



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Dissertação de Mestrado

GRAZIELE DE ARAÚJO CARVALHO

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MAMÃO
EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS E GC-MS**

Salvador-BA

2015

GRAZIELE DE ARAÚJO CARVALHO

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MAMÃO
EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS E GC-MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo Lopes

Salvador-BA

2015

Sistema de Bibliotecas / IQ - UFBA

Carvalho, Grazielle de Araújo.

Determinação de resíduos de agrotóxicos em mamão empregando o método QuEChERS e GC-MS / Grazielle de Araújo Carvalho. - Salvador, BA, 2015.
109 f. : il.

Inclui anexo.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo Lopes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2015.

1. Mamão. 2. Agrotóxicos. 3. Método de análise. 4. QuEChERS, método. 5. Análise cromatográfica. I. Lopes, Wilson Araújo. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. III. Título.

CDD – 634.651

CDU – 634.651

TERMO DE APROVAÇÃO

GRAZIELE DE ARAÚJO CARVALHO

“DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MAMÃO EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS E CG-EM”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Wilson Araújo Lopes

Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Pedro Afonso de Paula Pereira

Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Frederico de Madeiros Rodrigues

Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola

Salvador, 13 de março de 2015.

**AOS MEUS PAIS E IRMÃO,
À MINHA AVÓ ANGELINA,
À MINHA FILHA JÚLIA,
AO MEU MARIDO TIAGO.**

“TUA CAMINHADA AINDA NÃO TERMINOU... A REALIDADE TE ACOLHE DIZENDO QUE PELA FRENTE O HORIZONTE DA VIDA NECESSITA E TUAS PALAVRAS E DO TEU SILENCIO. SE AMANHÃ SENTIRES SAUDADES, LEMBRA-TE DA FANTASIA E SONHA COM TUA PRÓXIMA VITÓRIA (...)

É CERTO QUE IRÁS ENCONTRAR SITUAÇÕES TEMPESTUOSAS NOVAMENTE, MAS HAVERÁ DE VER SEMPRE O LADO BOM DA CHUVA QUE CAI (...).

TU ÉS JOVEM. A JUVENTUDE PRECISA DE SONHOS E SE NUTRIR DE LEMBRANÇAS “(...)

(CHARLES CHAPLIN).

Agradecimentos

Sou grata a Deus pelo dom da vida e por ter me presenteado com pessoas especiais ao longo da minha caminhada.

Ao Prof. Wilson pela orientação e paciência.

A Fred pelos seus ensinamentos e críticas que tanto me fizeram crescer.

A minha avó Angelina por todo o seu amor e por feito de mim quem sou hoje.

Aos meus pais, Vera e Valmir, por todo amor, apoio, confiança e por, muitas vezes, abrirem mão das suas vontades e necessidades para me oferecer o melhor sempre.

Ao meu irmão Adonis, meu amigo e porto seguro.

Ao meu marido Tiago por todo o seu amor e compreensão. Por caminhar ao meu lado seja qual for o caminho.

A minha filha Júlia por fazer de mim uma pessoa melhor a cada dia e por ser o meu maior motivo para querer sempre mais.

Aos meus sogros, Laura e Roque, meus cunhados, Daniel e Gabriel, por cuidarem da minha filha enquanto eu estava ausente. Vocês foram imprescindíveis nessa etapa, muito obrigada!

Aos meus compadres, Nina e Luciano, e a minha amiga Fran pela força e torcida.

Aos amigos da EBDA Ana Rita, Expedito Marques, William Franz, Estéfane Nunes, Lidiane Martins, Rodolfo Rojas, Karla Brito, Larissa Resende, Rafaela Pinto, Laís Lima que estiveram comigo nessa jornada. A Lucas Souza e Ana Berader pela colaboração. Um agradecimento especial a Paulo Mesquita, Claudiane Barbosa e Everaldo Marback pela parceria e por sempre estarem a postos quando precisei. Não tenho palavras para agradecer a vocês por tudo o que fizeram por mim.

A Fabio Santos Oliveira pela ajuda no tratamento dos dados.

A todos os amigos e familiares pela torcida e boas energias emanadas.

Aos professores da UNEB, lugar onde iniciei a minha jornada.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia, os quais auxiliaram na minha formação acadêmica.

SUMÁRIO

Sumário	viii
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas e siglas	xiv
Resumo	xvi
Abstract	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações gerais	1
1.2 Objetivos	4
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	5
2.1 Agrotóxicos	5
2.1.1 Conceito	5
2.1.2 Classificação	6
2.1.3 Histórico e evolução do consumo	11
2.1.4 Efeitos do uso de agrotóxicos à saúde pública e ao meio ambiente	17
2.1.5 Resíduos de agrotóxicos em alimentos	25
2.2 A Cultura do mamão e a produção brasileira	26
2.3 Métodos para análise e resíduos de agrotóxicos	31
2.3.1 Método QuEChERS	33
2.4 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)	37
2.5 Efeito de matriz em GC-MS	38
2.6 Desenvolvimento de planejamento experimental	39
2.7 Parâmetros de validação na análise de resíduos de agrotóxicos	41
	vii

3 PARTE EXPERIMENTAL	47
3.1 Equipamentos e materiais	47
3.1.1 Equipamentos	47
3.1.2 Solventes	48
3.1.3 Padrões	48
3.1.4 Soluções padrão e de trabalho	49
3.1.5 Gases especiais	49
3.1.6 Vidraria	49
3.1.7 Outros materiais	50
3.1.8 Limpeza dos materiais	51
3.2 Agrotóxicos selecionados para o estudo	51
3.3 Condições cromatográficas estabelecidas para as análises por GC-MS	52
3.4 Aquisição da amostra para o desenvolvimento do método	53
3.5 Otimização do procedimento de extração pelo método QuEChERS modificado.	53
3.5.1 Seleção do adsorvente	54
3.5.2 Planejamento Experimental	54
3.5.3 Planejamento Experimental Fracionário	55
3.5.4 Planejamento Experimental Box-Behnken	55
3.5.5. Efeito Matriz empregando o método QuEChERS modificado	56
3.6 Procedimento de extração pelo método QuEChERS modificado	56
3.7. Validação do método	58
3.7.1 Curva analítica e Linearidade	59
3.7.2 Limites de detecção e quantificação	59

3.7.3 Precisão	59
3.7.4 Recuperação	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1 Otimização as condições cromatográficas	61
4.2 Otimização das condições de extração dos agrotóxicos da matriz mamão pelo método QuEChERS para análise por GC-MS.	69
4.2.1 Seleção do adsorvente	69
4.3 Planejamento Experimental	76
4.3.1 Planejamento Fatorial Fracionário	76
4.3.2. Planejamento Box-Behnken	79
4.4 Figuras de mérito	87
4.4.1 Curvas analíticas (Linearidade)	88
4.4.2 Limites de detecção e Limites de quantificação	90
4.4.3 Precisão e Exatidão do método	92
4.5 Aplicação do método QuEChERS modificado na análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de mamão	95
5. CONCLUSÕES	100
6. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	102
6.1 Trabalhos apresentados em congressos	102
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

Lista de Figuras

Figura 1.	Estrutura do ácido carbâmico.	8
Figura 2.	Fórmula estrutural da nicotina.	9
Figura 3.	Fórmula estrutural de piretrinas.	9
Figura 4.	Fórmula estrutural do benzimidazol.	10
Figura 5.	Fórmula estrutura do triazol.	10
Figura 6.	Fórmula estrutural da retentona.	12
Figura 7	Fórmula estrutural do diclorodifeniltricloroetano.	13
Figura 8.	Fórmulas estruturais do BHC e parathion.	14
Figura 9.	Agrotóxicos mais vendidos no ano de 2013.	16
Figura 10.	Destino dos agrotóxicos no meio ambiente.	19
Figura 11.	Mamão papaia e mamão formosa.	27
Figura 12.	Desempenho da cultura do mamão no Brasil.	28
Figura 13.	Produção agrícola municipal, 2012.	29
Figura 14.	Lesões da varíola na face inferior da folha do mamoeiro.	30
Figura 15.	Ácaro rajado.	31
Figura 16.	Fluxograma representativo do método QuEChERS original.	34
Figura 17.	Sistema GC-MS utilizado na determinação e otimização das condições de extração dos agrotóxicos na matriz mamão.	48
Figura 18.	Estrutura química dos agrotóxicos selecionados para estudo.	52
Figura 19.	Esquema analítico para extração, pré-concentração, separação e quantificação de agrotóxicos.	58
Figura 20.	Área total do cromatograma obtido na extração pelo método QuEChERS.	62
Figura 21.	Cromatograma GC-MS /SCAN obtido utilizando PSA adsorvente.	63
Figura 22.	Espectros de massas dos agrotóxicos obtidos do cromatograma de íons totais (GC-MS /SCAN) comparado com aqueles obtidos da biblioteca <i>NIST</i> .	64

Figura 23.	Cromatograma obtido por GC-MS (MODO SIM) de solução padrão contendo os agrotóxicos selecionados para estudo com concentração igual a 2µg mL.	69
Figura 24.	Área total de picos no cromatograma (GC-MS), com diferentes adsorventes na etapa de <i>clean-up</i> , obtido a partir da extração pelo método QuEChERS.	70
Figura 25.	Cromatograma GC-MS /SCAN obtido utilizando PSA como adsorvente	70
Figura 26.	Cromatograma GC-MS /SCAN obtido utilizando C18 como adsorvente.	71
Figura 27.	Cromatograma GC-MS /SCAN obtido utilizando CGB como adsorvente.	71
Figura 28.	Cromatograma GC-MS /SCAN obtido utilizando Florisil como adsorvente.	72
Figura 29.	Cromatograma GC-MS /SCAN obtido sem a etapa de clean up.	72
Figura 30.	Fórmula estrutural do PSA.	74
Figura 31.	Extratos obtidos de acordo com diferentes adsorventes da esquerda para a direita:1) PSA, 2) C18, 3) CGB, 4) Florisil, 5) Sem adsorvente.	75
Figura 32.	Diagrama de Pareto do planejamento fatorial fracionário mostrando a influencia dos fatores estudados.	78
Figura 33.	Superfícies de resposta (Box-Behnken).	84
Figura 34.	Gráficos de previsão de valores para os parâmetros avaliados.	86
Figura 35.	Curvas analíticas para os nove agrotóxicos estudados.	89
Figura 36.	Cromatograma de uma amostra de mamão obtido no GC-MS modo SIM.	96

