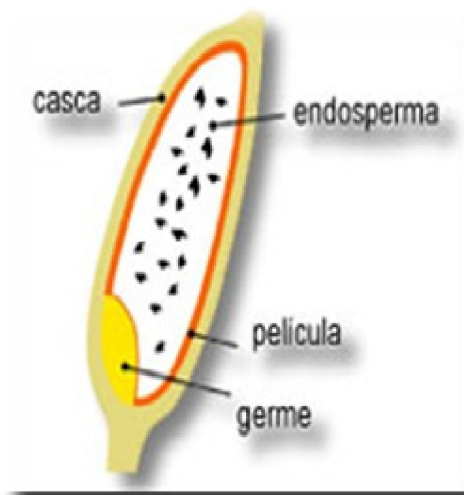


Figura 2. Composição do trigo
Fonte: EMBRAPA

3.2 RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM TRIGO E DERIVADOS

Nos últimos anos houve um aumento significativo do uso de pesticidas na produção de alimentos. Conforme ABRASCO em 2012, o Brasil é o maior consumidor de pesticidas agrícolas do mundo e aumenta sua utilização a uma velocidade duas vezes superior a dos demais países.

Pesticida, segundo *Codex Alimentarius*, é uma substância utilizada para prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar qualquer praga, incluindo espécies de plantas indesejáveis à plantação, insetos ou animais, durante a etapa de plantio/produção, armazenamento, transporte, distribuição e processamento do alimento ou da ração animal (FAO, 2014).

A utilização desses agroquímicos vem sendo a única ação usada em campo para combater e prevenir as pragas agrícolas. Porém, estes agroquímicos são

potencialmente tóxicos ao ser humano e animais, causando efeitos nocivos no sistema nervoso central e periférico, imunodepressor ou cancerígeno (BARBOSA, 2004).

Os cereais produzidos sem os cuidados com as Boas Práticas Agrícolas recomendadas pelo Ministério da Agricultura e Agropecuária apresentam resíduos de pesticidas. Isto ocorre pela aplicação incorreta do produto pelo produtor ou até mesmo pelo desrespeito aos prazos de carência entre a aplicação e a colheita (KOLBERG, 2008).

O controle da contaminação dos alimentos por esses agroquímicos no Brasil é quase inexistente. Desta forma, pode-se afirmar que os órgãos federais não possuem controle dos Limites Máximos de Resíduos de pesticidas em alimentos, sejam estes cultivados no país ou mesmo importados (ANVISA, 2014).

Os Limites Máximos de Resíduos (LMR) são definidos como a concentração máxima de resíduos de pesticidas, presente nos alimentos e que pode ser consumida sem prejuízo à saúde, ao longo de sua vida. Estes limites, conforme a ANVISA, são estipulados, através de avaliações toxicológicas e de risco para cada produto liberado para uso (ANVISA, 2014).

Para garantir a segurança dos alimentos aos consumidores quanto ao nível de resíduos de pesticidas, os LMRs são definidos pela Food and Agriculture Organization (FAO), pela Comissão do *Codex Alimentarius* e pela Organização Mundial da Saúde (OMS). No Brasil, a regulamentação do LMR e do intervalo de segurança para pesticidas é responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA, e do Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da Instrução Normativa nº 26, de oito de outubro de dois mil e dez, e Instrução Normativa nº 27, de onze de dezembro de dois mil e doze, as quais seguem o programa de monitoramento de resíduos de agrotóxicos e afins em alimentos de origem vegetal.

Os Limites Máximos de Resíduos entre $0,01$ e $0,05 \text{ mgkg}^{-1}$, representam atualmente, uma apreciável diminuição em relação aos limites precedentes. Os métodos de multirresíduos devem ser eficazes em detectar os compostos em concentrações de 5 a 10 vezes inferior ao LMR, garantindo assim a identificação e a quantificação exata (HERNANDO, 2001).

No Brasil não existem valores de LMRs estabelecidos para alimentos processados como a farinha de trigo, mas somente para grão de trigo. Apenas o Codex Alimentarius e União Européia possuem limites para alimentos processados. A Tabela 1 apresenta os pesticidas selecionados para este estudo e os Limites Máximos de Resíduos para a cultura de grão de trigo, dos compostos avaliados (ANVISA, Codex Alimentarius e União Européia, 2013).

Tabela 1. Pesticidas selecionados para este estudo e Limites Máximos de Resíduos (LMR) em grão de trigo

ANVISA, CA: Codex Alimentarius; EU: União Européia				
Nome	Grupo químico	LMR (mgkg ⁻¹) ANVISA	LMR (mgkg ⁻¹) CA	LMR (mgkg ⁻¹) UE
2,4-D (ácido diclorofenoxiacético)	Ácido ariloxialcanóico	0,2	2	0,05
Acetamiprido	Neonicotinóide	1	-	0,03
Azoxistrobina	Estrobilurina	0,05	0,2	0,3
Bendiocarb	Metilcarbamato de benzodioxol	-	-	-
Benyazon	Benzotiadinazona	0,01	0,1	0,1
Bioaletrina	Piretróide	-	-	-
Bromoxinil	Benzonitrila	-	-	-
Carbendazim	Benzimidazol	0,1	0,05	0,1
Carbofurano	Metilcarbamato de benzofuranila	0,1	-	0,02
Carboxine	Carboxanilida	0,2	-	0,01

Continuação tabela 1

Nome	Grupo químico	LMR (mgkg ⁻¹) ANVISA	LMR (mgkg ⁻¹) CA	LMR (mgkg ⁻¹) UE
Cartape	Bis(tiocarbamato)	0,01	-	-
Ciproconazol	Triazol	0,05	-	0,1
Clorpirifos	Organofosforado	0,2	0,5	-
Dazomete	Isotiocianato de metila (precursor de)	-	-	-
Deltametrina	Piretróide	1	2	2
Diclofope	Ácido ariloxifenoxipropiônico	0,02	-	-
Diclorvos	Organofosforado	-	10	0,01
Diuron	Uréia	0,05	-	0,2
Paraquat	-	-	-	-
Fenotrina	Piretróide	-	-	0,05
Fenitrothion	Organofosforado	1	6	-
Forato	Organofosforado	0,05	-	-
Foxim	Organofosforado	-	-	0,01
Imidacloprido	Neonicotinóide	0,5	0,03	0,1

Continuação tabela 1

Nome	Grupo químico	LMR (mgkg ⁻¹) ANVISA	LMR (mgkg ⁻¹) CA	LMR (mgkg ⁻¹) UE
Malationa	Organofosforado	8	10	8
Metamidofos	Organofosforado	0,1	-	-
Metomil	Metilcarbamato de oxima	0,1	2	0,02
Metribuzin	Triazinona	0,1	-	0,1
Parationa-metílica	Organofosforado	0,1	-	-
Pendimentalina	Dinitroanilina	0,1	-	-
Pirimifos-metil	Organofosforado	10	-	5
Pirazofos	Fosforotioato de heterociclo	0,02	-	0,05
Pirimicarbe	Dimetilcarbamato	0,05	-	0,5
Procloraz	Imidazolilcarboxamida	0,5	-	0,5
Tebuconazol	Triazol	0,1	0,15	0,2
Triadimefom	Triazol	0,1	-	0,2
Triadimenol	Triazol	0,5	-	-

Fonte: ANVISA; CA: Codex Alimentarius; EU: União Européia

3.3 ANÁLISE DE AGROQUÍMICOS EM ALIMENTOS

Com o objetivo de prevenir a ação de efeitos tóxicos dos agroquímicos em humanos, surgiu a necessidade de controlar os níveis residuais desses produtos em amostras de alimentos. Geralmente este controle vem sendo feito com o auxílio de métodos de extração e com uso de técnicas cromatográficas.

O desenvolvimento de método para análise de pesticidas em alimentos pode ser prejudicado por alguns fatores, tais como, a definição do resíduo a ser analisado e a presença de matriz complexa. Desta forma, a combinação de vários métodos é que demonstra melhores respostas para análise multiresíduo (NIELL, 2014).

Alguns exemplos de métodos de extração de agroquímicos em amostras de alimentos podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Levantamento de alguns agroquímicos detectados em alimentos no Brasil

Amostra	Método de extração	Técnica Analítica	Agroquímicos	Referência
Trigo	QUECHERS modificado - etapa <i>clean up</i> com C18	GC-MS modo SIM	Azoxistrobina Bifentrina Deltamettrina	KOLBERG, 2008
Carne, rim, fígado, ovo	QUECHERS modificado - etapa <i>clean up</i> com C18	LC/MS-MS modo ESI	Azoxistrobina 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) Triamedifon	PRESTES, 2011
Cebola	QUECHERS modificado - etapa <i>clean up</i> com C18	LC/MS-MS modo ESI	2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) Deltamettrina Tebuconazole	RODRIGUES, 2010
Soja	QUECHERS modificado	GC-MS, GC-MS/MS LC-MS/MS	Parationa-metílca Bioaletrina Fenotrina Metamidofós Metomil Carbendazin	PIZZUTTI, 2006
Uva	mini-Luke modificado	GCxGC-FID	Fenitrotrona	FRIGGI, 2008

Técnicas cromatográficas vêm sendo cada vez mais usadas para a determinação de resíduos de agroquímicos em alimentos. A escolha da técnica está relacionada com a estrutura química do composto a ser analisado. Com a problemática de detectar diferentes classes de pesticidas e quantificá-los em baixas concentrações, em nível de partes por milhão ou e até partes por bilhão, torna-se necessária a utilização de técnicas altamente sofisticadas, como a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, devido as suas excelentes características de eficiência de separação e sensibilidade (CHEN et al., 2011).

3.3.1 Preparo das amostras para análise de pesticidas

Tão importante como o método de análise é o procedimento de extração. A tarefa de desenvolver um método para determinar pesticidas não é simples, devido às diferentes propriedades químicas, à solubilidade, volatilidade, polaridade dos mesmos, e a ampla variedade de matrizes, o que pode conduzir a perdas durante o processo. Os analistas desempenham esforços para descobrir como transferir simultaneamente todo o resíduo dos pesticidas da matriz para a fase orgânica e qual o tipo de instrumento deve ser utilizado para a análise qualitativa e quantitativa dos pesticidas (NIELL, 2014).

Considerando que as concentrações do analito, nas análises de pesticidas, são na maioria das vezes baixas, e, que, as amostras requerem uma etapa prévia de preparo, minimizando as interferências. Desta forma, deve-se promover o fracionamento e o enriquecimento com todos os analitos de interesse, eliminando os interferentes provindos dos componentes da matriz. Qualquer perda de analito que ocorrer na etapa de preparo, não pode ser compensada por outra subsequente. Desta forma, esta etapa é fundamental para o processo analítico (PIZZUTTI, 2006).

No caso da análise do trigo, os grãos devem ser moídos para facilitar o acesso do solvente as partículas da farinha. Amostras com baixo teor de umidade (<80%) requerem adição de água antes de iniciar a etapa de extração, objetivando melhorar a capacidade de extração dos compostos. A água hidrata as partículas da farinha, e com isso, facilita o acesso do solvente na extração dos agroquímicos a serem analisados. Para cada 10 gramas de amostras, recomenda-se adicionar 10 mL de água (ANASTASSIADES et al., 2003a).

A aplicação de extrações com solventes orgânicos são escolhidas nas análises de rotina devido à simplicidade, rapidez e recuperações adequadas para uma larga faixa de polaridades. Um método multirresíduos consiste em homogeneizar a amostra com solvente orgânico, empregando agitação manual ou por equipamentos. A adição de água antes da etapa de extração pode melhorar em alguns casos a dessorção dos pesticidas da matriz. Os solventes mais indicados ao uso são a acetonitrila, metanol, acetona, acetato de etila, entre outros. A escolha do solvente está relacionada à compatibilidade com os analitos, evitar interferências da matriz ao extrato final, eficácia na etapa de limpeza, volatilidade e segurança para o analista (FUKUI, 2013).

3.3.2 Método de extração (QuEChERS)

Anastassiades, et al. (2003) desenvolveram um método que proporcionou resultados de alta qualidade com um número mínimo de etapas e um baixo consumo de solventes e colunas. Ao método foi dado o nome QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe), com as vantagens de ser rápido, fácil, barato, eficiente, robusto e seguro.

Este método visa atender aos Limites Máximos de Resíduos, estabelecidos pelas legislações internacionais e nacionais, e visa também atender a obtenção de extratos que podem ser analisados por Cromatografia Líquida e/ou Gasosa acopladas à detector de Massas (GC-MS/MS e LC-MS/MS) (NIELL, 2014).

A metodologia do método QuEChERS resume-se nas etapas de extração, partição e *clean up*.

A primeira etapa do método usa um solvente orgânico, que possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra. Estudos indicam que a acetonitrila tem vantagem de analisar em LC-MS/MS do que a acetona e acetato de etila e pode ser utilizada também em sistemas de GC-MS/MS (ANASTASSIADES et al., 2003; LEHOTAY et al., 2001).

Com o uso da acetona, a partição é controlada com a adição de cloreto de sódio e solventes apolares, porém a desvantagem neste processo é a diluição do extrato e o consumo de um maior volume de solventes. Já o uso de acetonitrila, não requer a adição de solventes apolares no processo de partição. Conforme o solvente

utilizado na etapa de partição obtêm-se melhores percentuais de recuperação para analitos polares (PRESTES, 2011; PIZZUTTI, 2006).

Na segunda etapa do método é empregado o uso de sais secantes como sulfato de sódio. Além deste sal, pode ser utilizado o sulfato de magnésio, que possui maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais, além disso, este sal reduz o volume na fase aquosa, ocorrendo no processo de hidratação uma reação exotérmica, aquecendo a amostra entre 40 a 45°C durante as etapas de extração/partição (ANASTASSIADES et al., 2003). A adição de sais neste processo é frequentemente usado, devido a rapidez, facilidade e baixo custo, além de não diluir o extrato da amostra e proporcionar uma separação das fases orgânica e aquosa (PRESTES, 2011).

O método QUECHERS original demonstra excelentes resultados em diferentes tipos de alimentos, porém alguns compostos apresentaram instabilidade e problemas na recuperação, devido ao pH da matriz. Desta forma, percebeu-se que o uso de tampões com pH 5,0, resultavam em recuperações, em torno de 70%, para compostos dependentes do pH, independentemente da matriz utilizada (ANASTASSIADES, 2007).

Lehotay et al. (2005a) desenvolveram o método QUECHERS acetato, onde a adição de acetato de sódio realiza o efeito tamponante (pH 4,8), evitando a degradação de certos pesticidas, como por exemplo captana, clorotalonil e folpete. Este método foi adotado em 2007 pela *Association of Official Analytical Chemist* como um método oficial para a determinação de resíduos de pesticidas em alimentos. Em seguida, Anastassiades et al. (2007), desenvolveram o método QUECHERS citrato, que, com a utilização de citrato de sódio di e sesquihidratados, provocam efeito tamponante (pH 5,0-5,5). Em 2008, o *European Committee for Standardisation*, oficializou o método. Assim, o citrato sesquihidratado foi escolhido como tampão na extração para o método QuEChERS citrato.

Após a adição dos sais e do tampão, é realizada a etapa de limpeza (*clean up*), a qual tem como o objetivo, reduzir as interferências da matriz e os limites de detecção. O adsorvente utilizado tem por objetivo remover os ácidos graxos, açúcares e outros co-extratos da matriz, através de ligações de hidrogênio. Porém pode resultar na perda parcial de alguns compostos, bem como no aumento dos custos e de tempo de extração dos agroquímicos. Além disso, uma limpeza má condicionada leva a efeitos adversos relacionados à qualidade dos dados gerados,

mascarando os picos dos agroquímicos por componentes que co-eluem da matriz, gerando falsos positivos e quantificação incorreta (LEHOTAY, et al., 2010a ; NIELL, 2014).

A aplicação do método QUECHERS te sido reportada para análise multirresíduo de pesticidas em vários alimentos. Em 2009, Hernández-Borges et al., utilizaram QUECHERS e *Gas Chromatography Nitrogen and Phosphorus Detector* (CG-NPD) para a determinação de onze agrotóxicos em banana, e encontraram valores de limites de quantificação (LOQ) na faixa de 0,01 a 0,14 mg kg⁻¹, e percentuais de recuperação entre 67 e 118% e RSD ≤ 16%. Também com este método QUECHERS, foram quantificados 36 agrotóxicos em mel, através de *Gas Chromatography Electron Capture Detector* (GC-ECD) e *Gas Chromatography Nitrogen and Phosphorus Detector* (GC-NPD), com a obtenção de percentuais de recuperação entre 70 e 120% e RSD ≤ 22% (BARAKAT et al., 2007).

Foi utilizado o método QUECHERS para extrair diflubenzurona e triflumurona em tomate, através de LC acoplada a sistema de fotoderivatização pós-coluna com detector de quimioluminescência. A recuperação apresentou entre 79,7 e 94,2%, com valores de RSD ≤ 10%, e valores de limite de detecção (LOD), na faixa de 0,05 a 0,26 µg kg⁻¹ e valores de limite de quantificação (LOQ) entre 10 e 20 µg kg⁻¹ (LEHOTAY, 2007).

3.3.3 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

As técnicas por GC-MS e LC-MS são muito bem estabelecidas para a análise de alimentos. As análises realizadas por GC são apropriadas para compostos voláteis e termicamente estáveis. Contudo, muitos compostos não apresentam estas características, além de serem muito polares. Desta forma, esses compostos podem ser separados pela técnica de LC (ALDER, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma das técnicas mais utilizadas na determinação de compostos não voláteis. Porém, apesar de ser uma excelente técnica de separação, necessita de uma técnica confirmatória quando a análise for qualitativa (LANÇAS, 2009).

O acoplamento da cromatografia líquida com o espectrômetro de massas permite a identificação da composição química de um determinado composto

isolado, ou de vários compostos em misturas complexas, através da determinação de suas massas moleculares, pela movimentação através de um campo elétrico ou magnético. Essa movimentação ocorre pela separação dos íons de acordo com sua relação massa/carga (m/z). Este acoplamento permite um aumento da seletividade e sensibilidade (SKOOG et al., 2008).

A sequência mais usada, para determinação de resíduos de pesticidas em alimentos é a fonte de íons, seguida de analisador de massas, detector e por fim processador de sinais.

As fontes de ionização foram desenvolvidas com o intuito de resolver a incompatibilidade entre as vazões empregadas no sistema cromatográfico, elas auxiliam na remoção do solvente e no interfaceamento entre a coluna cromatográfica e o espectrômetro de massas. Estas fontes facilitam na transferência da amostra que elui da coluna cromatográfica para a fase gasosa (interface coluna-MS) e a ionização da amostra (LANÇAS, 2009).

Das fontes de ionizações, a eletronebulização (*electrospray*, ESI) permite a formação de íons na pressão atmosférica. Com uma voltagem em torno de 3.000 e 5.000 V, o analito passa pelo capilar e atinge a pressão atmosférica em forma de um spray aerossol. As gotículas formadas são dessolvatadas e os íons fluem em direção ao espectrômetro de massas, estes são movidos pelas atrações eletrostáticas e pela pressão reduzida (LANÇAS, 2009; PRESTES, 2011).

Na técnica de ionização química a pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI), o vaporizador converte o eluato do cromatógrafo líquido em uma fase gasosa. Este aquecimento vaporiza o líquido e as moléculas do solvente na fase gasosa são ionizadas. As moléculas ionizadas passam por um capilar de vidro que leva para dentro do analisador de massas (HARRIS, 2008).

A técnica de APCI determina massas molares menores do que 2000 unidades. É ótima para analisar moléculas iônicas, polares e apolares, podendo ser usada no modo positivo e negativo. Ela é menos utilizada do que a técnica ESI, mesmo sendo aplicada em moléculas polares e apolares, o fato de serem empregadas altas temperaturas desfavorece a técnica, sendo menos utilizada em análise de biomoléculas grandes e termicamente instáveis (NUÑEZ, 2005; PRESTES, 2011).

Dos tipos de analisadores de massas, o espectrômetro de massas triplo quadrupolo, tem como vantagens a avaliação de um número significativo de analitos por segmento, com o uso de fragmentos para quantificação e confirmação.

O sistema triplo quadrupolo, apresenta acoplamento de dois ou mais analisadores de massas em conjunto (*tandem*). Desta forma, este sistema, em algumas misturas complexas, faz-se necessário. O analisador triplo-quadrupolo é muito eficiente nestes casos, por quantificar e qualificar com rapidez os analitos, mesmo em baixas concentrações. Neste analisador, o primeiro quadrupolo age como um filtro de massas selecionando o íon de interesse. O íon nesta etapa é fragmentado por colisão com um gás inerte na célula de colisão, e no terceiro quadrupolo os fragmentos produzidos são analisados (SKOOG et al., 2008).

As vantagens da extração usando método QuEChERS com as técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria atômica, tem sido descritas para análises multirresíduos.

NIELL e colaboradores utilizaram QuEChERS baseado no método de análises de multiresíduo em pesticidas presentes em cera de abelha, quantificados através de LC-MS/MS e GCxGC-TOF (NIELL, et al., 2014). Rodrigues (2010), realizou o estudo da otimização e validação de métodos empregando Dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinar pesticidas em cebola. Prestes (2011) desenvolveu um método de extração QuEChERS modificado para determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por LC-MS/MS.

3.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de métodos tem por objetivo assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos, delineando procedimentos de validação do processo analítico empregado, garantindo assim a qualidade das medições químicas, através da sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade (PRESTES, 2011).

As agências reguladoras do Brasil e de outros países vem estabelecendo normas com diretrizes a serem adotadas no processo de validação que possibilitem

a obtenção, de forma clara e objetiva, de evidências de que um método analítico é adequado para o uso desejado (CHIARADIA, 2009).

A validação deve garantir, através de estudos analíticos, que o método atenda às requisições das aplicações analíticas, garantindo a confiabilidade dos resultados. No Brasil a norma que rege a realização de estudos de validação em métodos analíticos e bioanalíticos, é a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003; Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, 2003).

As variáveis, seletividade, linearidade, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez são os principais parâmetros utilizados na validação de métodos.

3.4.1 Seletividade

A seletividade de um método pode ser definida, segundo ANVISA (2003), como a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto na presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Para avaliar a seletividade do método, faz-se uma comparação com amostras que foram contaminadas com agroquímicos, em relação com uma amostra que não contém agroquímico, comparando resultados positivos com negativos (ANVISA, 2003).

3.4.2 Linearidade e curva analítica

Segundo ANVISA, 2003, a linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

A linearidade gera resultados diretamente proporcionais em relação à concentração do analito, em uma determinada faixa de concentração. Ela é determinada pelas curvas analíticas, que são gráficos de calibração, onde a

resposta do equipamento está relacionada com as diferentes concentrações do analito (PRESTES, 2011).

A curva de calibração é construída através de soluções analíticas dos pesticidas, em solvente ou no extrato da matriz. A curva preparada em solvente proporciona um sinal do instrumento com a concentração do analito, sem considerar a interferência da matriz (ORSO, 2011).

3.4.3 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)

Em análises de traços, quando as medidas em amostras são em níveis baixos ($\mu\text{g}/\text{kg}$), é importante identificar o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado ou quantificado pelo método (INMETRO, 2011).

O limite de detecção é caracterizado pela menor concentração da substância em exame que pode ser detectada. O limite pode ser calculado pelo método baseado na relação 3 vezes razão sinal:ruído. Porém neste método somente pode ser aplicado para sistemas analíticos que apresentam ruído para a linha base. Além deste, pode ser estabelecido por meio de análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável de confiança (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004).

Já o limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão. Também é considerado como o menor valor de concentração em que o analito pode ser quantificado com certo limite de confiança. Pode ser determinado por meio do ruído da linha de base considerando como limite de quantificação a concentração que produza relação sinal:ruído superior a 10:1 (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004).

3.4.4 Precisão

A precisão avalia a dispersão dos resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou soluções analíticas de referência, analisadas em condições definidas (INMETRO, 2011).

Na precisão, um parâmetro adequado é a repetibilidade e a reprodutibilidade, a qual é definida como a concordância entre os resultados dentro de um curto

período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. Desta forma, a repetibilidade do método é verificada através de nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, 3 concentrações, baixa, média e alta, com 3 réplicas cada (ANVISA, 2003).

Valores de RSD (do inglês *Relative Standard Deviation*), de até 20% são aceitáveis, quando utilizado métodos empregados para a determinação de pesticidas em níveis de traços (PRESTES, 2011).

3.4.5 Exatidão

Exatidão do método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Também é definida como a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência verdadeiro. Representa a existência de erros sistemáticos, e é um dos critérios mais importantes para o julgamento do desempenho de um método analítico (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004).

Caso houver indisponibilidade de material de referência certificado, a exatidão pode ser avaliada através dos ensaios de fortificação e recuperação, onde é realizada a adição de uma quantidade conhecida de um padrão certificado do analito de interesse à matriz. Após a etapa de extração e análise instrumental, a resposta é comparada com aquela dada pela análise do padrão de referência, dissolvido em um solvente puro (CODEX ALIMENTARIUS, 2013).

A exatidão do método pode ser determinada após o estudo da linearidade e da especificidade, sendo avaliada a partir de no mínimo 9 determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, sendo 3 concentrações, baixa, média e alta, com 3 replicatas cada (ANVISA, 2003).

Os intervalos de recuperação entre 70 e 120% são aceitos com a precisão de até 20% para a maioria dos métodos analíticos, inclusive para análise de pesticidas (PRESTES, 2011; SANCO, 2010).

3.4.6 Robustez

Segundo ANVISA, 2003, na robustez de um método analítico é avaliada a capacidade em resistir a pequenas variações nos parâmetros analíticos. Para examinar as causas da variabilidade dos resultados, vários fatores devem ser avaliados, como por exemplo, no preparo da amostra pode ser avaliado os fatores de estabilidade das soluções analíticas ou o tempo de extração. Na espectrometria, pode-se avaliar a variação de pH da solução, ou a temperatura, ou até mesmo diferentes fabricantes de solventes. E na cromatografia líquida, avalia-se a variação de pH da fase móvel, a variação da composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperaturas ou até mesmo vazão da fase móvel.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de trigo utilizadas no processo de validação do método multirresíduo, devem ser amostras isentas de qualquer tipo de resíduo de pesticidas que possa interferir no processo. Estas amostras foram preparadas para a obtenção das curvas de calibração e também foram utilizadas no preparo das fortificações para avaliação do percentual de recuperação do método de extração. As amostras de trigo foram cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Trigo, cultura BRS 327, colheita 2011 e 2012. Para a validação e para a aplicação do método foram utilizadas amostras de farinhas de trigo integral de duas marcas provenientes de Moinhos localizados na Serra Gaúcha. Foram escolhidas culturas de trigo cultivadas em duas regiões, centro-leste e centro-norte do Rio Grande do Sul. O período da coleta destas farinhas foi entre novembro de 2013 e março de 2014.

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão descritos abaixo:

- ✓ Agitador Vortex – 2x³ (Velp Científica, Itália)
- ✓ Balança analítica de precisão - BEL Engineering (Piracaba - SP, Brasil)
- ✓ Centrífuga Eppendorf Centrifuge 5804R (Hamburgo, Alemanha)

- ✓ Micropipetadores com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- ✓ Moinho de facas Quimis IKA A11 Basic (São Paulo, Brasil);
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q Millipore Reference (Billerica, MA, Estados Unidos);
- ✓ Sistema LC-MS/MS: Cromatógrafo a Líquido de ultra-alta eficiência (HPLC) Shimadzu (Japão), equipado com:
 - Detector MS, SPD-20 com fonte ESI, utilizando o modo de ionização por eletronebulização (ESI);
 - Amostrador automático SIL 20AXR, bomba LC-20ADXR, forno para a coluna e sistema de desgaseificação CTO-20;
 - Coluna analítica Shim-pack XR-ODSIL, 2,2 μm , 3,0 x 100 mm;
 - Espectrômetro de massas triplo quadrupolo Shimadzu, LC-MS 8030 (Japão);
 - Sistema de aquisição de dados através do Software Release 5.4.2 SP6 – LabSolutions LCMS for LCMS-8030;
 - Sistema gerador de nitrogênio de marca Peak Scientific NM 32LA

4.2 REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS UTILIZADOS

- ✓ Acetato de sódio anidro p.a. (Vetec, Brasil);
- ✓ Acetonitrila grau HPLC (Panreac, Barcelona, Espanha);
- ✓ Ácido acético glacial (Synth, Brasil);
- ✓ Ácido fórmico $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich, Estados Unidos);
- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Millipore Reference (resistividade de 18,2 $\text{M}\Omega \text{ cm}$);
- ✓ Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 mL;
- ✓ Gás argônio pureza 99,9992% usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS (Air Product Ltda, Brasil);
- ✓ Hidrogenocitrato de sódio sesquidratado (Sigma Aldrich, Estados Unidos);
- ✓ Metanol grau HPLC (Panreac, Barcelona, Espanha);
- ✓ Padrões sólidos dos agroquímicos, conforme tabela 3;
- ✓ Sulfato de sódio anidro (Neon, SP, Brasil);

- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 50 mL (TRP, Espanha);
- ✓ Vidrarias comum de laboratório.