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Classificação do agrotóxico de acordo com os organismos-alvo que se deseja combater.	7
Tabela 2.	Classificação de acordo com classe toxicológica.	8
Tabela 3.	Distribuição do consumo de agrotóxicos no Brasil por unidade federativa.	17
Tabela 4.	Características físico-químicas dos agrotóxicos selecionados para estudo.	20
Tabela 5.	Eventos de envenenamento ocorridos no Brasil, 2011.	24
Tabela 6.	Parâmetros de validação adotados pelo INMETRO e pela ANVISA.	42
Tabela 7.	Condições empregadas no sistema cromatográfico.	55
Tabela 8.	Fragmentos monitorados na quantificação dos agrotóxicos.	56
Tabela 9.	Valores de recuperação obtidos para os adsorventes estudados (%).	63
Tabela 10.	Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial fracionário.	68
Tabela 11.	Matriz do planejamento fatorial fracionário.	73
Tabela 12.	Fatores e níveis estudados no planejamento experimental Box-Behnken.	77
Tabela 13.	Matriz do planejamento Box-Behnken.	82
Tabela 14.	Valores obtidos nos experimentos para o estudo do efeito de matriz.	83
Tabela 15.	Valores de Recuperação (%) e Efeito de matriz (%) obtidos no ponto ótimo.	87
Tabela 16.	Parâmetros da curva analítica, coeficientes de determinação e LMR de cada agrotóxico.	88
Tabela 17.	Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) obtidos pelo método QuEChERS e CG-MS e LMR.	91
Tabela 18.	Recuperação (%) e RSD (%) para o estudo da precisão e exatidão do método em três níveis de fortificação.	92
Tabela 19.	Coeficientes de variação obtidos no estudo da precisão intermediária do método QuEChERS por GC-MS.	94

Tabela 20.	Resultados obtidos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) das análises de mamão por QuEChERS em amostras de Salvador	97
Tabela 21.	Resultados obtidos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) das análises por QuEChERS das amostras de algumas cidades do interior da Bahia.	98
Tabela 22.	Resultados obtidos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) das análises por QuEChERS das amostras de algumas cidades do interior da Bahia.	99

Lista de abreviaturas e siglas

AGROFIT	Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ASE	Extração Acelerada com Solvente (do inglês, <i>Accelerated Solvent Extraction</i>)
C18	Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano
CG	Cromatografia gasosa
CGB	Carbono preto grafitizado (do inglês, <i>Grafitized Carbon Black</i>)
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
D	Desejabilidade global
d _{ME}	Desejabilidade do efeito de matriz
d _R	Desejabilidade da recuperação
D-SPE	Extração em Fase Sólida Dispersiva (do inglês, <i>Dispersive Solid Phase Extraction</i>)
EM	Espectrometria de massas
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPI	Equipamentos de Proteção Individual
FAO	Food Agriculture Organization
GARP	Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	Ingestão Diária Aceitável
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K _{ow}	Coefficiente de partição octanol/água
LC	Cromatografia Líquida (do inglês, <i>Liquid Chromatography</i>)

LMR	Limite Máximo de Resíduos
LOD	Limite de Detecção (do inglês, <i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Limite de Quantificação (do inglês, <i>Limit of Quantification</i>)
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
ME	Efeito de matriz (do inglês, <i>Matrix Effect</i>)
MOP	Material Orgânico Policíclico
MP	Material Particulado
MSPD	Dispersão da Matriz em Fase Sólida (do inglês, <i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i>)
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
pK _a	Potencial de dissociação ácida
PSA	Amina Primária Secundária (do inglês, <i>Primary Secondary Amine</i>)
QuEChERS	Rápido, Fácil, Barato, Eficiente, Robusto e Seguro (do inglês, <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>)
R	Coefficiente de correlação linear
R	Recuperação
RSD	Desvio Padrão Relativo (do inglês, <i>Relative Standard Deviation</i>)
SEAGRI	Secretária da Agricultura do Estado da Bahia
SIM	Monitoramento de íons selecionados (do inglês, <i>Selected Ion Monitoring</i>)
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SINDAG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola
SPME	Microextração em Fase Sólida (do inglês, <i>Solid Phase Micro Extration</i>)
t _R	Tempo de retenção

RESUMO

O mamão (*Caricapapaya*L.) possui grande importância social e econômica. É um alimento amplamente utilizado em dietas alimentares por ser excelente fonte de cálcio, pró-vitamina A, vitamina C (ácido ascórbico) e do complexo B, sais minerais como cálcio, potássio e magnésio. No Brasil, o mamão é produzido, sobretudo, na região nordeste, com destaque para o estado da Bahia que concentra no Extremo Sul a maior produção do fruto. A cultura do mamoeiro é altamente suscetível a pragas e doenças ocasionando perdas pós-colheita. Por conta disso, o uso indiscriminado de defensivos agrícolas, também denominados de agrotóxicos ou agroquímicos, tem se tornado freqüente, acarretando em problemas relacionados à segurança alimentar. No presente trabalho, o método QuEChERS foi modificado, validado e aplicado na determinação de resíduos dos agrotóxicos carbofurano, tiametoxan, tiabendazol, imazalil, tebuconazol, bifentrina, procloraz, difenoconazol e azoxystrobina por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Diferentes parâmetros que influenciam na eficiência da extração foram avaliados: tipo e quantidade de adsorvente, massa de amostra (g), massa de $MgSO_4$ (g), massa de NaCl (g), massa de PSA, tempo de sonicação (min.), Velocidade de centrifugação (rpm) e Tempo de centrifugação (min). As variáveis que influenciaram significativamente no processo de extração foram: massa de amostra, massa de NaCl e massa do adsorvente PSA (o mais adequado para o método desenvolvido e para a amostra utilizada). Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se 1,45g de NaCl, 10 g de amostra e 300mg de PSA. Na validação foram avaliados o efeito da matriz, a linearidade das curvas analíticas, LOD, LOQ, precisão e exatidão. O método QuEChERS modificado apresentou linearidade entre 25,0 e 1.200 $\mu g.kg^{-1}$, LOD de 2,5 $\mu g kg^{-1}$ e LOQ igual a 25,0 μgkg^{-1} . Todas as curvas analíticas apresentaram valores de r maiores que 0,98. As recuperações e CV (%) estavam dentro do intervalo aceitável para análise de resíduos, que é de 20%, no estudo da repetitividade. Para a precisão intermediária, os valores do CV (%) variaram entre 10,2 % e 18,9%. O efeito matriz (ME) avaliado para todos os compostos pelo método QuEChERS modificado, foi compensado com a calibração por superposição na matriz. O método foi aplicado na análise de amostras coletadas em Salvador-BA e em cidades o interior da Bahia. Nas amostras de Salvador foram detectados resíduos de quatro compostos e nas amostras do interior do estado detectou-se resíduos de cinco compostos. Entretanto, as concentrações estavam abaixo dos valores estabelecidos pela Legislação Brasileira.

Palavras-chave: QuEChERS, Carica papaya L, GC-MS, agrotóxicos, planejamento multivariado.

ABSTRACT

The papaya (*Caricacapapaya*L.) has significant social and economic importance. It is widely used in alimentary diets due to its relevant source of pro-vitamin A, vitamin C (ascorbic acid) and of the complex B and mineral salts as calcium, potassium and magnesium. In Brazil, papaya is grown, mainly, in the northeast, especially in the state of Bahia, whose extreme south owns the highest production of the fruit. The culture of papaya tree is highly susceptible to pests and diseases implicating losses after harvesting. Due to this, the indiscriminate use of agricultural pesticides has been more frequent and this facts leads to major issues related to food safety. In the present work, the method QuEChERS was modified, validated and applied in the determination of residues of the agricultural pesticides - carbofuran, thiamethoxam, thiabendazole, imazalil, tebuconazole, bifenthrin, prochloraz, difenoconazole and azoxystrobin - by means of gas chromatography associated with mass spectrometry. Different parameters that has influence in the efficiency of the extraction were evaluated: type and quantity of adsorbent, weight of the sample (g), weight of $MgSO_4$ (g), weight of NaCl (g), weight of PSA, time of sonication (min.), centrifugation velocity (rpm) and time of centrifugation (min.). The variables that had the most significant influence in the the extraction were: weight of the sample, weight of NaCl and weight of the adsorbent PSA (the most adequate for the method applied and for the sample used in this work). The best results were obtained using 1.45g of NaCl, 10 g of sample and 300mg of PSA. In the validation it was evaluated the matrix effect, the linearity of the analytical curves, LOD, LOQ and accuracy. The method QuEChERS modified has presented linearity between 25.0 and 1,200 $\mu g.kg^{-1}$, LOD of 2.5 $\mu g kg^{-1}$ and LOQ equal to 25.0 μgkg^{-1} . All analytical curves have presented r values higher than 0.98. The recovery and CV (%) were within the acceptable range for the residue analysis, which is 20%, in the repeatability study. For intermediate accuracy, the values of CV (%) varied between 10.2 % and 18.9%. The matrix effect (ME) evaluated for all compounds by the method QuEChERS modified was compensated with calibration by superposition in the matrix. The method was applied in the analysis of the samples collected in Salvador-BA and in other cities of Bahia state. In the samples of Salvador it was detected residue of four compounds and in the samples from other cities it was detected residue of five compounds. However, the content was lower than the values established by the Brazilian Legislation.

Keywords: QuEChERS, Papaya, *Carica papaya* L, CG-EM, pesticides, multivariate planning.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

O crescimento da população mundial e o conseqüente aumento da demanda por alimentos têm impulsionado o desenvolvimento de sistemas agrícolas cada vez mais intensivos e eficientes. Neste sentido, o uso de defensivos agrícolas (também denominados de agroquímicos, agrotóxicos, praguicidas, pesticidas etc.) para o controle de pragas durante o cultivo, no ante e pós-colheita, tornou-se um recurso essencial para garantir o bom rendimento da produção agrícola (Braibante, 2012).

Os defensivos agrícolas são substâncias químicas manufaturadas para a utilização na agricultura, visando prevenir ou reduzir efeitos causados por pragas consideradas nocivas, preservando-a da ação danosa das mesmas (Silva, 2004). Entretanto, muitas dessas substâncias possuem elevada toxicidade, bem como apresentam grande potencial carcinogênico e teratogênico. A utilização inadequada dessas substâncias pode causar conseqüências sérias à saúde, tais como: intoxicações agudas, crônicas e alterações do Sistema Nervoso Central. Além disso, caracterizam-se por serem móveis e persistentes para os compartimentos ambientais, acumulando-se no solo e na biota, podendo alcançar as águas superficiais por escoamento e as subterrâneas, por lixiviação. Assim, devido aos inúmeros efeitos nocivos à saúde, estas substâncias são também classificadas como agrotóxicos.