4.3 PESTICIDAS ANALISADOS

A seleção dos pesticidas investigados neste trabalho foi baseada na ANVISA que dispõe os agroquímicos permitidos para uso na cultura trigo. Devido a grande quantidade de agroquímicos liberados para esse cereal, que totaliza 188 compostos, foi realizada uma seleção dos mais utilizados em campo. Assim para o desenvolvimento do trabalho, alguns padrões foram adquiridos *Sigma-Aldrich* (Estados Unidos) e outros foram cedidos pela EMBRAPA Meio Ambiente marca *Dr. Ehrenstorfer* (Augsburg, Alemanha).

Os pesticidas selecionados estão listados na Tabela 3, com a sua fórmula molecular, massa molar, pureza e marca.

Tabela 3. Pesticidas selecionados e analisados em LC-MS/MS

Pesticidas	Fórmulas	Massa molar (gmol^{-1})	Pureza (%)	Marca
2,4 – D	$\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_2\text{O}_3$	221,04	99,8	<i>Sigma-Aldrich</i>
Acetamiprido	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClN}_4$	222,67	99,9	<i>Sigma-Aldrich</i>
Azoxistrobina	$\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5$	403,00	99,5	<i>Dr. Ehrenstorter</i>
Bendiocarbe	$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_4$	223,23	99,4	<i>Sigma-Aldrich</i>
Bentazon	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	240,28	99,9	<i>Sigma-Aldrich</i>
Bioaletrina	$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_3$	302,41	96,6	<i>Sigma-Aldrich</i>
Bromoxinil	$\text{C}_7\text{H}_3\text{Br}_2\text{NO}$	276,91	99,9	<i>Sigma-Aldrich</i>
Carbendazim	$\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	191,00	97,0	<i>Dr. Ehrenstorter</i>
Carbofurano	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_3$	221,00	99,5	<i>Dr. Ehrenstorter</i>
Carboxine	$\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}$	235,07	99,9	<i>Sigma-Aldrich</i>
Cartap Hydrochloride	$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2\text{HCl}$	273,80	-	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ciproconazol	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}$	291,78	99,8	<i>Sigma-Aldrich</i>
Clorpirifos	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{NO}_3\text{PS}$	350,59	99,9	<i>Sigma-Aldrich</i>
Dazomete	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{S}_2$	162,28	99,9	<i>Sigma-Aldrich</i>
Deltametrina	$\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{Br}_2\text{NO}_3$	504,80	98,0	<i>Dr. Ehrenstorter</i>
Diclofope	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{O}_4$	341,19	99,2	<i>Sigma-Aldrich</i>
Diclorvos	$\text{C}_4\text{H}_7\text{Cl}_2\text{O}_4\text{P}$	220,87	98,5	<i>Dr. Ehrenstorter</i>
Diuron	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$	232,90	97,5	<i>Dr. Ehrenstorter</i>
Etil Paraquat	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2$	256,90	-	<i>Sigma-Aldrich</i>
Fenotrina	$\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_3$	350,45	94,4	<i>Sigma-Aldrich</i>
Fenitrotiona	$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{NO}_5\text{PS}$	277,04	97,5	<i>Dr. Ehrenstorter</i>
Forato	$\text{C}_7\text{H}_{17}\text{O}_2\text{PS}_3$	260,38	95,8	<i>Sigma-Aldrich</i>
Foxim	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}$	298,30	98	<i>Sigma-Aldrich</i>
Imidacloprido	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ClN}_5\text{O}_2$	255,45	99,2	<i>Dr. Ehrenstorter</i>
Malationa	$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{PS}_2$	330,11	99,5	<i>Dr. Ehrenstorter</i>
Metamidofos	$\text{C}_2\text{H}_8\text{NO}_2\text{PS}$	141,00	97	<i>Dr. Ehrenstorter</i>
Metomil	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$	162,07	99,7	<i>Dr. Ehrenstorter</i>
Metribuzin	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_4\text{OS}$	214,07	99,5	<i>Dr. Ehrenstorter</i>
Parationa-metíllica	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}_5\text{PS}$	263,00	98,5	<i>Dr. Ehrenstorter</i>
Pendimentalina	$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$	281,13	99,2	<i>Dr. Ehrenstorter</i>
Pirimifos-metil	$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3\text{PS}$	305,33	99,3	<i>Sigma-Aldrich</i>
Pirazofos	$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_5\text{PS}$	373,08	97,5	<i>Dr. Ehrenstorter</i>
Pirimicarbe	$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$	238,00	99,1	<i>Dr. Ehrenstorter</i>

Continuação Tabela 3

Pesticidas	Fórmulas	Massa molar (g mol^{-1})	Pureza (%)	Marca
Procloraz	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_2$	376,35	97,0	<i>Dr. Ehrenstorter</i>
Tebuconazol	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}$	307,45	98,5	<i>Dr. Ehrenstorter</i>
Triadimefom	$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{O}_2$	293,45	98,6	<i>Dr. Ehrenstorter</i>
Triadimenol	$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_2$	295,45	98,0	<i>Dr. Ehrenstorter</i>

4.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

As soluções analíticas do padrão foram preparadas na concentração de $0,1 \text{ g L}^{-1}$ em solução de metanol grau HPLC e ácido fórmico 0,1%. Estas soluções foram armazenadas em frasco âmbar e estocadas a -18°C .

Para o estudo da validação do método proposto, as soluções analíticas foram diluídas obtendo na concentração final de 10 mg L^{-1} contendo todos os pesticidas a serem estudados. Com esta solução de trabalho, foram realizadas diluições para otimizar os parâmetros do espectrômetro de massas, fonte de ionização, preparo das curvas analíticas e fortificação das amostras.

4.5 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA LC-ESI-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DOS AGROQUÍMICOS EM FARINHA DE TRIGO INTEGRAL

As determinações foram realizadas, empregando a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas sequencial (LC-MS/MS). Em relação aos sistemas acoplados a detectores convencionais, este apresenta maior detectabilidade e seletividade, minimizando a co-eluição de substâncias encontradas na análise cromatográfica. No espectrômetro de massas, a confirmação dos analitos de interesse em níveis de traços (PRESTES, 2011).

A tabela 4 demonstra os principais parâmetros do sistema cromatográfico LC-MS/MS.

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

Parâmetros	LC-MS/MS
Coluna analítica	Shim-pack XR-ODSII, 2,2 μm , 3,0 \times 100 mm
Fase móvel	A: água com 5 mmolL^{-1} de formiato de amônio e 0,1% ácido fórmico B: metanol: água com 5 mmolL^{-1} de formiato de amônio e 0,1% ácido fórmico (90:10)
Gradiente de eluição	75% (A) e 25%(B) de 0 a 1 min. 5% (A) e 95% (B) de 7,5 a 12 min. 75% (A) e 25%(B) de 15 a 18 min.
Vazão	0,200 mLmin^{-1}
Volume de injeção	10 μL
Tempo de corrida	18 min
Fonte de ionização	ESI
Detector	Espectrômetro de massas, do tipo Triplo Quadrupolo, operando no modo MS/MS
Voltagem capilar	4500 eV

4.5.1 Escolha da fase móvel

Neste trabalho, a escolha da fase móvel foi obtida avaliando alguns trabalhos realizados com o método de extração QuEChERS. A fase móvel A foi composta de água com 5 mmolL^{-1} de formiato de amônio e ácido fórmico 0,1% (v/v), e a fase móvel B metanol água com 5 mmolL^{-1} de formiato de amônio e 0,1% ácido fórmico (90:10), com vazão de 0,200 mLmin^{-1} . A tabela 5 demonstra a programação linear.

Tabela 5. Gradiente utilizado para eluição dos compostos

Tempo (min)	% A	% B
0,01	75	25
1	75	25
7,5	5	95
12	5	95
15	75	25
18	75	25

% A: Solução de água 5 mmolL⁻¹ de formiato de amônio e 0,1% ácido fórmico

% B: metanol: água com 5 mmolL⁻¹ de formiato de amônio e 0,1% ácido fórmico

(90:10)

4.5.2 Condições do espectrômetro de massas

Para obter condições ótimas de análise de cada um dos pesticidas avaliados, foram realizadas injeções diretas no espectrômetro de massas, com solução analítica padrão 0,5 mgL⁻¹ de cada composto. Foi selecionado o modo de ionização da fonte (eletronebulização positiva e/ou eletronebulização negativa), através das infusões realizadas. Também foi selecionada a voltagem do capilar, energias de colisão, para fragmentar o íon percussor e gerar os íons produtos, temperatura de fonte e temperatura e pressão do gás de dessolvatação para secagem do solvente.

Depois desta avaliação foram selecionados os íons. Para a quantificação, foi selecionado o íon mais intenso e, para a qualificação, o segundo íon mais intenso de cada composto.

4.6 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO QuEChERS EM AMOSTRAS DE FARINHA DE TRIGO INTEGRAL

Neste trabalho foram realizadas modificações no método QuEChERS original, proposto por ANASTASSIADES et al. (2003). Para a extração dos pesticidas, foi preparada uma mistura de grãos de trigo que foram moídos com auxílio de um moinho de facas, obtendo um farelo fino, para tornar a amostra o mais homogênea possível.

Após o processo de moagem foram adicionados 15 mL de água para cada 10 g de trigo. Esta proporção foi baseada em estudos realizados em matrizes que possuem um teor de umidade abaixo de 80%. Esta mistura ficou em repouso durante 1 hora.

Em seguida procedeu-se a metodologia proposta, sem a etapa de *clean up*. A figura 3 mostra a representação esquemática do método de extração QUECHERS utilizado para análise de resíduos de agroquímicos em amostras de farinha de trigo integral.

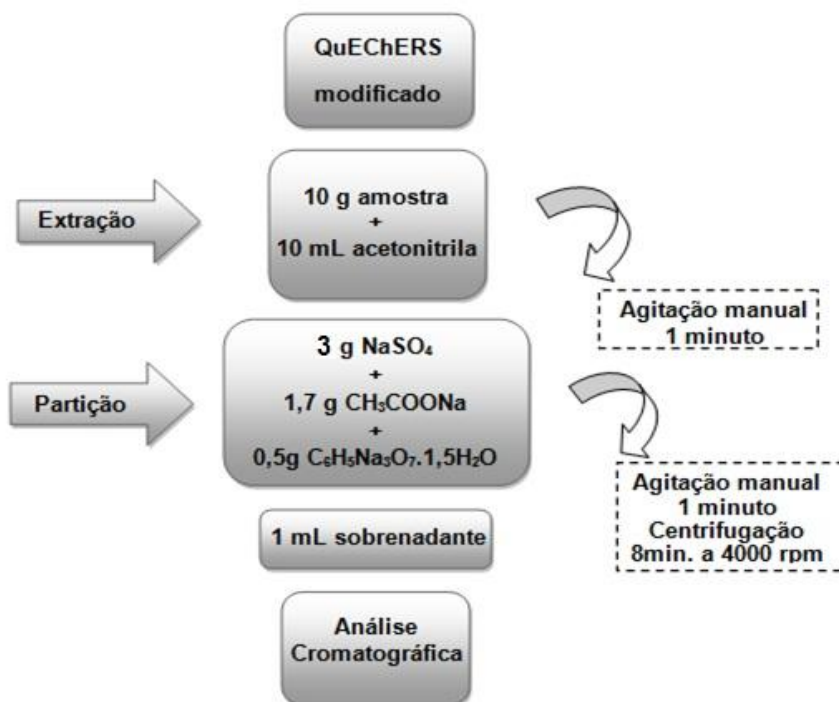


Figura 3. Representação esquemática do método de extração utilizado para análise de resíduos de agroquímicos em amostras de farinha de trigo integral.

4.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação de um procedimento analítico consiste na avaliação da capacidade do processo analítico em produzir resultados confiáveis e adequados com a qualidade desejada, sendo compatíveis com a precisão e exatidão, consideradas como satisfatórias (INMETRO 2011).

Neste trabalho foram avaliadas as variáveis, seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez, para validação do método (INMETRO, 2011; ANVISA, 2003).

A linearidade avaliou-se a partir das soluções analíticas preparadas tanto em solvente curva padrão quanto nos extratos da matriz curva adição matriz, nas concentrações 1; 5; 10; 50; 100; 200 $\mu\text{g L}^{-1}$.

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

A precisão do instrumento foi avaliada em função da dispersão dos resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra. A precisão do método foi avaliada através da repetitividade das amostras fortificadas nas concentrações 10, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Foram realizadas seis extrações de cada nível de fortificação e cada extrato foi injetado uma vez. A precisão intermediária do método foi determinada avaliando as extrações das amostras fortificadas e dos padrões dos agroquímicos em dias diferentes.

A exatidão foi avaliada através de ensaios de fortificação e recuperação das amostras, utilizando o método QuEChERS modificado, adicionando uma quantidade conhecida de um padrão certificado do analito de interesse à matriz. Os ensaios de fortificação foram realizados a partir da solução analítica com concentração 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$ contendo todos os agroquímicos, em três níveis diferentes de concentração, obtendo as seguintes concentrações nas amostras de farinha de trigo integral: 10, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

A exatidão é expressa em percentagem conforme equação 1,

$$\text{Exatidão (R(\%))} = \left(\frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \right) * 100 \quad (1)$$

O método proposto foi aplicado pra estas amostras fortificadas conforme descrito anteriormente.

O efeito matriz foi avaliado através da comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas em solvente (acetonitrila) e nos extratos da farinha de trigo integral. O cálculo foi efetuado conforme a equação 2.

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = \left(\frac{x_1 - x_2}{x_2} \right) * 100 \quad (2)$$

Onde:

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

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

Para avaliar a robustez, foi realizado o teste de Youden, que permite ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais. O teste foi realizado conforme a Tabela 6, sendo o resultado de efeito a diferença entre a média dos resultados das 4 análises com os fatores normais e a média dos resultados das 4 análises com fatores variados, conforme a Equação 3.

$$A/a = \frac{s+t+u+v}{4} - \frac{w+x+y+z}{4} \quad (3)$$

Os parâmetros modificados para o teste foram: marca de solvente (A/a), utilizando duas marcas diferentes de metanol; fase móvel (formiato) (B/b), sendo utilizada variação de 4,5 mmolL⁻¹ de formiato de amônio para a fase; tempo de centrifugação pós extração (C/c), com o tempo normal 8 minutos e o tempo variado 6 minutos; fase móvel (ácido) (D/d), sendo utilizada variação de 0,05 mL de ácido fórmico para a fase alterada; agitação na extração (E/e), com agitação mais lenta; temperatura de coluna (F/f), sendo a temperatura normal 30 °C e a temperatura alterada 27 °C e vazão fase móvel (G/g), sendo utilizada uma vazão de 0,180 mLmin⁻¹.