A presença dos agrotóxicos em alimentos tem gerado preocupações. Entre os alimentos, aqueles de origem vegetal são amplamente consumidos na forma in natura, os quais constituem um dos principais meios de contaminação indireta e involuntária.

A determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos é um importante indicador da exposição humana e ambiental a esses compostos. Entretanto, o grande desafio é conseguir analisar tais substâncias em amostras ambientais ou em alimentos devido às baixas concentrações das mesmas nessas matrizes consideradas complexas.

Por se tratar de matrizes complexas faz-se necessário a inclusão de algumas etapas extremamente importantes visando garantir a confiabilidade e sensibilidade do método. Isso pode tornar a análise cara e demorada, além de aumentar a probabilidade de erros analíticos. Nos últimos anos, tem ocorrido o desenvolvimento de novos métodos analíticos para a determinação de resíduos de agrotóxicos em produtos agrícolas, no intuito de aumentar a capacidade de análise do ponto de vista quantitativo e de simplificar as etapas do procedimento.

Nesse contexto, visando superar limitações práticas dos métodos de análise multirresíduos disponíveis, Anastassiades et al. introduziram um novo procedimento de preparo de amostras para extração e análise de resíduos de agrotóxicos denominado de "QuEChERS", do inglês **Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe**. Esse método, que tem como vantagem ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, explora as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) é utilizada com frequência para a determinação multirresíduos de agrotóxicos em alimentos. A facilidade de acoplamento da cromatografia gasosa de alta resolução com o espectrômetro de massas permite que a confirmação da identidade e a determinação de um grande número de compostos orgânicos sejam feitas simultaneamente. Os baixos limites de detecção (LOD) obtidos são consequência da alta seletividade promovida pelo uso de diferentes modos como, por exemplo, o modo SIM (do inglês, Selected Ion Monitoring) que tem sido utilizado para determinar resíduos de agrotóxicos em alimentos e amostras ambientais (Presteset al., 2009).

O mamão é um fruto muito utilizado pela população, sendo consumido principalmente na sua forma "in natura" ou também na forma de produtos industrializados como tais como sucos, doces e geléias, na forma de frutas secas e cristalizadas. Por ser um fruto susceptível ao ataque de pragas como fungos, insetos e ácaros, no decorrer do cultivo e na pós-colheita (principalmente em larga escala), geralmente recebe aplicações periódicas de agrotóxicos com o intuito de controlar a incidência de pragas e, conseqüentemente, aumentar a produtividade e garantir o mercado para esse produto.

Diante deste panorama, a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos é importante devido ao risco que estes compostos oferecem à saúde humana, a sua persistência no meio ambiente, além da tendência de bioacumulação. Sendo assim, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos com alta sensibilidade e eficiência capazes de detectar e quantificar resíduos de agrotóxicos em baixas concentrações.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver e/ou adequar um método analítico baseado no método QuEChERS para extração e determinação de resíduos de agrotóxicos em mamão e análise por GC-MS.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e/ou adequar um procedimento analítico, baseado na extração pelo método QuEChERS modificado, para extrair da matriz mamão resíduos dos agrotóxicos aplicados em frutas;
- Obter as condições cromatográficas por GC-MS para análise dos agrotóxicos selecionados;
- Validar o método desenvolvido para a determinação de agrotóxicos em mamão;
- Demonstrar a aplicabilidade do método empregando GC-MS na determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de mamão coletadas em diferentes regiões da Bahia.

CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Agrotóxicos

2.1.1 Conceito

Alguns termos como pesticida, agrotóxico, praguicida, defensivo agrícola, dentre outros, são utilizados para denominar um grupo de substâncias químicas naturais ou sintéticas utilizadas no controle de pragas e doenças de plantas. O desenvolvimento dessas substâncias foi impulsionado pelo anseio do ser humano em ampliar a sua qualidade de vida, procurando aumentar a produção de alimentos, na busca pela segurança alimentar (Braibante, 2012).

O uso de defensivos agrícolas é descrito como uma prática utilizada desde a antiguidade, onde os campos cultivados, principal fonte de alimento para o homem, tornaram-se alvo do ataque de pragas, com prejuízos para a produção. Essas espécies se multiplicaram rapidamente e passaram a interferir no cultivo e, indiretamente, no bem-estar das pessoas, sendo, por isso, consideradas como "pragas" (Barbosa, 2004; Braibante, 2012).

Desta forma, ao longo do tempo o ser humano buscou maneiras para combater as pragas que atacavam as plantações - desde rituais religiosos até o desenvolvimento de substâncias químicas capazes prevenir, controlar ou destruir diversos tipos de pragas. Nesse contexto, surge uma classe de substâncias químicas denominadas de defensivos agrícolas, agroquímicos ou simplesmente, agrotóxicos que passaram a ser amplamente utilizados (Barbosa, 2004; Braibante, 2012).

O decreto-lei 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 que trata sobre esse grupo de substâncias/agentes no Brasil e "dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências", define agrotóxicos como:

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

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2003) os agrotóxicos são definidos como:

“qualquer substância, ou mistura de substâncias, usadas para prevenir, destruir ou controlar qualquer praga, incluindo vetores de doenças humanas e animais, espécies indesejadas de plantas ou animais, causadoras de danos durante (ou interferindo na) a produção, processamento, estocagem, transporte ou distribuição de alimentos, produtos agrícolas, madeira e derivados, ou que deva ser administrada para o controle de insetos, aracnídeos e outras pragas que acometem os corpos de animais de criação.” (FAO, 2003).

2.1.2 Classificação

Os agrotóxicos abrangem um grande número de substâncias químicas que diferem bastante em suas propriedades químicas e físicas, com diferentes modos de ação e grau de toxicidade, sendo divididos em classes, como mostrada na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação do agrotóxico de acordo com os organismos-alvo que se deseja combater.

Tipo de Agrotóxico	Organismo-Alvo
Acaricidas	Ácaros
Algicidas	Algas, plantas marinhas.
Bactericidas	Bactérias
Larvicida	Larvas
Fumigantes	Nematóides, fungos, insetos, etc.
Fungicidas	Fungos
Herbicidas	Plantas
Inseticidas	Insetos
Moluscicidas	lesmas e caracóis
Raticida	Roedores

Fonte: Baird, 2002.

Além disso, os agrotóxicos podem ser divididos em dois grupos principais: agrotóxicos de contato ou não sistêmicos e agrotóxicos sistêmicos. Os agrotóxicos de contato ou não sistêmicos não penetram no tecido vegetal e, conseqüentemente, não são transportados no sistema vascular das plantas. Os primeiros inseticidas, herbicidas e fungicidas faziam parte desse grupo e tinham a desvantagem de serem susceptíveis aos efeitos do clima, como vento, chuva e sol, deixando a planta desprotegida contra o ataque de pragas. Os agrotóxicos sistêmicos penetram na cutícula da planta e movimentam-se pelo seu sistema vascular. Eles possuem a vantagem de serem seletivos atacando a praga alvo e provocando um menor impacto no ambiente (Silva, 2004).

Os agrotóxicos também são classificados de acordo com a classe toxicológica, como pode ser visto na Tabela 2. Os estudos laboratoriais com exposição oral, dérmica e inalatória determinam o valor de DL₅₀, que é a dose necessária para causar a morte em 50% de uma população selecionada para determinar o efeito letal.

Tabela 2. Classificação de acordo com classe toxicológica.

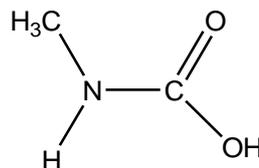
Classificação	Classe Toxicológica	DL ₅₀ (mg/kg em ratos)	Cor da embalagem
Extremamente Tóxico	I	≤ 5,0	Faixa Vermelha
Altamente Tóxico	II	5,0 - 50,0	Faixa amarela
Moderadamente Tóxico	III	50,0 – 500,0	Faixa azul
Pouco Tóxico	IV	500,0 – 5000,0	Faixa verde
Relativamente Tóxico	V	> 5000,00	Faixa verde

Fonte: ANVISA, 2005.

Além das classificações citadas, os agrotóxicos também são divididos quanto a classe química, sendo abordados neste trabalho carbamatos, neonicotinóides, benzimidazóis, imidazóis, triazóis e piretróides.

Os carbamatos são substâncias orgânicas derivados do ácido carbâmico. São fortes inibidores da enzima colinesterase e são muito tóxicos para o ser humano, assim como os organofosforados e organoclorados. As colinesterases são enzimas encontradas nas sinapses colinérgicas no sistema nervoso central (SNC), periférico e autônomo (Nero et al., 2007). Os primeiros carbamatos foram colocados no mercado por volta de 1950. Eles são frequentemente utilizados como alternativa aos organoclorados e aos organofosforados e provocam uma sintomatologia similar durante as exposições agudas e crônicas (Filho, 2010).

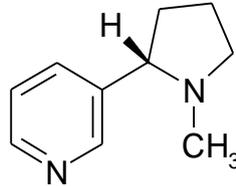
Figura 1. Estrutura do ácido carbâmico.



Os neonicotinóides constituem uma nova classe de inseticidas, com um novo modo de ação. Eles foram sintetizados a partir da nicotina natural (Figura 2) e

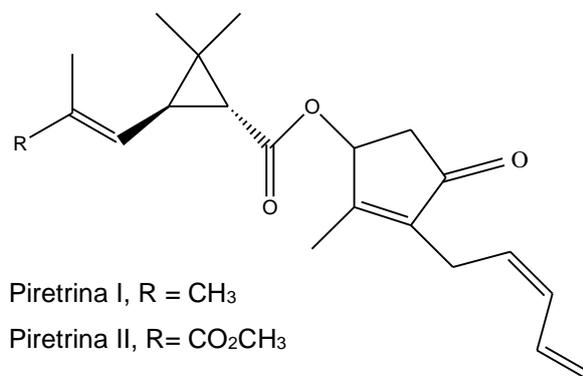
são considerada uma classe de inseticidas sintéticos mais importantes das últimas três décadas (Ford et al., 2011).

Figura 2. Fórmula estrutural da nicotina.