Tabela 6. Combinações de análises para teste de robustez.

Fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	W	X	y	z

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO LC-MS/MS EM FARINHA DE TRIGO INTEGRAL

Neste trabalho, devido a polaridade dos compostos, investigou-se o modo ESI. Este sistema é mais indicado para a avaliação de compostos neutros ou polares. Nesta fonte a produção de íons do analito ocorre na fase líquida, e ao passar pelo sistema de injeção são transformados em íons gasosos, que em seguida são introduzidos no espectrômetro de massas (PRESTES, 2011; SHEROL, 2010).

A Tabela 7 apresenta os 37 agroquímicos analisados por LC-MS/MS. Os resultados para cada analito foram avaliados pelo modo de ionização ESI+ e ESI-, usando modo de aquisição monitoramento de reações múltiplas (MRM), íons precursores e íons produtos, energia de colisão e tempo de retenção.

Tabela 4. Perfil de ionização dos agroquímicos quantificados por LC-MS/ em farinha de trigo integral

Compostos	t _R (min)	Modo ionização (+/-)	1ª transição Quantificação			2ª transição Confirmação		
			Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energi a de colisão (eV)
2,4 – D	9,6	-	219	125	20	219	160	20
Acetamiprido	6,5	+	223	126	20	223	56	20
Azoxistrobina	8,9	+	404	372	20	404	329	35
Bendiocarbe	7,8	+	224	109	20	224	167	20
Bentazon	8,1	-	239	132	35	182	197	35
Bioaletrina	11,8	+	303	135	20	303	107	20
Bromoxinil	9	-	276	79	30	276	81	30
Carbendazim	6,1	+	192	160	20	192	132	20
Carbofurano	7,8	+	222	165	20	222	123	35
Carboxine	8,2	+	236	143	20	236	87	35
Cartap Hydrochloride	3,3	+	238	73	20	238	150	35
Ciproconazol	7,8	+	291	70	20	291	125	20
Clorpirifos	12,3	+	352	200	20	352	125	20
Dazomete	5,4	+	163	90	10	163	120	10
Deltametrina	12,6	+	523	281	20	523	181	20
Diclofope	11,7	+	358	281	10	358	120	20
Diclorvos	7,8	+	221	109	20	221	127	20
Diuron	9	+	233	72	35	233	160	20
Etil Paraquat	7,5	+	185	171	10	185	158	20
Fenotrina	14,5	+	351	183	20	351	144	20
Fenitrotiona	11	+	278	125	20	278	109	25
Forato	11,1	+	261	199	10	291	171	10
Foxim	10,7	+	299	129	20	299	153	20
Imidacloprido	6,2	+	256	175	20	256	209	20
Malationa	9,5	+	331	127	20	331	99	35
Metamidofos	4,4	+	142	94	15	142	12	15
Metomil	5,4	+	163	88	15	163	106	15
Metribuzin	18,7	+	215	187	20	215	171	20
Parationa-metílica	14,1	+	281	264	10	281	138	10
Pendimentalina	12,6	+	282	91	35	282	148	35
Pirimifos-metil	11	+	306	164	20	306	108	20
Pirazofos	11	+	374	222	20	374	194	20
Pirimicarbe	8,2	+	239	72	20	239	182	20
Procloraz	10,7	+	376	308	20	376	70	20
Tebuconazol	10,6	+	308	70	35	308	125	30

Continuação tabela 7

Compostos	t_R (min)	Modo ionização (+/-)	Íon precursor (m/z)	1ª transição Quantificação		2ª transição Confirmação		
				Íon produto (m/z)	Energi a de colisã o (eV)	Íon precurso r (m/z)	Íon produto (m/z)	Energi a de colisã o (eV)
Triadimefom	9,7	+	294	69	20	294	197	20
Triadimenol	9,9	+	296	70	35	296	99	20

Conforme a Tabela 7 pode-se observar que em alguns agroquímicos as duas transições foram selecionadas. A quantificação dos agroquímicos foi determinada pela transição mais intensa, e a confirmação destes compostos foi realizada pela segunda transição. A quantificação juntamente com a confirmação gera uma confiabilidade ao método, pois é difícil apresentar dois compostos com os mesmos fragmentos, o analisador triplo-quadrupolo é muito eficiente nestes casos, por quantificar e qualificar com rapidez os analitos, mesmo em baixas concentrações.

5.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS

Na Tabela 8 faz-se uma comparação entre as etapas do método QuEChERS modificado, realizado neste trabalho, em relação ao QuEChERS original empregados por ANASTASSIADES et al. (2003). Avaliando os dois métodos, é possível afirmar que o método modificado utiliza uma quantidade menor de reagentes, dentre eles o padrão interno e o adsorvente PSA. Neste trabalho teve uma redução de 4% em cada extração em termos de custos, em relação a metodologia aplicada por ANASTASSIADES e colaboradores. A Figura 4 apresenta as etapas envolvidas no procedimento para o método QuEChERS modificado utilizado nesse trabalho.

Tabela 5. Comparação método QuEChERS original e método proposto

QuEChERS	ANASTASSIADES	
	et al. 2003	Neste trabalho
Amostra	10,0 g	10,0 g
Acetonitrila	10,0 mL	10,0 mL
Agitação	60 s	60 s
MgSO ₄	4,0 g	-
NaSO ₄	-	3,0 g
NaCl	1,0 g	-
Acetato de sódio	-	1,7 g
Citrato de sódio	-	-
Hcitrato de sódio	-	0,5 g
Agitação	60 s	60 s
Padrão interno	Tirfenilfosfato	-
Agitação	30 s	-
Centrifugação	5 min 5000 rpm	8 min 4000 rpm
Alíquota do extrato	1,0 mL	1,0 mL
PSA	25,0 mg	-
MgSO ₄	150,0 mg	-
Centrifugação	1min 6000 rpm	-
Análise	GC/MS	LC-MS/MS

Neste trabalho não foi realizado uma avaliação entre os métodos através das extrações, somente foi realizado um comparativo dos reagentes e quantidades utilizadas em cada método. Desta forma, pode-se avaliar que o método proposto utiliza uma quantidade menor de reagentes, além de também dispensar um menor o tempo de extração.



Figura 2. Esquema do procedimento realizado para o método QuEChERS modificado

Kanrsa et al., (2013) com a aplicação do método QuEChERS modificado para a determinação de resíduo de carbaril em amostras de vegetais, relatam a obtenção de recuperações satisfatórias em torno de 70 a 120%. Wang et al., (2013) determinaram 51 resíduos de pesticidas carabamatos em vegetais, por cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas. Cunha e Fernandes (2013) avaliaram resíduo de bisfenol A e bisfenol B em vegetais enlatados e frutas por cromatografia gasosa e espectrometria de massa utilizando QuEChERS. Yang et al., (2014) validaram o método de extração, QuEChERS modificado, para a detecção de metomil, tiametoxam, acetamiprido, carbofurano, fostiazato, metalaxil, azoxistrobin, dietofencarbe, propiconazol e difeconazol em alimentação infantil. Jovanov et al., (2014) desenvolveram um método multirresíduo utilizando

QuEChERS modificado, para determinar resíduo de inseticidas em licor de mel. Todos estes trabalhos citados obtiveram recuperações satisfatórias, apresentando valores entre 70 a 120%.

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PROPOSTO

Neste trabalho foi realizada a validação do método QuEChERS proposto para análise de agroquímicos em farinha de trigo integral, conforme a Figura 5.

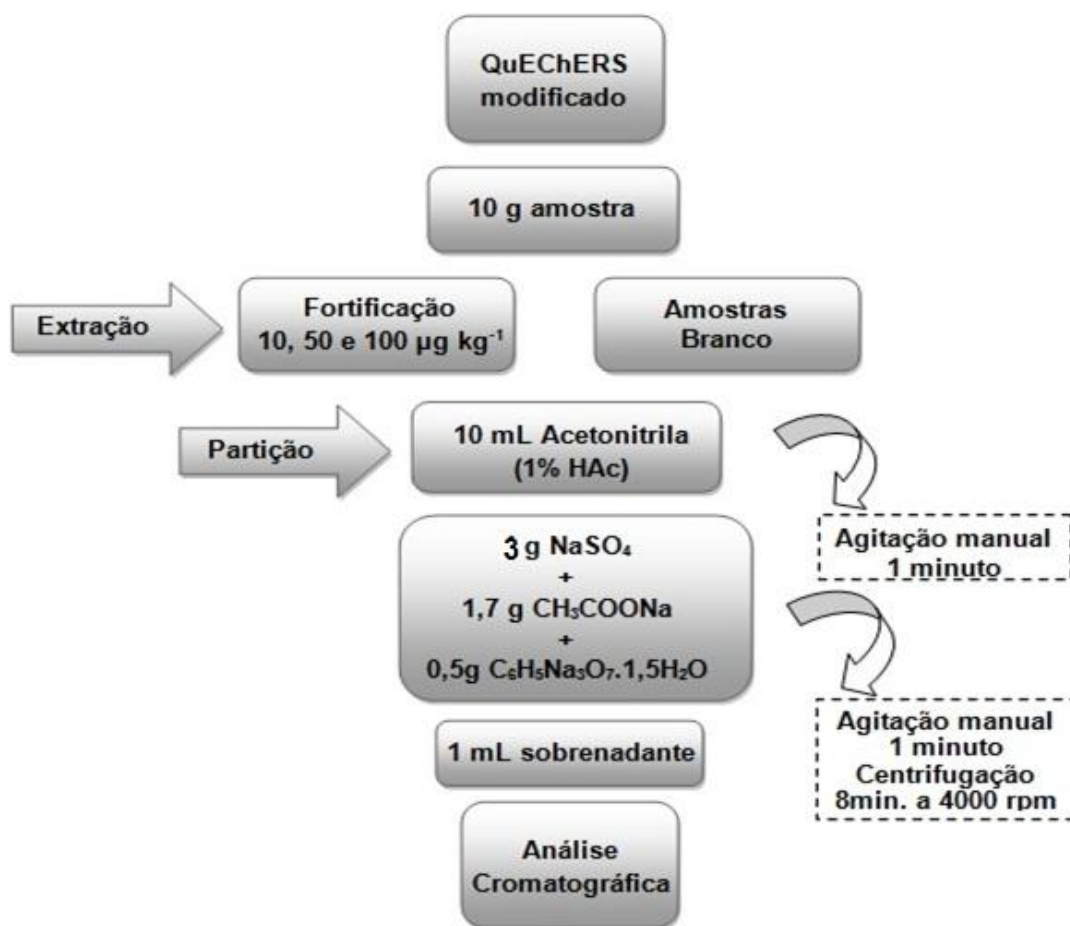


Figura 3. Representação do método QuEChERS modificado utilizado para a extração de agroquímicos nas amostras de farinha de trigo integral

Através da avaliação dos cromatogramas obtidos, avaliou-se a seletividade do método, conforme as Figuras 6, 7 e 8. Os resultados demonstram que a ausência de interferentes com mesmos íons de quantificação e identificação no tempo de

retenção dos compostos avaliados em amostras “branco” analisadas por LC-MS/MS identifica uma elevada seletividade. Além disso, pode-se observar que o cromatograma do diluente (fase móvel), figura 7, não apresenta picos assimétricos, garantindo a seletividade.

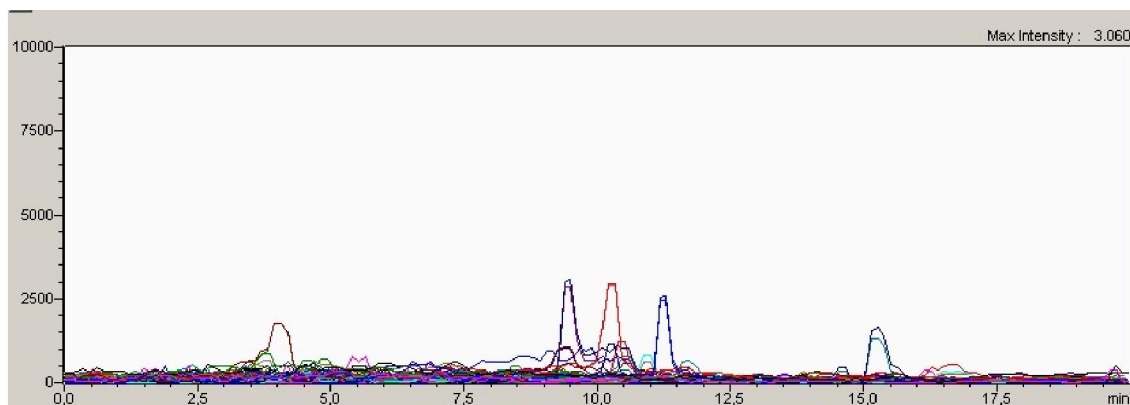


Figura 4. Cromatograma obtido por LC-MS/MS das amostras branco da farinha de trigo integral.

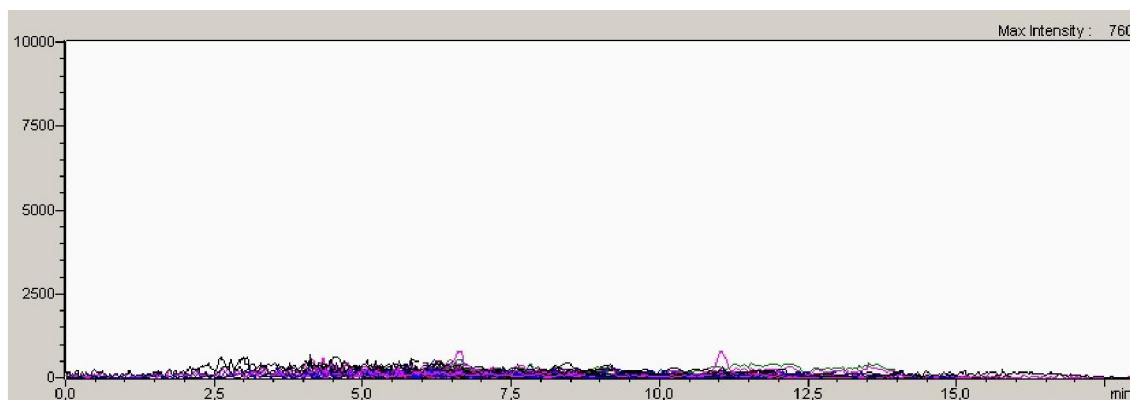


Figura 5. Cromatograma obtido por LC-MS/MS do diluente utilizado nos ensaios.

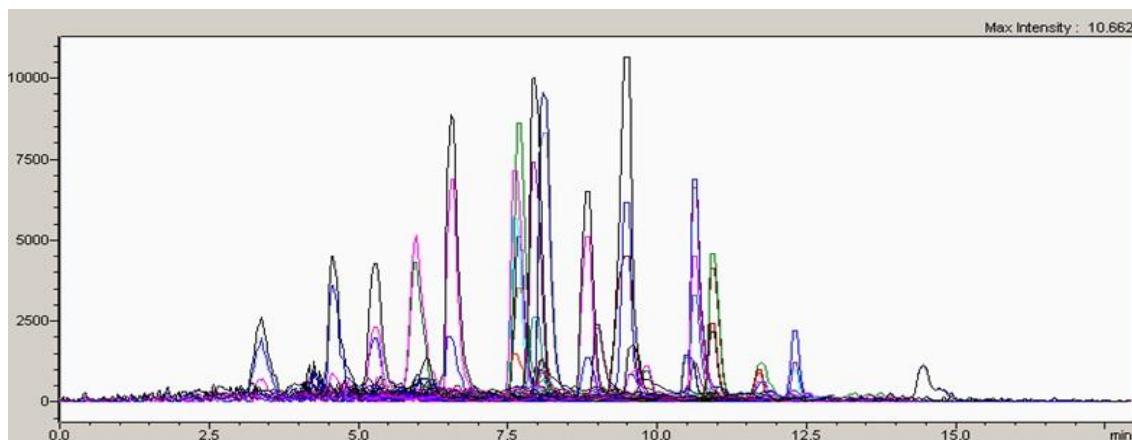


Figura 6. Cromatograma obtido por LC-MS/MS das amostras fortificadas na concentração $10 \mu\text{gkg}^{-1}$ na farinha de trigo integral

O cromatograma das amostras branco apresentaram traços dos compostos Foxim, Pirimifós-metil, Tebuconazol e Triamedinol.

Os valores de coeficiente de determinação (r^2) para as equações das curvas analíticas em solvente (acetonitrila) e nos extratos das amostras de farinha de trigo integral foram determinados a partir das soluções de concentrações $1,0;5,0;10;50;100;200 \mu\text{gL}^{-1}$ e estão relacionados na Tabela 9.

Tabela 6. Coeficientes de determinação r^2 das curvas analíticas a partir das avaliações dos agroquímicos em farinha de trigo integral analisados por LC-MS/MS.

Pesticida	Coeficiente de determinação r^2		Equação da reta	
	solvente	matriz	solvente	matriz
2,4 – D	0,9984	0,9728	43644x +2024	66682x+1685
Acetamiprido	0,9981	0,9977	82683x +16990	65983x-42463
Azoxistrobina	0,9989	0,9975	69555x +13236	32615x-12413
Bendiocarbe	0,9936	0,9955	64891x +21479	62646x-41742
Bentazon	0,9993	0,9927	8259x +1757	7133x -1750
Bioaletrina	0,9991	0,9926	12892x +2017	10580x +3690
Bromoxinil	0,9949	0,9947	838x +1565	805x -1925
Carbendazim	0,9982	0,9981	54900x - 13845	40482x-26992
Carbofurano	0,9981	0,9902	59064x +12949	44121x-12570
Carboxine	0,9942	0,9973	115458x +40268	95382x-19324
Cartap Hydrochloride	0,9967	0,9926	33198x + 6864	30198x + 9864
Ciproconazol	0,9986	0,9903	73619x + 3039	65619x + 4567
Clorpirifos	0,9979	0,9996	14065x +1797	3788x +1119
Dazomete	0,9985	0,9973	2800x - 1075	9676x-6788
Deltametrina	0,9903	0,9889	2550x -45	1491x +1313
Diclofope	0,9967	0,9965	7108x + 4111	2733x-3688
Diclorvos	0,9950	0,9879	2232x +3703	2702x-5203
Diuron	0,9968	0,9905	31632x + 5080	20427x-4285
Etil Paraquat	0,9975	0,9897	1892x +6789	2309x+8907
Fenotrina	0,9919	0,9956	16157x -1954	7923x - 2672
Fenitrotiona	0,9978	0,9976	4352x -7890	5674x+1094
Forato	0,9958	0,9775	2308x +2859	1634x-3630
Foxim	0,9951	0,9981	67376x +24654	27856x -11727
Imidacloprido	0,9963	0,9985	9737x +6114	13619x-2469
Malationa	0,9980	0,9943	54078x +20117	32475x-26623
Metamidofos	0,9954	0,9955	33573x + 8973	7505x-5926
Metomil	0,9943	0,9993	31019x -954	37379x-3262
Metribuzin	0,9965	0,9967	9371x +3547	4990x-3045
Parationa-metflica	0,9985	0,9907	11713x +1004	13789x+4352
Pendimentalina	0,9976	0,9879	819x +701	248x+2956
Pirimifos-metil	0,9969	0,9979	50786x +11994	17215x+6104
Pirazofos	0,9986	0,9852	24285x +3315	24296x -2716
Pirimicarbe	0,9940	0,9964	93371x + 32351	73242x-50846
Procloraz	0,9967	0,9951	32021x +8906	34908x-1315
Tebuconazol	0,9985	0,9996	18496x +4249	19548x-52
Triadimefom	0,9929	0,9879	13057x +3100	20040x+3120
Triadimenol	0,9988	0,9959	12356x + 1306	18354x-1938

Através dos dados obtidos para a construção das curvas analíticas, e análise das equações das retas no LC-MS/MS é possível concluir que o modelo de regressão linear com adição de padrão na matriz analisada, é adequado para as determinações analíticas em estudo. Os apresentaram r^2 de no mínimo 0,99, sendo que 65% apresentaram este parâmetro acima de 0,995. Desta forma, a correlação está de acordo com as orientações da ANVISA que recomenda r^2 igual a 0,99 e do INMETRO que recomenda r acima de 0,90. Todos os agroquímicos analisados apresentaram faixa linear entre 1,0 a 200 μgL^{-1} .

Na Tabela 10 são demonstrados os limites de detecção (LOD_i) e quantificação (LOQ_i) do instrumento, apresentados em μgL^{-1} , e os limites de quantificação (LOQ_m) dos métodos, apresentados em μgkg^{-1} , para os agroquímicos estudados.

Tabela 7. Limites de detecção e quantificação instrumental e do método.

Pesticida	LOD _i µg L ⁻¹	LOQ _i µg L ⁻¹	LOQ _m µg kg ⁻¹	LMR µg kg ⁻¹ ANVISA
2,4 – D	2,41	7,89	10,00	200
Acetamiprido	0,01	0,03	10,00	1000
Azoxistrobina	0,04	0,11	10,00	50
Bendiocarbe	0,03	0,09	10,00	-
Bentazon	0,06	0,18	10,00	10
Bioaletrina	0,32	0,96	10,00	-
Bromoxinil	0,80	2,43	10,00	-
Carbendazim	0,54	1,63	10,00	100
Carbofurano	0,02	0,05	10,00	100
Carboxine	0,03	0,09	10,00	200
Cartap Hydrochloride	0,27	0,82	10,00	10
Ciproconazol	2,33	8,07	10,00	50
Clorpirifos	0,07	0,22	10,00	200
Dazomete	2,60	7,96	10,00	-
Deltametrina	0,48	1,44	10,00	1000
Diclofope	0,18	0,56	10,00	20
Diclorvos	0,20	0,61	10,00	-
Diuron	0,06	0,18	10,00	50
Etil Paraquat	3,57	9,97	10,00	-
Fenotrina	0,19	0,57	10,00	-
Fenitrotiona	2,98	9,67	10,00	1000
Forato	0,07	0,21	10,00	50
Foxim	0,03	0,08	10,00	-
Imidacloprido	0,85	2,57	10,00	500
Malationa	0,02	0,07	10,00	8000
Metamidofos	0,36	1,09	10,00	100
Metomil	0,59	1,78	10,00	100
Metribuzin	0,16	0,48	10,00	100
Parationa-metífica	1,67	4,53	10,00	100
Pendimentalina	1,73	5,25	10,00	100
Pirimifos-metil	0,01	0,03	10,00	10000
Pirazofos	0,05	0,15	10,00	20
Pirimicarbe	0,02	0,05	10,00	50
Procloraz	0,03	0,10	10,00	500
Tebuconazol	0,03	0,08	10,00	100
Triadimefom	0,05	0,15	10,00	100
Triadimenol	0,24	0,72	10,00	500

O limite de quantificação do método QuEChERS modificado apresentou valores iguais e/ou menores que os limites máximos de resíduos estabelecidos pela legislação brasileira (ANVISA). Avaliando os resultados observa-se que todos os compostos foram detectados na faixa de concentração entre 1,0 a 200 µg L⁻¹. Desta

forma, os valores estimados de LOD_i e LOQ_i para todos os compostos foram de $0,01 \mu\text{gL}^{-1}$ a $9,97 \mu\text{gL}^{-1}$. Os valores de LOQ_m , foram $10 \mu\text{gL}^{-1}$, este valor 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%.

Conforme SANCO, (2007), para avaliar a precisão e a exatidão em validação de métodos analíticos empregados para análise de resíduos de pesticidas em alimentos, são estabelecidos percentuais de recuperação na faixa de 70 a 120%, com valores de RSD inferiores a 20%.

A precisão foi avaliada em função da repetitividade e da precisão intermediária baseada nas recomendações da ANVISA, como apresenta a Tabela 11.

Tabela 8. Percentuais de recuperação e desvio padrão relativo (RSD) para a precisão intermediária

Compostos	Níveis de fortificação (μkg^{-1})					
	10,0		50,0		100,0	
	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
2,4 – D	73,0	40,5	50,8	26,7	56,9	35,3
Acetamiprido	89,7	9,2	94,4	11,2	100,4	12,3
Azoxistrobina	103,8	18,8	105,0	18,8	117,7	18,7
Bendiocarbe	87,6	14,4	108,6	17,5	99,0	17,4
Bentazon	84,6	17,4	99,7	12,1	104,2	8,3
Bioaletrina	83,0	18,0	100,7	18,2	98,6	17,1
Bromoxinil	102,0	12,8	106,3	11,3	103,7	8,7
Carbendazim	88,2	7,8	102,8	9,0	106,0	8,1
Carbofurano	87,5	14,9	97,0	17,7	95,8	16,1
Carboxine	88,6	11,9	108,6	12,1	111,3	15,8
Cartap Hydrochloride	50,9	25,6	54,2	26,7	56,1	33,7
Ciproconazol	45,9	34,6	55,8	18,7	55,9	19,8
Clorpirifos	95,4	17,2	113,0	19,3	101,4	19,0
Dazomete	76,6	11,3	83,2	11,9	94,7	8,2
Deltametrina	89,5	19,2	102,3	19,3	95,0	19,7
Diclofope	112,4	18,0	116,7	17,6	103,9	19,7
Diclorvos	82,0	17,2	76,3	21,8	79,8	19,0
Diuron	90,6	18,2	106,1	11,8	103,9	11,3
Etil Paraquat	34,9	26,7	43,8	29,0	50,9	36,7
Fenotrina	86,8	19,4	99,2	17,2	95,1	19,6
Fenitrotiona	55,6	42,3	65,0	38,0	56,7	47,6
Forato	85,5	17,8	103,1	16,4	101,0	15,0
Foxim	86,1	19,3	87,2	19,0	113,2	17,3
Imidacloprido	90,9	10,9	103,4	11,7	106,2	17,2
Malationa	89,1	17,7	91,6	18,3	104,5	15,7
Metamidofos	93,7	19,6	93,0	8,5	99,1	6,6
Metomil	91,7	9,7	96,4	7,6	103,5	5,3
Metribuzin	88,1	16,6	101,0	10,7	111,7	13,4
Parationa-metílica	66,7	43,0	59,7	31,5	67,0	35,9
Pendimentalina	109,8	17,7	121,5	19,6	119,5	16,4
Pirimifos-metil	96,6	17,6	96,8	19,3	84,1	15,3
Pirazofos	94,9	15,3	91,4	18,0	102,0	19,7
Pirimicarbe	103,5	17,4	104,4	12,8	106,8	15,9
Procloraz	92,0	11,9	87,7	16,5	109,6	9,4
Tebuconazol	107,5	18,8	109,2	19,9	111,2	15,7
Triadimefom	88,5	16,1	93,6	17,7	111,3	16,5
Triadimenol	89,3	18,0	101,2	13,7	110,8	11,0

A Tabela 11 mostra que 84% dos agroquímicos analisados na farinha de trigo integral apresentaram percentuais de recuperação para a precisão intermediária entre 70-120% ($RSD \leq 20\%$). O composto Diclorvos não apresentou RSD satisfatório na concentração de $50 \mu\text{gkg}^{-1}$, (21,8%), e o Pendimetalin, na concentração de $50 \mu\text{gkg}^{-1}$, teve percentual de recuperação de 121,5%, ficando fora da faixa recomendada. Os agroquímicos 2,4-D, Cartap Hidrocloride, Ciproconazol, Etil Paraquat, Fenitrotiona e Parationa-metílica, não foram quantificados com segurança nos níveis de fortificação avaliados, pois apresentaram valores médios de recuperação fora da faixa permitida para análise de resíduos (70-120%) e precisão intermediária, acima de 20%. Os pesticidas mais utilizados em campo para a cultura de trigo são o Pirimifos-metil e Deltametrina, os quais foram quantificados com segurança.

A Tabela 12 são apresentadas as recuperações médias ($n=6$) percentuais, o RSD% para os 37 agroquímicos em amostra de farinha de trigo integral fortificada nos níveis 10, 50 e $100 \mu\text{gkg}^{-1}$, extraídos pelo método QuEChERS modificado.

As recuperações foram calculadas utilizando as curvas analíticas dos extratos da matriz. As recuperações foram avaliadas conforme validação de métodos cromatográficos, onde devem estar entre 70 e 120% (PRESTES, 2011).