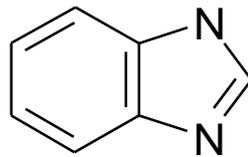
Piretroides são inseticidas de origem vegetal e são derivados químicos das piretrinas. O piretro é obtido da trituração de flores de algumas plantas pertencentes ao gênero *Chrysanthemum*, família *Compositae* e espécie *Cinerariaefolium*. A atividade inseticida do piretro foi observada no século XIX. No ano de 1924 descobriu-se que os componentes ativos do piretro, as piretrinas, são ésteres formados pela combinação de dois ácidos e três alcoóis. Com a descoberta dos constituintes ativos dos piretroides naturais, foram desenvolvidos piretroides sintéticos semelhantes mais simples, mais potentes e com baixa toxicidade aos mamíferos. Os piretróides têm sido considerados como uma das classes de inseticidas com maior potencial na agricultura devido a sua curta persistência no meio ambiente e alta atividade para insetos. Entre os piretróides, pela sua utilização na agricultura, destacam-se a bifentrina, cipermetrina, deltametrina, fenpropatina e permetrina (Filho, 2010).

Figura 3. Fórmula estrutural de piretrinas.



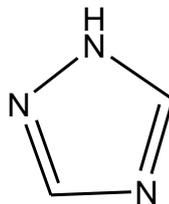
Os benzimidazóis são utilizados na agricultura como fungicidas no controle de organismos patogênicos, em tratamentos pré e pós-colheita (Filho, 2010). São sistêmicos com ação curativa e protetora, atuando na inibição da mitose e na divisão celular. Os fungicidas sistêmicos desse grupo como tiabendazol, benomil, tiofanato metílico e carbendazim se caracterizam pela alta seletividade atuando em poucos processos do metabolismo dos fungos. Os benzimidazóis são compostos heterocíclicos com um anel de cinco membros contendo dois átomos de nitrogênio condensado a um anel aromático. Entre os benzimidazóis, o primeiro compostodesenvolvido foi o tiabendazol (Figura4), introduzido em 1961 como um vermífugo, utilizado em medicina humana e veterinária (Silva e Melo, 2009).

Figura 4. Fórmula estrutural do benzimidazol.



Os triazóis são compostos heterocíclicos com um anel de cinco membros contendo dois átomos de carbono e três átomos de nitrogênio. São fungicidas sistêmicos com ação protetora e curativa. Eles inibem a enzima específica, C14-desmetilase, resultando no crescimento fúngico anormal e, conseqüentemente, na morte (Filho, 2010).

Figura 5. Fórmula estrutura do triazol.



2.1.3 Histórico e evolução do consumo

Neste novo milênio, um grande desafio para a humanidade é a produção de alimentos para uma população em expansão. Em 2050, o planeta contará com aproximadamente nove bilhões de seres humanos segundo as últimas estimativas da ONU. Apenas para alimentar corretamente uma determinada população, sem subnutrição nem carência, a quantidade de produtos vegetais destinados à alimentação dos seres humanos e dos animais terá que dobrar no mundo inteiro (Mazoyer& Roudart, 2010).

No modelo agrícola atual, os agrotóxicos são considerados indispensáveis por serem utilizados na agricultura para atender a demanda alimentar, promovendo o controle de pragas, no ante e pós colheita, tornando-se um recurso importante para garantir a expansão da produção agrícola (Sherol et al., 2010).

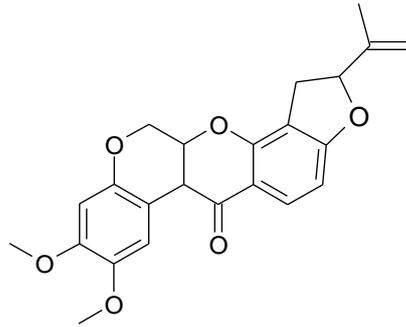
O uso dos agrotóxicos é descrito como uma prática utilizada desde a antiguidade. Em 2500 a.C., os sumérios já utilizavam o enxofre no combate a insetos. O piretro, ou pó da Pérsia, proveniente de flores secas de plantas do gênero *Chrysanthemum cinerariaefolium* e *Chrysanthemum coccineu*, era utilizado desde 400 a.C para controlar piolhos. No século XIV, os chineses começaram a utilizar compostos de arsênio para controlar insetos. Eles também desenvolveram outros métodos de controle de pragas, incluindo o uso de ervas, óleos e cinzas, para tratar sementes e grãos armazenados, bem como compostos à base de mercúrio e arsênio para combater piolhos e outras pragas (Filho, 2010; Braibante, 2012).

No final do século XIX, foram sintetizadas diversas substâncias com o objetivo de controlar diferentes pragas, bem como misturas tais como enxofre e cal, utilizadas no controle da sarna-da-maçã, vetor de fungo. O arsenito de cobre, também conhecido como verde de Paris, foi utilizado para controlar o besouro da batata nos Estados Unidos. Derivados de fluoretos inorgânicos, como o fluoreto de sódio, foi utilizado no controle de insetos como formigas (Braibante, 2012).

Outros exemplos de inseticidas são a nicotina (Figura 2) e a rotenona, substâncias naturais orgânicas. A nicotina, extraída das folhas de fumo (*Nicotiana tabacum*), começou a ser utilizada no século XVII para controlar insetos em jardins.

A rotenona (Figura 6) é isolada de raízes de *Derris elliptica*, planta comum na Malásia e na Indonésia, e de espécies de *Lonchocarpus*, existentes na África e América do Sul e, desde o final do século XIX, e utilizada para o controle de lagartas.

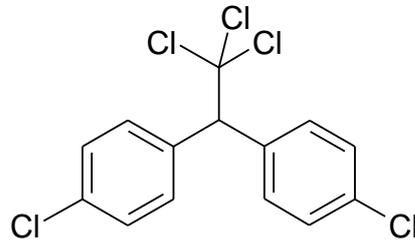
Figura 6. Fórmula estrutural da rotenona.



Ressalta-se também os constituintes químicos presentes no piretro cujos responsáveis pela atividade inseticida são as piretrinas. Em razão da baixa disponibilidade e fotoinstabilidade, as piretrinas não são usadas na agricultura, mas apenas em ambientes domésticos. Esse fato colaborou para o desenvolvimento de produtos fotoestáveis análogos aos produtos naturais, denominados genericamente de piretróides.

Um marco importante na química agrotóxicos ocorreu em 1872, quando o químico Ottmar Zeidler, na Universidade de Estrasburgo, sintetizou a substância diclorodifeniltricloroetano (DDT) (Figura 7). Mais tarde, o químico Paul Müller verificou que esta substância possuía forte ação inseticida. A partir da década de 1940, o DDT foi então muito usado em programas de saúde pública, no combate aos vetores transmissores da malária, tifo, febre amarela e outras doenças (Filho, 2010).

Figura 7. Fórmula estrutural do diclorodifeniltricloroetano.

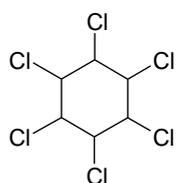


Nas primeiras décadas do século XX, o controle de pragas no Brasil era feito com produtos à base de substâncias inorgânicas ou produtos biológicos. A partir da terceira década do século XX, o aumento da produção agrícola e, principalmente, a diversidade de culturas impuseram a utilização de outras substâncias com melhor poder no combate às pragas (Galli et al., 2006).

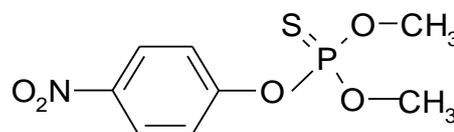
Os agrotóxicos orgânicos sintéticos começaram a ser utilizados em larga escala a partir da década de 1940, durante a Segunda Guerra Mundial. Alguns deles serviram de arma química nas guerras da Coréia e do Vietnã, a exemplo do conhecido “agente laranja” (mistura de dois poderosos herbicidas: ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético e ácido 2,4-diclorofenoxiacético), utilizado como desfolhante. Além de ter contaminado rios, mares e seres vivos nos ambientes em que foi lançado, milhares de soldados e civis morreram em decorrência dos problemas possivelmente causados pela exposição ao agente laranja (Lucchesi, 2005).

Após a Segunda Guerra Mundial os agrotóxicos orgânicos sintéticos passaram a dominar o mercado mundial, o mesmo acontecendo no Brasil. Em 1946, a empresa Eletroquímica Fluminense iniciou a fabricação do fungicida BHC (1, 2,3,4,5,6-hexaclorociclo-hexano). Em 1948, o inseticida Parathion passou ser produzido no Brasil, pela Rhodia, e em 1950 começou a fabricação do DDT em uma fábrica no Rio de Janeiro (Bull & Hathaway, 1986).

Figura 8. Fórmulas estruturais do BHC e parathion



BHC



Parathion metilico

A partir da década de 50, os agrotóxicos, juntamente com os fertilizantes e as máquinas agrícolas, foram os promotores da chamada “Revolução Verde”, época em que foram observadas profundas mudanças na agricultura bem como em seus impactos sobre o ambiente e a saúde humana. Os países que tinham a agricultura como principal base de sustentação econômica, foram fortemente pressionados por organismos financiadores internacionais para adquirirem essas substâncias (Lucchesi, 2005).

No Brasil, os agrotóxicos foram primeiramente utilizados em programas de saúde pública, no combate a vetores e controle de pragas, passando a ser utilizados mais intensivamente na agricultura a partir da década de 1960 forçando a implementação da chamada “modernização da agricultura” (OPAS/OMS, 1996).

A efetiva instalação do parque brasileiro de produção de agrotóxicos foi impulsionada nos anos 70 com a criação do Programa Nacional de Defensivos Agrícolas, instrumento utilizado para a correção das distorções entre o aumento do consumo e o fraco desempenho da produção nacional de agrotóxicos.

Desde então, ocorreu o incremento e a disseminação da utilização dos agrotóxicos no Brasil, considerado um dos maiores consumidores mundiais, resultando em inúmeros problemas, tanto de saúde da população como de contaminação do meio ambiente (OPAS/OMS, 1996).

É inegável que a utilização dos fertilizantes químicos em conjunto com a mecanização das lavouras e a utilização dos agrotóxicos de forma racional no

combate a pragas nas diversas culturas agrícolas proporcionou um amplo aumento de produtividade, atendendo a crescente demanda por alimentos. Assim, o uso de agrotóxicos na agricultura é oficialmente permitido pelos órgãos governamentais, após o devido registro de suas formulações para as diversas culturas nas quais serão utilizados (Menezes Filho, 2005).

Contudo, é importante ressaltar que apesar dos “benefícios”, os agrotóxicos, por outro lado, representam um grande risco tanto à preservação do meio ambiente como à saúde pública e bem-estar da população (Chu et al., 2005; Menezes Filho, 2010).