Tabela 9. Percentuais de recuperação e desvio padrão relativo para a repetitividade do método de extração de agroquímicos em farinha de trigo integral

Compostos	Níveis de fortificação (μgkg^{-1})					
	10,0		50,0		100,0	
	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
2,4 – D	43,7	39,0	48,0	29,4	44,0	26,8
Acetamiprido	85,0	12,7	98,9	10,3	104,9	8,1
Azoxistrobina	98,8	25,6	112,9	8,8	108,8	24,0
Bendiocarbe	85,6	14,1	106,5	9,5	103,8	10,0
Bentazon	80,6	12,4	104,0	7,2	110,3	4,1
Bioaletrina	80,6	12,4	104,0	7,2	110,3	4,1
Bromoxinil	102,0	10,7	107,9	10,5	104,4	7,8
Carbendazim	86,2	7,7	102,5	5,6	106,7	4,0
Carbofurano	78,3	5,7	99,8	10,6	100,9	11,7
Carboxine	84,1	7,4	104,9	9,6	105,1	8,2
Cartap						
Hidrochloride	49,9	32,7	57,3	46,1	54,2	43,0
Ciproconazol	40,0	54,6	55,7	19,4	56,9	18,2
Clorpirifos	91,6	14,9	116,5	8,5	88,5	2,0
Dazomete	71,8	7,2	87,1	11,6	95,8	6,3
Deltametrina	85,8	17,9	110,0	16,5	96,0	27,3
Diclofope	115,7	16,3	111,3	17,8	94,1	17,5
Diclorvos	80,7	19,1	60,6	1,4	72,2	15,4
Diuron	87,0	13,2	108,3	6,4	103,8	6,9
Etil Paraquat	34,0	25,9	48,0	31,7	49,6	36,0
Fenotrina	94,3	16,8	113,8	8,2	107,3	9,9
Fenitrotiona	54,0	46,8	63,0	49,9	55,8	51,7
Forato	83,8	12,6	114,6	17,3	102,3	19,9
Foxim	83,2	18,1	82,5	14,6	121,5	12,1
Imidacloprido	88,5	6,3	101,2	5,4	110,7	6,5
Malationa	92,7	11,6	83,3	13,9	104,5	10,7
Metamidofos	92,7	11,6	83,3	13,9	104,5	10,7
Metomil	91,3	11,3	100,3	7,6	106,7	6,2
Metribuzin	82,1	11,9	106,1	9,7	110,9	14,3
Parationa-metílica	66,6	31,1	62,8	27,5	64,7	33,1
Pendimentalina	117,8	13,8	91,3	14,3	113,8	16,4
Pirimifos-metil	86,3	15,2	87,2	14,1	85,6	18,5
Pirazofos	98,5	11,2	90,0	9,8	101,2	15,0
Pirimicarbe	105,0	17,2	109,2	9,4	109,4	14,4
Procloraz	94,2	17,3	97,4	3,9	111,4	11,8
Tebuconazol	93,1	19,8	118,8	10,9	114,3	12,5
Triadimefom	87,9	10,9	101,0	12,8	110,4	11,0
Triadimenol	87,8	18,0	108,8	8,6	116,0	10,8

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

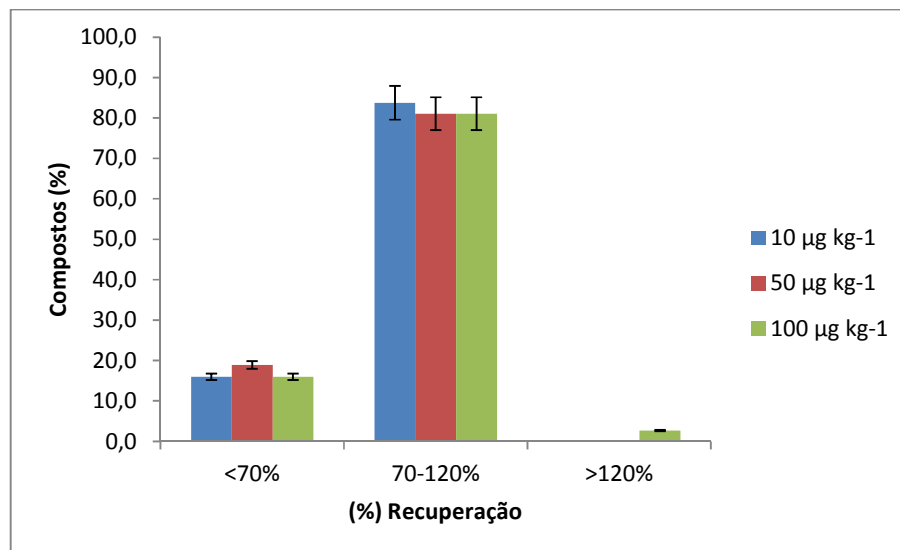


Figura 7. Percentual de agroquímicos em farinha de trigo integral fortificadas e extraídos pelo método QuEChERS modificado, que apresentaram faixas de recuperação de <70%, 70-120% e >120%. As barras de erros indicam valores de RSD.

A Tabela 12 e a Figura 9 podem ser observados que 84% dos agroquímicos analisados na farinha de trigo integral apresentaram percentuais de recuperação entre 70-120% (RSD \leq 20%). O composto Azoxistrobina nas concentrações de 10 μgkg^{-1} e 100 μgkg^{-1} apresentou RSD acima do permitido, respectivamente 25,6% e 24,10%. Deltamitrina na concentração de 100 μgkg^{-1} apresentou RSD 27,3%, acima do estipulado. Diclorvos não apresentou recuperação satisfatória na concentração de 50 μgkg^{-1} , apresentando 60,6% de recuperação, e o Foxim, na concentração de 100 μgkg^{-1} , teve percentual de recuperação de 121,5, ficando fora da faixa recomendada. Os agroquímicos 2,4-D, Cartap Hidrocloride, Ciproconazol, Etil Paraquat, Fenitrotiona e Parationa-metílica, não foram quantificados com segurança nos níveis de fortificação avaliados, pois apresentaram valores médios de recuperação fora da faixa permitida para análise de resíduos (70-120%) e RSD \geq 20%.

Jovanov et al., (2014) obtiveram recuperações abaixo de 70% para o composto Tiametoxam, em amostras de licor de mel. Restrepo et al., em 2014, avaliaram resíduos de pesticidas em tomate, com extração pelo método QuEChERS por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, e para esta matriz apresentou RSD 37,7% para o composto Cipermetrin, e RSD 39,9% para a Tolulfluanide. As recuperações para esta matriz para alguns compostos também ficaram abaixo ou acima do limite permitido (70-120%), apresentaram

respectivamente 122,9% para Carbofurano, 23,8% para Clorotalonil, Cipermetrin 223,2%, Diclofope 65,9, Malationa 129,3% e Triamedifon 154,9%. Furlani et al., em 2011, avaliaram resíduos de pesticidas em caldo de cana, usando método QuEChERS, por cromatografia gasosa com detector captura de elétrons, para o composto endosulfan apresentou recuperações em torno de 65%, valor este abaixo do esperado. Walorczyk (2014), validou um método multirresíduo usando QuEChERS, em matriz de groselha, por cromatografia gasosa, obteve recuperações abaixo do permitido de 70%, em torno de 68% para os compostos clorotalonil, diclofluanida, tolifluanida e capatan. Lehotay et al., (2010) realizou uma comparação de métodos modificados usando QuEChERS, em amostras de frutas e vegetais, as recuperações e RSD para os compostos Clorotalonil, Folpete, Pimetrozine, Toliifluanide, apresentaram respectivamente valores abaixo de 70%, e RSD acima de 20%.

Em análises cromatográficas a taxa de recuperação em amostras de alimentos, nem sempre é aceitável devido aos efeitos da matriz na análise, conforme mostram a Tabela 13 e a Figura 10. A quantificação dos agroquímicos pode ser afetada pela presença de compostos co-extraídos da matriz.

Valores acima de 10% podem ser significativos e deve ser determinado o efeito matriz com muita atenção. Sugere-se uma avaliação exata do efeito matriz, evitando estimativas errôneas dos teores dos analitos, e com isso ser também mais confiável. Desta forma, para reduzir o efeito, é recomendável o uso da curva analítica preparada em extratos da matriz isenta de agrotóxicos (RIBANI et al., 2004).

Tabela 10. Efeito Matriz dos agroquímicos em farinha de trigo integral analisados por LC-MS/MS

Compostos	Efeito Matriz (%)		
	10 ppb	50 ppb	100 ppb
2,4 – D	-16,3	-14,3	-15
Acetamiprido	-19,6	-20,9	-20,4
Azoxistrobina	1,8	-1,3	-0,8
Bendiocarbe	-23,7	-12,9	-15,7
Bentazon	43,9	34,5	42,3
Bioaletrina	4,7	1	2,2
Bromoxinil	-10,9	-6,1	-5,3
Carbendazim	-23,1	-13,2	-11,7
Carbofurano	15,3	11,7	12,9
Carboxine	-38,4	-32,8	-33,2
Cartap Hydrochloride	-67,3	-54,2	-14,3
Ciproconazol	3,4	0,9	0,5
Clorpirifos	45,8	44,2	43,3
Dazomete	-14,3	-6,9	-7,9
Deltametrina	19,4	16,7	17,2
Diclofope	31,5	33,6	31,4
Diclorvos	40,8	34,2	35,2
Diuron	-34,8	-34,6	-33,6
Etil Paraquat	45,9	73,9	65,8
Fenotrina	21,9	23,4	22,2
Fenitrotiona	10,5	11,2	11,11
Forato	-12,3	-8,9	-9,9
Foxim	-38,0	-27,0	-25,0
Imidacloprido	-14,5	-13,8	-12,5
Malationa	17,9	12,3	16,9
Metamidofos	-57,8	-48,7	-49,2
Metomil	24,9	21,4	19,9
Metribuzin	-17,8	-12,5	-13,2
Parationa-metilica	9,7	6,9	9,25
Pendimentalina	28,7	23,9	22,9
Pirimifos-metil	-12,8	-11	-11,4
Pirazofos	-23,4	-12,3	-21,5
Pirimicarbe	5,9	2,1	0,9
Procloraz	5,9	3,4	2,8
Tebuconazol	7,1	5,4	5,6
Triadimefom	-27,1	-23,9	-23,8
Triadimenol	-12,5	-10,4	-12,8

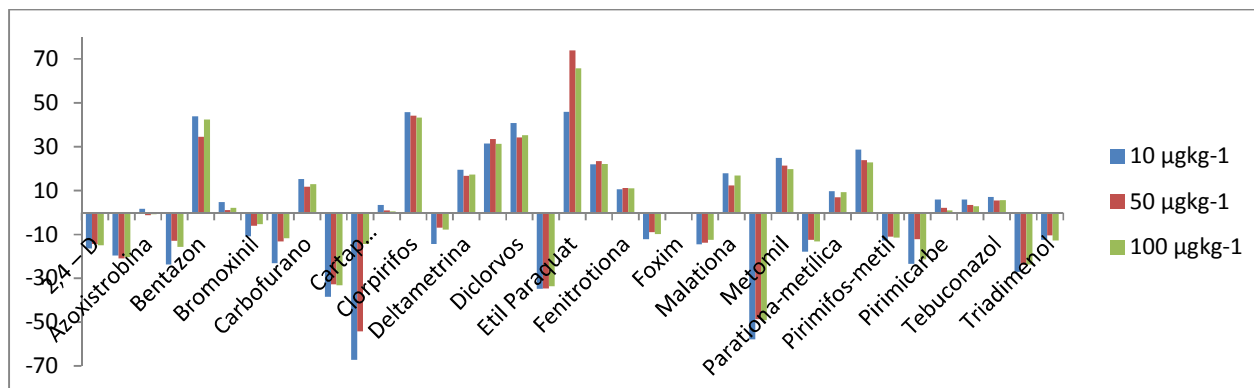


Figura 8. Percentual de efeito matriz em agroquímicos avaliados em farinha de trigo integral fortificadas e extraídos pelo método QuEChERS modificado.

Dos resultados obtidos neste trabalho, 75% dos agroquímicos apresentaram valores acima de 10%. A quantificação dos compostos pode ser afetada pela presença de composto co-extraídos da matriz. Desta forma, para redução do efeito matriz é recomendável o uso de curva analítica preparada em extratos da matriz isenta de agrotóxicos (RIBANI et al., 2004).

Em amostras de tomates, avaliadas por Restrepo et al., (2014) através de extração pelo método QuEChERS e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, os resultados de efeito matriz foram significativos apresentado acima de 10%, concluindo que a matriz avaliada é indicada a realização da etapa de *clean up*. Prestes (2011) apresentou em seu estudo valores adequados de efeito matriz em amostras de alimentos de origem animal utilizando LC-MS/MS para a determinação de resíduos de pesticidas. Sherol (2010), avaliou o efeito matriz em amostras de cebola, utilizando método QuEChERS modificado e MSPD com LC-ESI-MS/MS, para a maioria dos compostos avaliados, não foi observado efeito matriz significativo, somente dois compostos, dimetoato e azoxistrobina apresentaram efeito matriz na faixa de 60 e 110%. Kolberg (2008), avaliou o efeito matriz em amostras de farinha de trigo, farelo e pão, utilizando método multirresíduo empregando GC-MS, neste estudo o efeito matriz apresentou valores onde demonstra um aumento de sinal para a grande maioria dos compostos, e para a matriz pão apresentou alguns valores de efeito negativo.

Para avaliação da robustez, o efeito da variação para analito foi avaliado e estão representados na Tabela 14. O método apresentou robustez variável para os

parâmetros testados, a temperatura da coluna e vazão da fase móvel foram os fatores que mais influenciam na resposta.

Tabela 11. Valores de efeito em porcentagem para cada analito.

Composto	Variável						
	A/a	B/b	C/c	D/d	E/e	F/f	G/g
2,4-D	16,6	14,3	10,0	40,5	26,8	29,4	19,3
acetamiprid	11,2	12,7	12,3	9,2	8,1	10,3	16,5
azoxistrobin	14,9	8,2	8,2	18,8	24,0	8,8	19,9
bendiocarb	17,5	14,1	17,4	14,4	10,0	47,6	11,9
bentazon	3,4	12,4	8,3	17,4	4,1	7,2	34,6
bioaletrin	18,2	8,1	17,1	18,0	10,7	14,3	23,8
bromoximil	11,3	10,7	8,7	12,8	7,8	10,5	34,2
carbadazin	10,6	7,7	8,1	7,8	4,0	27,5	12,3
carbofuran	17,7	5,7	16,1	14,9	11,7	36,7	32,1
carboxine	12,1	7,4	15,8	11,9	8,2	19,0	34,5
cartap	9,7	7,8	4,0	14,4	4,5	49,9	40,6
clorpirifos	19,3	14,9	19,0	17,2	2,0	8,5	28,7
cyproconazol	6,2	5,6	19,8	4,6	18,2	26,7	15,9
dazomet	3,3	7,2	8,2	11,3	6,3	25,6	24,0
deltametrin	19,3	17,9	19,7	19,2	27,3	16,5	38,0
diclofop	17,6	16,3	19,7	18,0	17,5	17,8	46,8
diclorvoz	14,4	14,3	11,7	17,2	15,4	11,4	47,6
diurion	9,6	13,2	11,3	18,2	6,9	43,0	34,0
fenitration	18,0	16,8	17,6	12,3	11,7	49,9	42,3
imidaclopd	8,1	6,3	17,2	10,9	6,5	16,5	51,7
malation	18,3	10,5	26,8	17,7	10,7	13,9	17,3
metamidofos	9,5	18,2	6,9	6,2	5,3	31,7	34,5
metonil	6,5	11,3	5,3	9,7	6,2	33,7	15,4
metribuzin	10,7	11,9	13,4	16,6	14,3	33,1	19,8
paraquat	19,0	15,9	16,7	16,7	16,0	31,7	36,0
paration	10,5	13,5	15,9	13,0	33,1	26,7	33,1
pendimentalin	19,6	13,8	16,4	17,7	16,4	14,3	26,7
phenotrin	17,2	16,8	19,6	19,4	9,9	8,2	36,7
phorate	16,4	12,6	15,0	17,8	19,9	17,3	25,9
phoxin	19,0	7,2	17,3	19,3	12,1	14,6	29,0
pirasofos	18,0	11,2	19,7	15,3	15,0	29,8	27,6
pirimicarb	6,3	17,2	15,9	17,4	14,4	32,7	26,8
pirimifos	19,3	15,2	15,3	17,6	18,5	14,1	34,5
procloraz	16,5	8,5	9,4	11,9	11,8	23,9	25,9
tebuconazol	19,9	19,8	15,7	18,8	12,5	10,9	26,8
triamedifon	11,9	16,5	11,8	16,1	11,0	12,8	34,5
triadimenol	3,9	18,0	11,0	18,0	10,8	54,6	19,8

marca de solvente (A/a), fase móvel (formiato) (B/b), tempo de centrifugação pós extração (C/c), fase móvel (ácido) (D/d), agitação na extração (E/e), temperatura de coluna (F/f) e vazão fase móvel (G/g)

Para a aplicação do método foram analisadas amostras de farinha de trigo integral de dois moinhos localizados na Serra Gaúcha do Rio Grande do Sul. As farinhas de trigo integral foram adquiridas de duas localidades diferentes para cada moinho, conforme descrito no item 4. Na Tabela 15 são apresentados os resultados.