A utilização inadequada dessas substâncias pode causar sérias conseqüências à saúde, tais como: intoxicações agudas, doenças crônicas, alterações do sistema nervoso central, irritações na pele e nos olhos, problemas respiratórios, câncer em vários órgãos e distúrbios sexuais, como a impotência e a esterilidade, má formação de fetos, até a morte (ANVISA, 2008; IBAMA, 2010; Barbieri, 2006). Podem interferir também no ecossistema alterando significativamente os diversos segmentos da cadeia alimentar, causando mudanças ao meio ambiente.

Embora o uso de agrotóxicos no Brasil pareça ser conduzido de forma dispersa e descontrolada, existe no país uma legislação com normas e critérios estabelecidos, a qual se fosse cumprida pelos fabricantes, comerciantes, órgãos de fiscalização e agricultores, minimizaria consideravelmente os danos por eles provocados (Londres, 2011). Entre os vários assuntos que a Lei dos Agrotóxicos regulamentou (Lei nº 7.802 de 1989) está o registro obrigatório de agrotóxicos. Pelo risco à saúde e ao ambiente, o registro desses produtos exige avaliação e deve estar de acordo com as exigências dos órgãos responsáveis pelos setores da Agricultura, do Meio Ambiente e da Saúde, em seus respectivos Ministérios. Estão registrados no mercado brasileiro 434 ingredientes ativos, que, combinados, resultam em pelo menos 2.400 formulações de agrotóxicos amplamente utilizados nas lavouras. Das 50 substâncias mais usadas no país, 24 já foram banidas nos Estados Unidos, Canadá, Europa e, algumas, mesmo na Ásia (Kugler, H., 2012).

Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Observatório da Indústria dos Agrotóxicos da Universidade Federal do Paraná, em

abril de 2012, enquanto, nos últimos dez anos, o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, o mercado brasileiro cresceu 190%. Ressalte-se que no ano de 2008 o Brasil assumiu a liderança mundial em consumo de agrotóxicos (ANVISA; UFPR, 2012).

As vendas totais de agrotóxicos no Brasil, em 2012, totalizaram US\$ 9,710 bilhões e em 2013 houve um acréscimo de 9,6% em relação ao ano anterior. De acordo com o SINDIVEG, em 2013, entre os agrotóxicos mais vendidos estão os herbicidas, os fungicidas e os inseticidas, como mostrado na Figura 9, a seguir:

Figura 9. Agrotóxicos mais vendidos no ano de 2013.



Fonte: SINDIVEG, 2014.

Na Tabela 3 são mostrados dados do SINDIVEG, referente à distribuição de consumo de agrotóxicos no Brasil por unidade federativa (UF), no período de 2011 a 2013.

Tabela 3. Distribuição do consumo de agrotóxicos no Brasil por unidade federativa.

UF	Valor (U\$) = 1000		
	2011	2012	2013
MT	1.749.144	2.077.814	2.507.964
SP	1.305.690	1.438.900	1.612.631
GO	827.739	1.001.025	1.158.940
MG	708.184	812.455	975.339
BA	662.245	769.197	852.768
MS	402.021	472.000	572.862
MA	123.771	166.616	201.652
OUTROS	2.688.761	2.952.741	3.572.130

Fonte: SINDIVEG, 2014.

Para controlar a exposição humana aos resíduos de agrotóxicos presentes nos alimentos e assegurar a saúde pública, agências reguladoras de vários países têm criado programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos. No Brasil, que é detentor de um grande potencial agrícola e o maior mercado consumidor de agrotóxicos do mundo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou, em 2001, o Programa Nacional de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Este programa tem o objetivo de avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos de origem vegetal que chegam à mesa do consumidor, fortalecendo a capacidade do Governo em atender aos requisitos de qualidade quanto à oferta de alimentos seguros, evitando assim, possíveis agravos à saúde da população.

2.1.4 Efeitos do uso de agrotóxicos na saúde pública e no meio ambiente

Os agrotóxicos constituem um grande grupo de substâncias químicas que podem trazer riscos e danos para a saúde humana e, também, para o meio ambiente. Apesar de os agrotóxicos constituírem uma pequena percentagem dos poluentes totais, não deve haver negligência quanto ao seu uso inadequado. Mesmo que suas quantidades sejam mínimas em comparação às dos minerais no solo, o seu impacto no ambiente é considerável (Silva et al., 2004). É possível estimar o comportamento de um agrotóxico no ambiente desde a sua aplicação até o destino final por meio do estudo das suas propriedades físicas, químicas e biológicas.

As propriedades gerais de cada agrotóxico governam a sua atividade biológica. A natureza, ação e atividade de cada agrotóxico é determinada por sua estrutura molecular, solubilidade em água, pressão de vapor e coeficiente de partição octanol/água. Desta forma, a estrutura molecular da substância determina, parcialmente, o seu grau de interação com o meio ambiente. A presença de grupos funcionais contendo oxigênio (O), nitrogênio (N) e enxofre (S), modificam as propriedades físicas, químicas e biológicas do agrotóxico. Esses grupos geralmente tendem a tornar as substâncias orgânicas mais reativas e biologicamente mais ativas. Alguns agrotóxicos ainda podem apresentar mais de um grupo funcional em sua estrutura e a soma dos efeitos individuais dos múltiplos grupos funcionais determinam, no composto, suas propriedades químicas, físicas e biológicas e, conseqüentemente, seu comportamento e destino final (Silva et al, 2004).

A solubilidade em água de um agrotóxico é um parâmetro importante porque indica a tendência que ele apresenta em ser carregado superficialmente no solo por águas de chuva ou de irrigação e atingir as águas superficiais ou subterrâneas. A solubilidade pode ser definida como a quantidade máxima de uma substância química que se dissolve em determinada quantidade de água pura a uma dada temperatura e pH, podendo ser expressa em mols por litro, gramas por litro ou em porcentagem de soluto / solvente. Esse parâmetro é de fundamental importância nos processos ambientais, uma vez que afeta o comportamento, transporte e destino dos agrotóxicos, especialmente a dispersão/distribuição entre os diversos compartimentos (águas, atmosfera, biota e solo). (Silva et al., 2004; Martins et al., 2013)

A pressão de vapor de um composto é definida como a pressão à determinada temperatura em que a fase vapor está em equilíbrio com a fase líquida. Esta propriedade é uma função do tamanho e dos grupos funcionais presentes na molécula e é a principal propriedade utilizada para prever a sua entrada na atmosfera em concentrações significativas, por meio da volatilização.

O destino de um agrotóxico lançado no ambiente é governado por um conjunto de processos que estão interrelacionados entre si: retenção (adsorção e absorção), transformação (degradação química e biológica), transporte (deriva,

deposição, volatilização, lixiviação e carreamento superficial) (Figura 10) (Silva et al., 2004; Tomita & Beyruth, 2002; Spadotto, 2006).

Figura 10. Destino dos agrotóxicos no meio ambiente.

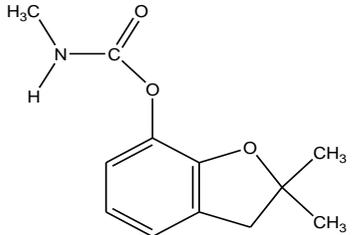
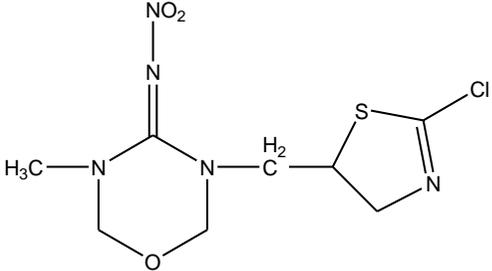
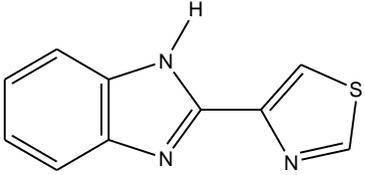


Fonte: Adaptado de Tomita & Beyruth, 2002.

O coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) é definido como a relação da concentração de um agrotóxico na fase de n-octanol saturado em água e a sua concentração na fase aquosa saturada. Esse coeficiente influencia o transporte de uma molécula orgânica, após a sua aplicação, representando um equilíbrio entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas. Como os valores de K_{ow} são muito altos, normalmente são expressos como $\log K_{ow}$. Os agrotóxicos lipofílicos (apolares) apresentam $\log K_{ow} > 4$ e os hidrofílicos (polares) possuem $\log K_{ow} < 4$ (Torres, 2009)

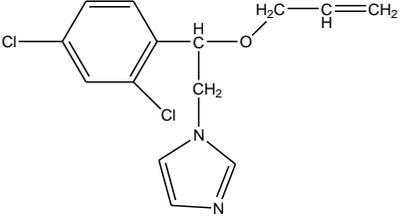
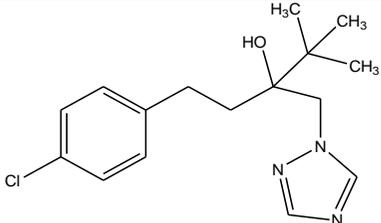
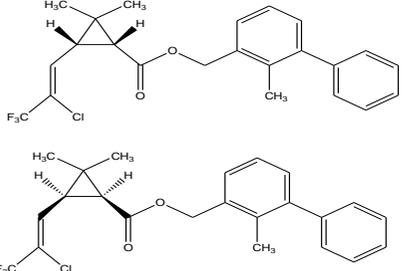
Na Tabela 4 são mostrados o grupo químico, a fórmula estrutural, a fórmula molecular, a massa molar, o pK_a , $\log K_{ow}$, solubilidade em água e pressão de vapor e dos compostos selecionados neste estudo.

Tabela 4. Características físico-químicas dos agrotóxicos selecionados para estudo.

Grupo químico	Composto	Fórmula	Massa Molar	pK _a	LogK _{ow} (20 °C)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	Pressão de vapor (mPa)
Carbamato	 <p>Carbofurano</p>	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221,3	-	1,7	322	8x10 ⁻²
Neonicotinoide	 <p>Tiametoxam</p>	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	291,71	-	-0,13	4100	6,6 x10 ⁻⁶
Benzimidazol	 <p>Tiabendazol</p>	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	201,25	4,73	2,39	30	5,30 x 10 ⁻⁴

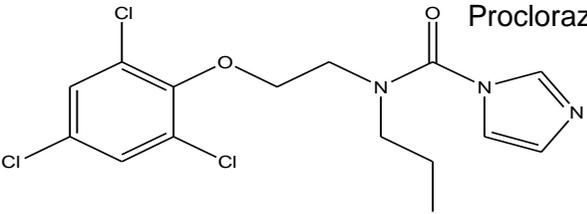
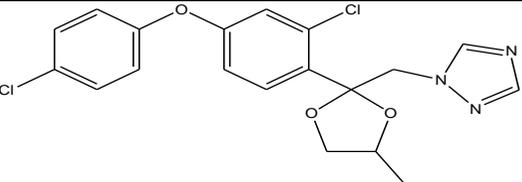
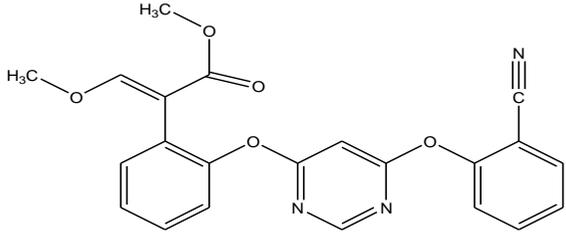
Fonte: IUPAC, 2014

Tabela 4.(Continuação).

Grupo Químico	Composto	Fórmula	Massa Molar	pK _a	LogK _{ow} (20 °C)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	Pressão de vapor (mPa)
Imidazol	 <p>Imazalil</p>	C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O	297,2	6,49	2,56	142	0,158
Triazol	 <p>Tebuconazol</p>	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	307,82	5,0	3,7	36	1,3 x10 ⁻³
Piretróide	 <p>Bifentrina</p>	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂	422,88	-	6,6	0,001	0,0178

Fonte: IUPAC, 2014

Tabela 4. (Continuação).

Grupo Químico	Composto	Fórmula	Massa Molecular	pK _a	LogK _{ow} (20 °C)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	Pressão de vapor (mPa)
Imidazol	 <p>Prochloraz</p>	C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₂	376,7	3,8	3,5	26,5	0,15
Triazol	 <p>Difenoconazol</p>	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	406,26	1,07	4,36	15	3,3 x10 ⁻⁵
Estrobilurina	 <p>Azoxistrobina</p>	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	403,4	-	2,5	6,7	1,1 x10 ⁻⁷

Fonte: IUPAC, 2014

Os agrotóxicos se caracterizam por apresentar uma grande mobilidade, serem tóxicos, danosos para os compartimentos ambientais como o solo, água e ar, além de serem geralmente persistentes. Acumulam-se no solo e na biota ou ainda, podem alcançar as águas superficiais por escoamento e às subterrâneas por lixiviação (IBGE, 2011). A depender da toxicidade e do tempo de permanência no meio ambiente, os agrotóxicos podem interferir em processos básicos do ecossistema, como respiração do solo, ciclo de nutrientes, morte de peixes e aves, bem como a redução de suas populações. Entre os efeitos indesejados relata-se o aumento de resistência por determinadas pragas, ataque a insetos polinizadores ou ainda, desequilíbrios nos sistemas ecológicos, causando assim a eliminação de predadores e competidores naturais de pragas (Soares, 2010; IBAMA, 2010; Peres & Moreira, 2007; Meyer et al., 2007; Medeiros, 2008).

Um dos maiores perigos representados pelos agrotóxicos diz respeito aos efeitos que eles podem provocar à saúde da população, principalmente daquelas que, no campo ou na indústria, ficam expostas ao contato direto. Alguns agrotóxicos demoram de três a quatro anos para degradar e os produtos da degradação podem ser tão prejudiciais quanto a substância original. As pessoas que apresentam maior risco de contaminação pelos agrotóxicos são os aplicadores, preparadores de caldas e responsáveis por depósitos, que tem contato direto com os produtos. Há também os trabalhadores que tem contato indireto ao realizar capinas, roçadas, colheitas etc. Este segundo grupo é o de maior risco, uma vez que o intervalo de reentrada nas lavouras não costuma ser respeitado e estes trabalhadores ignoram o uso dos Equipamentos de Proteção Individual (EPI) (Londres, 2011).

Existem três tipos de intoxicação:

- i) Intoxicação aguda: é aquela cujos sintomas surgem rapidamente, algumas horas após a exposição. Trata-se de exposição, por curto período, a doses elevadas de produtos muito tóxicos;
- ii) Intoxicação subaguda ou sobreaguda: ocorre por exposição moderada ou pequena a substâncias de média ou alta toxicidade.

lii) Intoxicação crônica: caracteriza-se pelo surgimento tardio, aparecendo apenas depois de meses ou anos da exposição a concentrações moderadas ou baixas.

Os consumidores também fazem parte do grupo de risco a sofrer intoxicações causadas pelos agrotóxicos, uma vez que ao longo de vários anos, se alimentam de produtos que podem conter resíduos de agrotóxicos acima dos limites máximos permitidos (Londres, 2011).

Atualmente, no Brasil, o registro dos dados de intoxicação por agrotóxicos é feito por dois sistemas: i) Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) vinculado à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), que tem como principal atribuição coordenar a coleta, a compilação, a análise e a divulgação dos casos de intoxicação e envenenamento notificados no país; e ii) Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) vinculado diretamente ao Ministério da Saúde, que visa realizar a notificação deste agravo (intoxicação por agrotóxicos) e de outros (Bombardi, 2011).

Na Tabela 5 estão os dados a respeito de envenenamentos ocorridos no Brasil no ano de 2011.

Tabela 5. Eventos de envenenamento ocorridos no Brasil, 2011.

Agente/ Circunstância	Acidente Individual	Acidente Coletivo	Acidente Ambiental	Ocupacional	Ingestão de Alimentos	Tentativa de Suicídio
Agrotóxico uso agrícola	1215	82	7	1146	4	2305
Agrotóxico uso doméstico	1626	44	5	116	5	522
Raticidas	894	58	-	6	3	1437
Desinfetantes domiciliares	9231	129	7	452	4	761

Fonte: SINITOX, 2014.

2.1.5 Resíduos de agrotóxicos em alimentos

Nos últimos anos tem havido uma inquietação crescente com relação a presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos, devido aos possíveis efeitos adversos à saúde dos seres humanos se expostos por longos períodos, especialmente em crianças que consomem maiores porções de frutas e hortaliças em relação a massa corporal quando comparados aos adultos (Queiroz et al., 2011).

Um terço dos alimentos consumidos cotidianamente pelos brasileiros está contaminado pelos agrotóxicos (Carneiro et al., 2012). Em geral, os agrotóxicos são empregados na maior parte das culturas, entretanto o que mais preocupa é o grande consumo pela população de determinados alimentos in natura (ANVISA, 2006).

Em 2012, a ANVISA, por meio do PARA, promoveu a coleta de amostras de frutas e verduras, em 26 Unidades Federativas e no Distrito Federal, gerando um total de 1.665 amostras. Das amostras monitoradas, 29% dos resultados foram considerados insatisfatórios por apresentarem resíduos de produtos não autorizados, ou autorizados, mas em concentrações acima dos limites máximos permitidos. O limite máximo de resíduo (LMR) é determinado a partir de dados toxicológicos e da Ingestão Diária Aceitável (IDA), que é a quantidade máxima de agrotóxico que se pode ingerir por dia, ao longo da vida, sem que haja danos à saúde, em alimentos.

A expansão da fruticultura está contribuindo para o crescimento da economia brasileira, sendo uma grande geradora de empregos e de divisas. Na última década a produção brasileira de frutas foi ampliada em 22,49%, de acordo com números oficiais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Com uma produção de aproximadamente 40 milhões de toneladas anuais e uma área plantada aproximadamente de 2,5 milhões de hectares, o Brasil ocupa a terceira posição no ranking mundial dos maiores produtores de frutas, atrás apenas da Índia e da China.

A fruticultura está presente em todas as Unidades da Federação, destacando-se São Paulo, que responde por 40% da produção nacional, o que corresponde a 19,2 milhões de toneladas de um total de 45,0 milhões de toneladas. Em segundo

lugar vem a Bahia com um total de 5,4 milhões de toneladas (Anuário Brasileiro da Fruticultura, 2013).

Com uma produção diversificada e competitiva, a fruticultura ocupa posição de destaque no agronegócio baiano. A grande extensão territorial da Bahia, terras aptas, recursos hídricos abundantes e condições climáticas favoráveis permitem a produção de diversas culturas, destacando-se o mamão, manga, cacau, maracujá, graviola, pinha, coco e guaraná (SEAGRI, 2011).

2.2A Cultura do mamão e a produção brasileira

O mamoeiro é considerado como uma das fruteiras mais cultivadas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo e conseqüentemente o mamão é uma das frutas mais consumidas pelos seres humanos. Por ser uma planta tropical, ele é extremamente sensível às geadas. A temperatura ideal de cultivo esta entre 21 e 33°C, chuvas entre 1.500 a 1.800 mm anuais (caso contrário necessitam complementação com irrigação), e umidade relativa do ar entre 60% e 80%. Seus frutos, conhecidos como mamão ou papaia são excelentes fontes de cálcio, pró-vitamina A, vitamina C (ácido ascórbico) e do complexo B, fonte de sais minerais como cálcio, potássio e magnésio por isso são amplamente utilizados em dietas alimentares (Serrano & Cattaneo, 2010).

Na literatura encontra-se divergência entre autores quanto ao provável centro de origem para a espécie *Caricapapaya* L. Há relatos de que o mamão foi introduzido no Brasil pelos espanhóis, sendo originário de uma região compreendida entre o sul do México e o norte da Nicarágua. Pelo fato de apresentar relativa facilidade de adaptação tem dado a vários países a falsa impressão que o mamoeiro originou-se naquela região. De um total de 22 espécies do gênero, *Carica papaya* L. é o mais cultivado. Essa espécie distribui-se por várias regiões tropicais e subtropicais do mundo (Mendes et al., 1996).

As variedades de mamoeiro são classificadas em dois grupos principais: Solo e Formosa. O grupo Solo, no qual se encontra a maioria das cultivares de mamoeiro utilizadas no mundo, apresentam frutos com peso médio de 350 a 600 g é popularmente conhecido como mamão Papaya, Havaí ou Amazônia. O grupo

Formosa é composto por mamoeiros híbridos que apresentam frutos com peso médio de 800 a 1.100g (Figura 11).