Tabela 12. Análise de resíduos de agroquímicos em amostras de farinha de trigo comerciais

Compostos	Moinho 1 - amostra 1 μgkg^{-1}	Moinho 1- amostra 2 μgkg^{-1}	Moinho 2- amostra 1 μgkg^{-1}	Moinho 2- amostra 2 μgkg^{-1}	LMR μgkg^{-1} ANVISA	LMR μgkg^{-1} CA	LMR μgkg^{-1} UE
2,4 – D	nd	nd	nd	nd	200	2000	50
Acetamiprido	nd	nd	nd	nd	1000	-	30
Azoxistrobina	nd	nd	nd	nd	50	200	300
Bendiocarbe	nd	nd	nd	nd	-	-	-
Bentazon	nd	nd	nd	nd	10	100	100
Bioaletrina	nd	nd	nd	nd	-	-	-
Bromoxinil	nd	nd	nd	nd	-	-	-
Carbendazim	nd	2,7±0,47	nd	nd	100	50	100
Carbofurano	nd	nd	nd	nd	100	-	20
Carboxine	nd	nd	nd	nd	200	-	10
Cartap Hidrochloride	nd	nd	nd	nd	10	-	-
Ciproconazol	nd	nd	nd	nd	50	-	100
Clorpirifos	nd	nd	56,0±10,0	0,95±0,16	200	500	-
Dazomete	nd	nd	nd	nd	-	-	-
Deltametrina	10,8±2,5	5,5±1,0	20,2±2,2	nd	1000	2000	2000
Diclofope	nd	nd	nd	nd	20	-	-
Diclorvos	nd	nd	nd	nd	-	10000	10
Diuron	nd	nd	nd	nd	50	-	200
Etil Paraquat	nd	nd	nd	nd	-	-	-
Fenotrina	nd	nd	nd	nd	-	-	50
Fenitrotiona	nd	nd	nd	nd	1000	6000	-
Forato	nd	nd	nd	nd	50	-	-
Foxim	nd	nd	nd	nd	-	-	10
Imidacloprido	1,4±0,4	1,4±0,06	nd	nd	500	30	100
Malationa	3,5±0,2	nd	4,76±0,02	5,0±0,2	8000	10000	8000
Metamidofos	nd	nd	nd	nd	100	-	-
Metomil	nd	nd	nd	nd	100	2000	20
Metribuzin	nd	nd	nd	nd	100	-	100
Parationa-metífica	nd	nd	nd	nd	100	-	-
Pendimentalina	nd	nd	16,6±2,2	24,9±0,5	100	-	-
Pirimifos-metil	678,7±64,8	491,9±41,7	36,9±1,7	151,5±21,3	10000	-	5000
Pirazofos	nd	nd	nd	nd	20	-	50
Pirimicarbe	nd	nd	nd	nd	50	-	500
Procloraz	nd	nd	nd	nd	500	-	500
Tebuconazol	nd	nd	nd	nd	100	150	200
Triadimefom	nd	nd	1,7±0,4	2,2±0,2	100	-	200
Triadimenol	8,0±2,0	nd	8,5±0,45	20,9±1,6	500	-	-

Concentração \pm desvio padrão
nd = não detectado

Através da Tabela 15, observa-se que todos os agroquímicos detectados nas farinhas de trigo integrais, apresentaram valores abaixo do LMR estabelecido pela

ANVISA, *Codex Alimentarius* e União Européia. Além disso, os pesticidas detectados nas amostras avaliadas foram quantificados com segurança no estudo de validação do método aplicado.

Os compostos mais comuns para aplicação na cultura trigo são Pirimifós-metil e Deltametrina, e na Tabela 15 confirma esse uso. Esses compostos são utilizados para pulverizar as instalações que recebem os grãos de trigo, realizando o manejo integrado de pragas (XXXVII Reunião da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo, 2005).

6 CONCLUSÕES

O procedimento de extração QuEChERS, desenvolvido neste trabalho para determinação de resíduos de agroquímicos em farinha de trigo integral, demonstrou que é realmente um método rápido, fácil, e eficaz, necessitando um menor número de etapas analíticas, diminuído assim os erros, e que desta forma pode ser aplicado em qualquer laboratório. Também demonstrou ser um método barato, devido ao baixo consumo de solventes orgânicos e de reagentes químicos. O pequeno consumo de reagentes e soluções torna o método QuEChERS proposto, vantajoso em comparação com os métodos de extração convencionais.

Os parâmetros avaliados para a validação do método foram considerados satisfatórios para a grande maioria dos compostos, pois apresentaram valores de acordo aos especificados na literatura por métodos cromatográficos. As curvas analíticas demonstraram linearidade entre 1,0 a 200 μgL^{-1} , com valores de coeficiente de determinação maiores que 0,99 para todos os compostos. As recuperações encontradas mostraram-se dentro dos critérios de validação para a maioria dos agroquímicos, apresentando resultados satisfatórios em relação à recuperação (70-120%) e precisão ($\leq 20\%$).

O método validado mostrou também grande especificidade, precisão e sensibilidade aos compostos avaliados neste estudo, apresentando desta forma valores de LOQ do método na concentração 10 μgkg^{-1} , permitindo assim, que amostras de farinha de trigo integral sejam analisadas dentro dos limites da legislação em vigor.

O efeito matriz apresentou valores positivos para a maioria dos compostos, o que caracteriza num aumento de sinal na análise cromatográfica. Este parâmetro confirma a necessidade de se empregar curvas preparadas no extrato da matriz, e não em solventes. As amostras de farinha de trigo adquiridas no mercado local apresentaram a utilização de agroquímicos dentro do permitido pela legislação.

Portanto, conclui-se que, nas condições testadas, o método mostrou-se adequado à análise simultânea dos agroquímicos em farinha de trigo integral, permitindo a aplicação em laboratórios de análise de resíduos de pesticidas, pois todos os itens avaliados para a validação encontraram-se dentro dos requisitos

exigidos pela norma RE nº899 de 2003, desta forma, os objetivos traçados para este trabalho foram atendidos satisfatoriamente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA **Guia para o controle da qualidade para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos para os laboratórios integrantes do Pará.** 2007.

_____. 2008. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>> acesso em 13 de março de 2014

_____. **Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003 - Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.** Disponível em: <http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf>. Acesso em: 09 mar. 2013.

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**, Berlin, v. 25(6), p. 838–865, 2006.

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

_____. Crop Protection, Public Health, Environmental Safety. **Wiley-VCH**, Weinheim, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA – ABRASCO. Disponível em: <http://www.abrasco.org.br/site/>. Acesso em: 14 abr. 2014.

BARAKAT, A. A. et al. 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**, v. 5, p. 97, 2007.

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

BOTTOLI, G. B. C.; COLINS, H. C.; JARDIM, F. S. C. I. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, **Química Nova**, V. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

BRUM, A. L.; MÜLLER, P. K. A competitividade do trigo brasileiro diante da concorrência argentina. **Editora Unijuí**, Ijuí, p.160, 2008.

CHEN, G.; CAO, P.; LIU, R. A multi-residue method for fast determination of pesticides in tea by ultra performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry combined with modified QuEChERS sample preparation procedure. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1406-1411, 2011.

CHIARADIA, C. M. **Desenvolvimento, validação e aplicação de métodos para análise multirresidual de agrotóxicos em suco de laranja e tangerina utilizando CLAE-DAD, CL-EM-EM E CLUE-DAD**. 2009, Dissertação (doutorado em química) - Instituto de Química Departamento de Química Analítica – Universidade de Campinas, Campinas, 2009.

CODEX ALIMENTARIUS. **Resíduos de plaguicidas en los alimentos y piensos**. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/pesticides/index.html?lang=es>>. Acesso em: 30 abr. 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Produção brasileira de trigo**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 30 abr. 2013.

CUNHA, S.C.; FERNADES, J. O. Assessment of bisphenol A and bisphenol B in canned vegetables and fruits by gas chromatography-mass spectrometry after QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction. **Food Control**, v. 33, p. 549 e 555, 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/>>. Acesso em: 02 jan. 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF UNITED NATIONS. **AGP - Pest and Pesticide Management**. Disponível em: <<http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/en/>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

FRIGGI, C. A., **Avaliação de um modulador a ar comprimido para GCxGC e sua aplicação para determinação de resíduos de pesticidas piretróides em uva**. 2008. Dissertação (mestrado em química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

FUKIUI, N. et al. Study of multi-residue method for determining pesticide residues in processed foods manufactured from agricultural products by LC-MS/MS. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**, v. 54, p. 426-433, 2013.

FURLANI, R. P. Z.; MARCILIO, K. M.; LEME, F. M.; TFOUNI, S. A. V. Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection. **Food Chemistry**, v. 126, p.1283–1287, 2011.

GUIMARÃES, G. A. R. **Pesticidas: métodos de análise & informações técnicas** / 1988 - (Livro) - Acervo 134949 BRASIL. Ministério da Agricultura; Pesticidas: métodos de análise & informações técnicas. Curitiba, PR: [s.n.] v. 2, 1988

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC Editora, p.855, 2008.

HERNÁNDEZ-BORGES, J. et al. Analysis of pesticide residues in bananas harvested in the Canary Islands (Spain). **Food Chemistry**, V.113, p.313, 2009.

HERNANDO, M. D.; et al. Gas chromatographic determination of pesticides in vegetable samples by sequential positive and negative chemical ionization and tandem mass spectrometric fragmentation using trap analyser. **The Analyst**, v. 126, p. 46-51, 2001

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

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO), **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, 2011. Disponível em: < http://www.inmetro.gov.br/sidog/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf > Acesso em: mar. 2014.

IUPAC. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/4.htm> .>Acesso em: 26 jul. 2014.

JOVANOVIĆ, P., et al. Development of multiresidue DLLME and QuEChERS based LC–MS/MS method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey liqueur. **Food Research International** , v. 55, p. 11–19, 2014.

KARNSA, S., et al. Modified QuEChERS and cloud-point extraction combined with visible spectrophotometric detection for carbaryl residue analysis in vegetables . **Analytical Chemistry** , v. 9(1), p. 150-156, 2013.

KOLBERG, D. I.; et al. Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC–MS, **Food Chemistry**, Santa Maria, v.125, p.1436–1442, 2011.

_____. **Desenvolvimento e validação de método multirresíduo empregando GC-MS (NCI-SIM) para a determinação de pesticidas em grão de trigo e seus produtos processados**. 2008. Dissertação (doutorado em química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

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

LAVAGNINI, I., et al. Quantitative Applications of Mass Spectrometry, **Chichester**, p.138, 2006.

LEHOTAY, S.J., et al. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal Chromatography A**, v. 121, p. 2548–2560, 2010.

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

LEHOTAY, S.J., et al. 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**, v. 88, p. 595, 2005a.

LUZARDO, O. P., et al. Methodology for the Identification of 117 Pesticides Commonly Involved in the Poisoning of Wildlife Using GC–MS-MS and LC–MS-MS. **Journal Analytical Toxicol**, v. 38 (3), p. 155-163, 2014.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E AGROPECUÁRIA. Disponível em: <
<http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/producao-integrada-cadeia-pecuaria/boas-praticas-agropecuarias>>. Acesso em: 19 abr. 2014.

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

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Herbicidas em alimentos. Aspectos gerais, toxicológicos e analíticos**, São Paulo, Livraria Varela, 1997.

NEVES, J. A. **Interferência da farinha de trigo na qualidade micológica e micotoxicológica do pão tipo Frances**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

NIELL, S., et al. QuEChERS-Based Method for the Multiresidue Analysis of Pesticides in Beeswax by LC-MS/MS and GC×GC-TOF. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 62 (17), p. 3675–3683, 2014

NÚÑEZ, O.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. LC-MSMS analysis of organic toxics in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24,p. 683-703, 2005.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS – AOAC, **2007.01: Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulphate**. 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. Disponível em:< <http://www.paho.org/bra/>>. Acesso em: 30 abr. 2013.

ORSO, D. **Determinação resíduo de agrotóxicos em mel empregando método QUECHERS modificado e GC-ECD**. 2011. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

OVIEDO, M. T. P.; TOLEDO, M. C. F.; VICENTE, E. Determinação de Resíduos de Agrotóxicos Organoclorados em Hortaliças, **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 12, 2002.

PANG, G F.; et al. Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography clean up/gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1125, p. 1-30, 2006.

PANG, G. et al. Simultaneous determination of 405 pesticide residues in grain by accelerated solvent extraction then gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 1366-1408, 2006.

PAYÁ, P.; et al. 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 Bioanalytical Chemistry**, Espinard, v. 389, p.1697–1714, 2007.

PEREIRA, M. B. **Avaliação da técnica de extração por SPE e GC-(EI)-MS/MS na análise de agrotóxicos em água de lavoura de arroz irrigado**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

PETROVIC, M. et al., Recent Trends in the Liquid Chromatography– Mass Spectrometry Analysis of Organic Contaminants in Environmental Samples. **Journal Chromatography A**, v. 1217, p. 4004–4017, 2010.

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

PRESTES, D. O. **Método rápido para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por LC-MS/MS**. 2011. Dissertação (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

PRESTES, O. D., et al. QuEChERS – A Modern Sample Preparation Method for Pesticide Multiresidue Determination in Food by Chromatographic Methods Coupled to Mass Spectrometry, **Química Nova**, v. 32, p. 1620–1634, 2009.