Figura 11. Mamão papaia e mamão formosa. Imagem de 03/06/2014



Mamão papaia



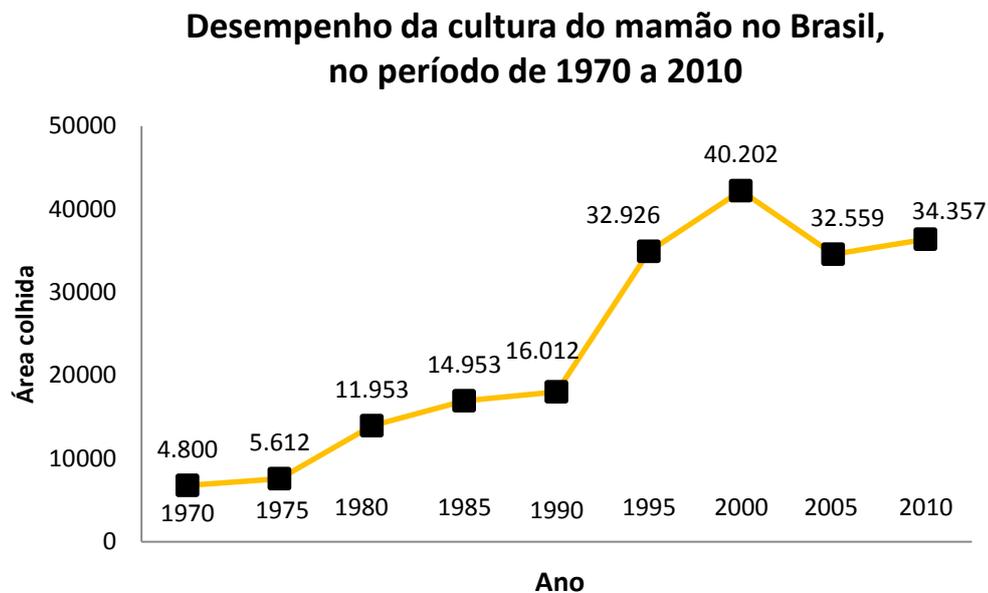
Mamão formosa

Economicamente, a cultura do mamão atende principalmente ao mercado de consumo “*in natura*”. Entretanto, sua industrialização, por meio do aproveitamento integral do fruto, oferece extensa gama de produtos e subprodutos, que podem ser utilizados na indústria de alimentos, têxtil, farmacêutica e ração animal. A polpa do fruto maduro é usada na indústria para produção de conservas, geléias, sucos e néctares. No Brasil, os principais produtos industrializados são compotas, purê asséptico e fruta cristalizada. Suas folhas e frutos produzem diversas proteínas e alcalóides com importantes aplicações farmacêuticas e industriais. Neste contexto, encontra-se a papaína, uma enzima proteolítica particularmente importante que é encontrada no látex leitoso de frutos de mamão verde e pode ser associada na proteção contra predadores frugívoros e herbívoros.

A cultura do mamão vem ocupando lugar de destaque dentre as frutas cultivadas no Brasil. A produção mundial do mamão representa 10% da produção mundial de frutas tropicais, girando em torno de oito milhões de toneladas, das quais 39% são produzidas na América Latina e Caribe. Os principais produtores mundiais são o Brasil, México, Nigéria, Índia e Indonésia. Dados do IBGE revelam que o Brasil produziu aproximadamente 1,87 milhão de toneladas no ano de 2010. Na

Figura 12 a seguir, observa-se o aumento da produção de mamão no Brasil no período de 1970 a 2010.

Figura 12. Desempenho da cultura do mamão no Brasil.



Fonte: Embrapa, 2012.

Os principais produtores são os estados da Bahia, Espírito Santo, Rio Grande do Norte e Ceará, como pode ser visto na Figura 13, com destaque para a Bahia que lidera o ranking da produção nacional.

Figura 13. Produção agrícola municipal, 2012.



Fonte: Embrapa, 2012.

A região nordeste do Brasil é reconhecida pela vasta produção de mamão. No estado da Bahia a produção está concentrada no Extremo Sul, visto que a região possui condições climáticas favoráveis. Os principais municípios produtores são Alcobaça, Belmonte, Caravelas, Eunápolis, Guaratinga, Itabela, Itamaraju, Mucuri, Nova Viçosa, Porto Seguro, Prado, Santa Cruz Cabrália e Teixeira de Freitas (Araújo et al., 2010).

Os principais problemas da cultura do mamoeiro decorrem da sua suscetibilidade a pragas e doenças, ocasionando perdas tanto na produção como na fase pós-colheita. Dentre as causas, destacam-se as doenças ocasionadas por fungos que são responsáveis por 80 a 90% do total de perdas causadas por fitopatógenos, (Dantas et al., 2003).

Dentre as pragas de importância econômica do mamoeiro destaca-se a doença fúngica denominada pinta preta ou varíola, causada pelo fungo *Asperisporium caricae*, e o ácaro rajado *Tetranychus urticae*. A varíola é a doença fúngica mais comum na cultura, ocorrendo tanto em pomares comerciais como em pomares domésticos, o que dificulta um controle mais racional.

A infecção ocorre, comumente, na face inferior das folhas mais velhas, como mostra a Figura 14. Os primeiros sintomas nos frutos são verificados quando estes

ainda pequenos e verdes, apresentam áreas circulares com “aspecto encharcado”, em cujo centro nota-se pontos branquiçados, os quais posteriormente tornam-se pardacentos e salientes.

Pela alta frequência que ocorre e pelos danos que pode ocasionar ao mamoeiro, particularmente diminuindo o valor comercial dos frutos, a doença constitui-se em um dos mais sérios problemas dessa cultura. As medidas de controle recomendadas baseiam-se em práticas potencialmente agressivas ao meio ambiente, como é o caso da aplicação de fungicidas. Em certas regiões, dependendo das condições climáticas, são exigidas até dez pulverizações ao ano para garantir um controle eficiente (Filho et al., 2007).

Figura 14. Lesões da variola na face inferior da folha do mamoeiro.



Fonte:AGROFIT, 2013.

O ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Figura 15) é um artrópode que também está associado à cultura do mamoeiro. O ataque deste ácaro, que apesar de pequeno é visível a olho nu, ocorre preferencialmente nas folhas mais velhas. A presença da praga leva a um amarelecimento do limbo foliar, que é a superfície achatada e ampla, com necrose e queda prematura das folhas.

Figura 15. Ácaro rajado.



Fonte: Toda fruta

Por ser a cultura do mamoeiro altamente susceptível a pragas e doenças, a aplicação de agrotóxicos é realizada com grande freqüência, caracterizando um tratamento químico bastante intenso. Atualmente 37 princípios ativos são registrados e autorizados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para serem utilizados na cultura do mamão (AGROFTI, 2013), os quais necessitam ser estudados e monitorados.

2.3 Métodos para análise de resíduos de agrotóxicos.

Os produtos agrícolas como frutas, vegetais e cereais são monitorados pelo MAPA, apresentando freqüentemente resíduos de agrotóxicos de diversas classes. A determinação desses resíduos requer uma etapa prévia de preparo de amostra, que é uma etapa crucial do método analítico, tendo em vista a complexidade das matrizes, além do fato de os analitos apresentarem propriedades químicas distintas e estarem em concentrações muito baixas. Assim, é de fundamental importância o desenvolvimento de métodos multirresíduos capazes de promover a remoção dos interferentes sem que haja perda dos analitos de interesse para que os resultados das análises não sejam comprometidos (Prestes et al., 2009).

A determinação de resíduos de agrotóxicos desempenha um papel muito importante para a estimativa da exposição humana e do meio ambiente a esses compostos, permitindo avaliar a conformidade da produção com as boas práticas agrícolas, possibilitando decisões regulatórias comerciais visando garantir a segurança alimentar (Prestes et al., 2009). Nos últimos anos, diversos métodos analíticos foram desenvolvidos para a determinação de resíduos de agrotóxicos em produtos oriundos da agricultura. É crescente o interesse por procedimentos de preparo de amostras que sejam rápidos, exatos, precisos, livres de solventes, econômico e de fácil automação (Beyer & Biziuk, 2008).

Considerando o número elevado de resíduos de agrotóxicos encontrados em alimentos, atualmente observa-se uma tendência na realização de trabalhos científicos, com pesquisas que envolvem o desenvolvimento, a otimização e validação de métodos analíticos. Estes métodos são empregados, não somente para determinar uma ou duas substâncias na matriz de interesse, mas sim, para a determinação simultânea de muitos compostos de diferentes classes em uma única análise, sendo então denominada de determinação de multirresíduos de agrotóxicos (Jardim & Andrade, 2009).

As técnicas de extração assistida por microondas (MAE), extração acelerada por solvente (ASE), dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), microextração em fase sólida (SPME), entre outras são utilizadas para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Entretanto, elas apresentam algumas desvantagens, tais como: alto custo, baixa frequência analítica, baixas recuperações, faixa linear de trabalho curta, baixa reprodutibilidade e não adequadas para amostras com alto teor de lipídios. Os pressupostos fundamentais para qualquer método que vise a determinação de resíduos de agrotóxicos é que o mesmo garanta resultados exatos, precisos e com baixos limites de detecção para uma gama de analitos, que remova os possíveis compostos interferentes da amostra, que seja robusto, de baixo custo, rápido, de fácil execução e seguros (Wilkowska & Biziuk, 2010). Com o intuito de superar as limitações impostas pelos métodos multirresíduos existentes, Anastassiades et al. introduziram um novo procedimento de preparo de amostras para extração e determinação de resíduos de pesticidas denominado QuEChERS (Prestes et al., 2009). O termo é um acrônimo que advém do inglês **Q**uick, **E**asy,

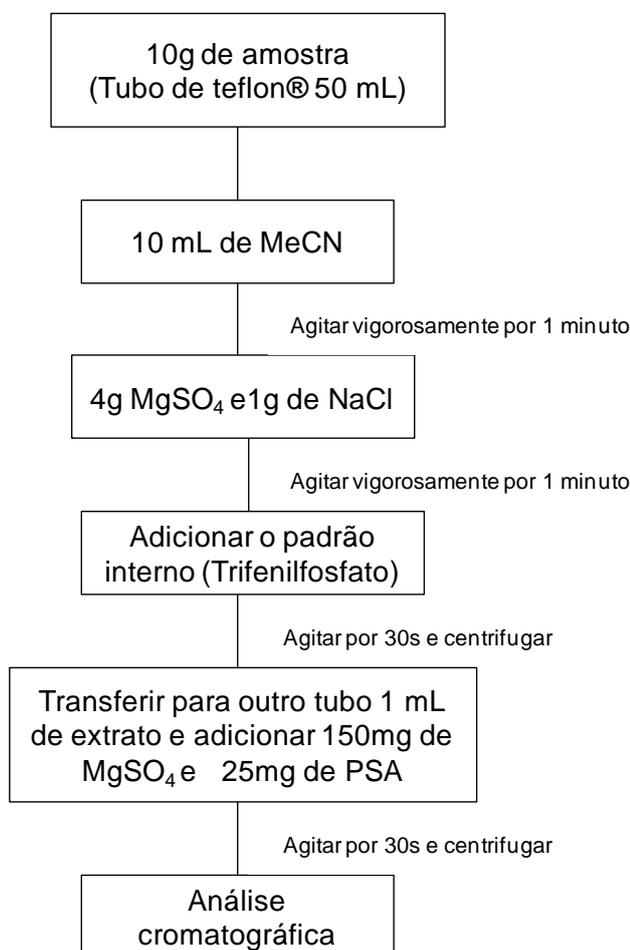
Cheap, Effective, Rugged, Safe, que na língua portuguesa significa **rápido, fácil, econômico, eficaz, robusto e seguro**. O método QuEChERS apresenta os requisitos necessários para um bom método de extração de analitos de amostras complexas, apresentando melhor eficiência do que os métodos tradicionais, os quais são geralmente mais complexos e demandam maior tempo de tempo.