QUEIROZ, N. C. S., et al. Métodos para a Determinação de Multirresíduos de Agrotóxicos em Produtos Agrícolas. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - **Embrapa Meio Ambiente**, Edição eletrônica, Jaguariúna, SP, 2008.

RESTREPO, A. R.; ORTIZ, A. F. G.; OSSA, D. E. H.; MESA, G. A. P. QuEChERS GC–MS validation and monitoring of pesticide residues in different foods in the tomato classification group . **Food Chemistry**, v. 158, p. 153–161, 2014.

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

RODRIGUES, A. S. et al. Otimização e validação de método empregando QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola. **Química Nova**, v. 34, p. 780-786, 2011.

ROZET, E. et al. Analysis of reent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Jornal of chromatography A**, v. 1158, p. 111-125, 2007.

SANCO EUROPEAN COMMISSION, **Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis**, 3ª Edição N° SANCO/10476/2003, Bruxelas, Bélgica, 2010.

SHEROL, A. R.; **Otimização e validação de métodos empregando MSPD, QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010.

SILVA, D. B.; et al. **Trigo para o abastecimento familiar: do plantio à mesa**. Embrapa-SPI, Brasília; Embrapa - CPAC, p. 176, 1996.

SILVA, da I. M. P. R. Análise de Pesticidas na polpa e casca de frutas para sumo. Aveiro, Portugal, 2009.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. Cengage Learning, 8 ed., São Paulo, p.999, 2008.

TADEU, J. L. et al. Analysis of herbicides residues in cereal, fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 175-191, 2000.

UNIÃO EUROPÉIA. **Pesticides Residues**. Disponível em:

<http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=substance.selection>. Acesso em: 30 abr. 2013.

WAGN, L., et al. Determination of 51 carbamate pesticide residues in vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on optimization of QuEChERS sample preparation method. **Sepu**, v. 31(12), p. 1167-1175, 2013.

WALORCZYK, S. Validation and use of a QuEChERS-based gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for multiresidue pesticide analysis in blackcurrants including studies of matrix effects and estimation of measurement uncertainty. **Talanta** v. 120, p. 106-113, 2014.

YANG, A., et al. Analysis of 10 systemic pesticide residues in various baby foods using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 28(6), p. 735-741 2014.

8 ANEXOS

Anexo 1

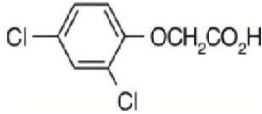
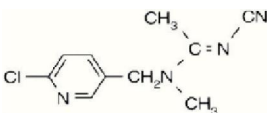
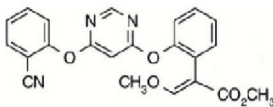
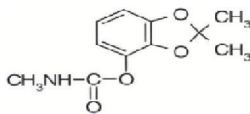
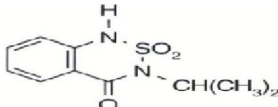
Tabela - propriedades dos pesticidas

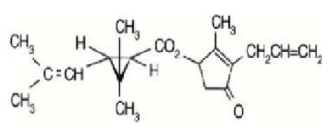
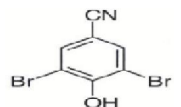
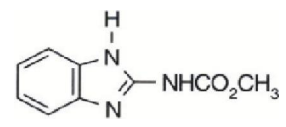
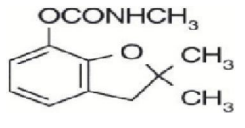
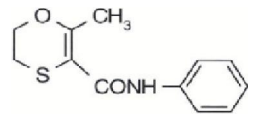
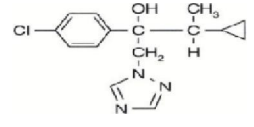
Pesticida	Fórmula	pKa Constante de acidez a 25°C	Kow coeficiente de partição octanol/água pH7 a 20°C	Solubilidade em água a 20°C (mg/L)	Pressão à vapor a 25°C mPa	Solubilidade em metanol a 20°C (mg/L)	Ponto de Fusão °C	Ponto de Degrada ção °C
2,4 – D	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	2,87	1,48 x 10 ⁻⁰¹	23180	0,0187	810000	139,3	200
Acetamiprido	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	0,70	6,31 x 10 ⁰⁰	2950	1,73 x 10 ⁻⁴	-	98,9	-
Azoxistrobina	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	n.a.	3,16 x 10 ⁰²	6,7	1,10 x 10 ⁻⁷	20000	116	345
Bendiocarbe	C ₁₁ H ₁₃ NO ₄	8,80	5,01 x 10 ⁰¹	280	4,6	-	126,7	-
Bentazon	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	3,28	3,47 x 10 ⁻⁰¹	570	0,17	1061000	140	210
Bioaletrina	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	-	4,79 x 10 ⁰⁴	4,6	43,9	-	n.a.	-
Bromoxinil	C ₇ H ₃ Br ₂ NO	3,86	1,10 x 10 ⁰¹	90	0,17	90000	188,7	-
Carbendazim	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	4,20	3,02 x 10 ⁰¹	8	0,09	-	305	305
Carbofurano	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	n.a.	6,31 x 10 ⁰¹	322	0,08	71700	153,1	276
Carboxine	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ S	0,50	2,00 x 10 ⁰²	134	0,02	8900	91,5	210
Cartap Hidrochloride	C ₇ H ₁₅ N ₃ O ₂ S ₂ HCl	-	1,12 x 10 ⁻⁰¹	200000	1,00 x 10 ⁻¹⁰	-	187,5	-
Ciproconazol	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O	n.a.	1,23 x 10 ⁰³	93	0,026	410000	1065	299
Clorpirifos	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	n.a.	5,01 x 10 ⁰⁴	1,05	1,43	290000	41,5	170
Dazomete	C ₅ H ₁₀ N ₂ S ₂	n.a.	4,27 x 10 ⁰⁰	3500	1,1	21300	105	150
Deltametrina	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	n.a.	3,98 x 10 ⁰⁴	0,0002	0,0000124	-	101	-
Diclofope	C ₁₆ H ₁₄ Cl ₂ O ₄	3,43	4,07 x 10 ⁰¹	122700	0,0000031	-	-	-
Diclorvos	C ₄ H ₇ Cl ₂ O ₄ P	n.a.	7,94 x 10 ⁰¹	18000	2100	-	-	190
Diuron	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	n.a.	7,41 x 10 ⁰²	35,6	1,15 x 10 ⁻⁰³	-	157	300
Etil Paraquat	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ N ₂	n.a.	3,16 x 10 ⁻⁰⁵	620000	0,01	-	-	340
Fenotrina	C ₂₃ H ₂₆ O ₃	-	1,02 x 10 ⁰⁶	0,0097	0,021	-	290	-
Fenitrotiona	C ₉ H ₁₂ NO ₅ PS	n.a.	2,09 x 10 ⁰³	19	0,676	500000	1	210
Forato	C ₇ H ₁₇ O ₂ PS ₃	-	7,24 x 10 ⁰³	50	112	miscível	-15	-
Foxim	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃ PS	-	2,40 x 10 ⁰³	1,5	2,1	-	5	-
Imidacloprido	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	n.a.	3,72 x 10 ⁰⁰	610	4,0 x 10 ⁻⁰⁷	-	144	230
Malationa	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	n.a.	5,62 x 10 ⁰²	148	3,1	250000	-20	174
Metamidofos	C ₂ H ₈ NO ₂ PS	-	1,62 x 10 ⁻⁰¹	200000	2,3	-	45	160
Metomil	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	n.a.	1,23 x 10 ⁰⁰	55000	0,72	1000000	79,6	192
Metribuzin	C ₈ H ₁₄ N ₄ OS	0,99	4,47 x 10 ⁰¹	1165	0,121	-	125	125
Parationa- metílica	C ₈ H ₁₀ NO ₅ PS	-	1,00 x 10 ⁰³	55	0,2	-	35,5	-
Pendimentalina	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	2,80	1,58 x 10 ⁰⁵	0,33	1,94	-	58	-
Pirimifos-metil	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	4,30	7,94 x 10 ⁰³	11	2,00 x 10 ⁻⁰³	250000	21	120
Pirazofos	C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₅ PS	-	6,31 x 10 ⁰³	4,2	0,22	-	51,5	160
Pirimicarbe	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	4,40	5,01 x 10 ⁰¹	3100	0,43	250000	91,6	-
Procloraz	C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₂	3,80	3,16 x 10 ⁰³	26,5	0,15	600000	48,3	220
Tebuconazol	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	5,00	5,01 x 10 ⁰³	36	1,30 x 10 ⁻⁰³	-	105	350
Triadimefom	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	-	1,51 x 10 ⁰³	70	0,02	-	82,3	-
Triamedinol	C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃ O ₂	n.a.	1,51 x 10 ⁰³	72	0,0005	-	132,5	270

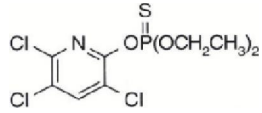
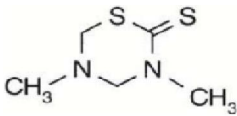
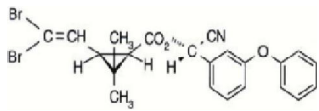
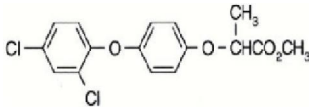
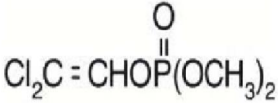
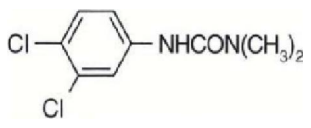
n.a. = não aplicável

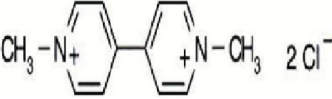
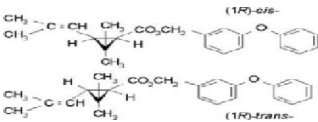
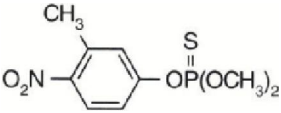
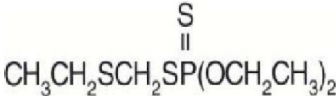
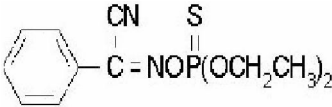
Fonte: IUPAC, <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/4.htm>

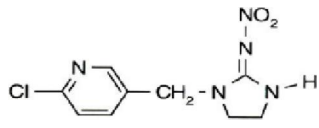
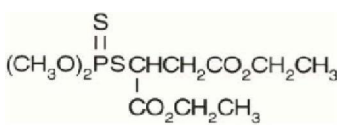
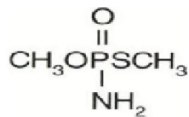
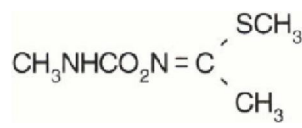
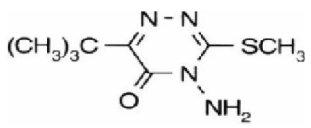
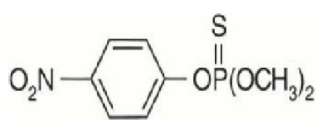
Anexo 2 –
Quadro - Compostos, fórmulas moleculares e estruturas químicas dos pesticidas

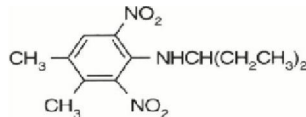
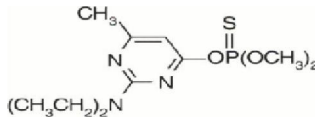
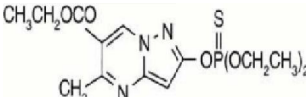
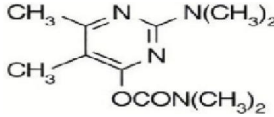
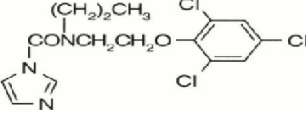
Composto	Fórmula	Estrutura química
2,4 - D	$C_8H_6Cl_2O_3$	
Acetamiprido	$C_{10}H_{11}ClN_4$	
Azoxistrobina	$C_{22}H_{17}N_3O_5$	
Bendiocarbe	$C_{11}H_{13}NO_4$	
Bentazon	$C_{10}H_{12}N_2O_3S$	

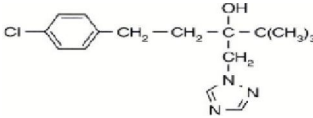
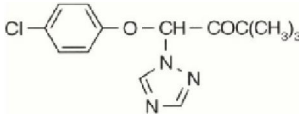
Bioaletrina	$C_{19}H_{26}O_3$	
Bromoxinil	$C_7H_3Br_2NO$	
Carbendazim	$C_9H_9N_3O_2$	
Carbofurano	$C_{12}H_{15}NO_3$	
Carboxine	$C_{12}H_{13}NO_2S$	
Cartap Hydrochloride	$C_7H_{15}N_3O_2S_2HCl$	$\begin{array}{c} H_2NCOS-CH_2 \\ \\ CH-NH(CH_3)_2 \\ \\ H_2NCOS-CH_2 \end{array} Cl^-$
Ciproconazol	$C_{15}H_{18}ClN_3O$	

Clorpirifos	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	
Dazomete	$C_5H_{10}N_2S_2$	
Deltametrina	$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	
Diclofope	$C_{16}H_{14}Cl_2O_4$	
Diclorvos	$C_4H_7Cl_2O_4P$	
Diuron	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$	

Etil Paraquat	$C_{12}H_{14}Cl_2N_2$	
Fenotrina	$C_{23}H_{26}O_3$	
Fenitrotiona	$C_9H_{12}NO_5PS$	
Forato	$C_7H_{17}O_2PS_3$	
Foxim	$C_{12}H_{15}N_2O_3PS$	

Imidacloprido	$C_9H_{10}ClN_5O_2$	
Malationa	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	
Metamiofos	$C_2H_8NO_2PS$	
Metomil	$C_5H_{10}N_2O_2S$	
Metribuzin	$C_8H_{14}N_4OS$	
Parationa-metífica	$C_8H_{10}NO_5PS$	

Pendimentalina	$C_{13}H_{19}N_3O_4$	
Pirimifos-metil	$C_{11}H_{20}N_3O_3PS$	
Pirazofos	$C_{14}H_{20}N_3O_5PS$	
Pirimicarbe	$C_{11}H_{18}N_4O_2$	
Procloraz	$C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$	

Tebuconazol	$C_{16}H_{22}ClN_3O$	
Triadimefom	$C_{14}H_{16}ClN_3O_2$	
Triadimenol	$C_{14}H_{18}ClN_3O_2$	