2.3.1 Método QuEChERS

Em 2003, Anastassiades et al. desenvolveram um novo método de preparo de amostras para extração e determinação de resíduos de agrotóxicos com o objetivo de superar limitações práticas dos métodos de extração multirresíduos disponíveis na época. Os autores se questionaram quanto às condições de análise existentes, pois alguns laboratórios usavam métodos desenvolvidos há 30 anos quando as necessidades analíticas eram outras (Lehotay et al., 2010). A introdução de novos métodos mais rápidos e eficazes tornou-se essencial para melhoria da qualidade das análises, bem como para a eficiência do laboratório (Anastassiades et al., 2003).

Deste modo, um novo procedimento de preparo de amostras para extração de resíduos de pesticidas foi introduzido e denominado QuEChERS, o qual envolve uma extração inicial com acetonitrila seguida de uma etapa de adição de sais secantes ($MgSO_4$ e $NaCl$) e posterior etapa de clean-up com SPE dispersiva (Romero-gonzález et al., 2008). Durante o seu desenvolvimento, foi dada grande ênfase para a obtenção de um procedimento dinâmico, que pudesse ser aplicado em qualquer laboratório, devido à simplificação das etapas. A Figura 16 mostra um fluxograma original representativo do método QuEChERS.

Figura 16. Fluxograma representativo do método QuEChERS original.



Fonte: Prestes et al., 2009

Fatores envolvendo a seleção do solvente de extração foram discutidos durante o estudo para desenvolvimento do método. Muitos aspectos foram considerados, incluindo a compatibilidade com os analitos, habilidade de extração de um amplo espectro de agrotóxicos com diferentes polaridades, seletividade, capacidade de evitar a extração dos interferentes (componentes da matriz), miscibilidade com a água e capacidade de partição usando aditivos, compatibilidade com as diferentes técnicas cromatográficas, segurança e custo (Maštovská et al., 2004). Os solventes mais utilizados para extração multirresíduo de agrotóxicos são: acetato de etila, acetona e acetonitrila. Cada um deles apresenta vantagens e desvantagens e as questões-chaves são: qual o mais adequado para a análise de

resíduos de agrotóxicos por cromatografia gasosa (CG) e pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e qual deve ser evitado e por quê? (Prestes et al., 2009).

O acetato de etila demonstrou ser um solvente com características universais, uma vez que possui boa capacidade para extrair agrotóxicos de diferentes classes em diversos tipos de amostras, porém os percentuais de recuperação de agrotóxicos com caráter básico são baixos devido a problemas de degradação, sendo necessária a adição de hidróxido de sódio para aumentar a eficiência (Prestes et al., 2009).

Acetona e acetonitrila são miscíveis com água e promovem a extração em uma fase única quando em contato com a matriz. Quando uma extração é realizada com acetona há necessidade de adição de solventes apolares para que ocorra a separação entre as fases orgânica e aquosa. O mesmo não é necessário quando se utiliza acetonitrila, uma vez que a adição de sais ao extrato faz com que ocorra tal separação (Prestes et al., 2009).

A utilização da acetonitrila proporciona a extração de uma ampla faixa de pesticidas com diferentes polaridades e, além disso, possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos. (Maštovská et al., 2004). Outra grande vantagem é que acetonitrila apresenta compatibilidade do extrato final com a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e com Cromatografia Gasosa (Prestes et al., 2009). Por esse motivo, os autores escolheram a acetonitrila como o solvente de extração para o método QuEChERS.

A utilização de sais secantes para melhorar a recuperação de pesticidas polares foi descrita por Anderson et al., os quais utilizaram sulfato de sódio anidro. Adição dos sais sulfato de magnésio anidro ($MgSO_4$) e cloreto de sódio (NaCl) propicia melhores percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que, a diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, assim como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (Sherol, 2010). O $MgSO_4$ anidro tem a capacidade de remover água residual remanescente da fase orgânica mais eficientemente do que outros sais. Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40

e 45°C da amostra durante as etapas de extração, favorecendo o isolamento especialmente dos compostos apolares (Prestes et al., 2009).

Um novo método de *clean-up* denominado extração em fase sólida dispersiva (Dispersive Solid Phase Extraction, D-SPE) foi proposto juntamente com o método QuEChERS, etapa em que 1 mL do extrato é colocado em contato com uma mistura contendo 25 mg do adsorvente PSA (do inglês, *primary secondary amine*) e 150 mg de MgSO₄. Essa forma de realizar a limpeza do extrato permite que o *clean-up* e a redução de água residual sejam efetuados simultaneamente e com maior rapidez, ao contrário dos métodos já existentes que usam cartuchos ou colunas (Prestes et al., 2009). O PSA é um adsorvente que retém os interferentes da matriz, tais como ácidos graxos livres e outros compostos polares. Após a realização dessa etapa, o extrato fica pronto para ser injetado no sistema cromatográfico sem o risco de diminuição da vida útil dos injetores.

Entre as principais vantagens do método com relação aos métodos tradicionais de preparo de amostra estão: preparo de um grande número de amostras em um tempo reduzido; redução no volume de solventes orgânicos; simplicidade de execução (Rodrigues, 2011).

O método QuEChERS foi validado com sucesso em vários laboratórios e é tido como método oficial pela AOAC Internacional e pelo *European Committee for Standardization* (Lehotay et al., 2011). É um método muito flexível e serve de modelo para modificação de acordo com as propriedades do analito, a matriz a ser estudada e a técnica analítica disponível (Lehotay, 2010). Por esse motivo, desde o seu desenvolvimento, ele vem sofrendo várias modificações com o objetivo de ser empregado como um método multirresíduo para a extração de agrotóxicos em alimentos, usando técnicas cromatográficas acoplada à espectrometria de massas (Rodrigues, 2011).

Parket al. (2011) fizeram uma adaptação no método QuEChERS para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos cozidos, incluindo batatas cozidas, rabanetes e arroz. Foram utilizados 10,0 g da matriz, 2 mL de água destilada, 15,0 mL de acetonitrila e 150 µL de ácido acético (HAc); 6,0 g de MgSO₄ e 1,5 g de acetato de sódio (NaAc); realizada agitação por 1 min. seguida da

centrifugação e, etapa de clean-up do extrato utilizando 900 mg de MgSO₄ e 300 mg de PSA; evaporação e ressuspensão com 1 mL de hexano:acetona (8:2 v/v). A técnica empregada para determinação dos compostos foi GC- μ ECD. A faixa de LOQ variou de 0,0125 -1,0 μ g kg⁻¹ e os valores de recuperação variaram entre 68.6 e 130.0% com RSD inferior a 20%

O método QuEChERS modificado foi empregado também da análise de resíduos de agrotóxicos em banana (González-Curbelo et al., 2011) e vinho (Walorczyk et al., 2011).

2.4 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)

A cromatografia, devido a sua versatilidade, eficiência e sensibilidade, é amplamente utilizada na análise de alimentos e de outras matrizes. Dentre as várias técnicas cromatográficas utilizadas, destacam-se cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Collinset al., 2006).

A cromatografia gasosa é uma das principais técnicas para a separação, identificação e quantificação de substâncias orgânicas em amostras complexas. A miniaturização e modernização dos instrumentos, com o desenvolvimento de detectores altamente sensíveis e a utilização de técnicas acopladas como cromatografia gasosa – espectrometria de massas (GC-MS) permitiu um considerável aumento da seletividade e eficiência desta poderosa técnica de análise química.

A incorporação de novas tecnologias permitiu a construção de colunas capilares de sílica fundida com fases estacionárias imobilizadas e termicamente estáveis, tornaram a CG é uma técnica capaz de resolver as mais complexas e difíceis separações. Também, permitiram a diminuição dos limites de detecção, maior rapidez, precisão e exatidão na identificação e quantificação de constituintes químicos de amostras de natureza variada. (Lanças, 2004).

O acoplamento da cromatografia com a espectrometria de massas combina as vantagens da cromatografia com as vantagens da espectrometria de massas e é

bastante utilizado na identificação e quantificação dos mais diversos constituintes químicos presentes em sistemas naturais e biológicos. A sensibilidade do espectrômetro de massas permite a obtenção de espectros de massa de compostos em nível traço (amostras com concentrações muito baixas de analitos) (Vékey, 2001). Por essa possibilidade de se obter uma grande quantidade de informação sobre a estrutura química, a técnica de GC-MS é geralmente utilizada para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos, visto que os analitos de interesse encontram-se em concentrações muito baixas.

2.5 Efeito de Matriz em GC-MS

Métodos altamente seletivos podem resultar em cromatogramas sem qualquer interferência visível sob a forma de picos cromatográficos adicionais ou como bandas largas. No entanto, os componentes da matriz podem co-eluir com os analitos de interesse causando uma mudança na eficiência de ionização, fazendo com que esta seja suprimida ou enriquecida. Esse efeito é muito comum quando se trabalha com matrizes complexas, como frutas, vegetais, sucos, vinho, tecidos animais, leite humano, solos, entre outros, e é conhecido como efeito de matriz (Nollet et al., 2010).

O efeito de matriz freqüentemente deteriora a precisão do método analítico. Os constituintes da amostra podem influenciar significativamente na resposta do detector por espectrometria de massas (EM) e, conseqüentemente, nas taxas de recuperação, podendo gerar valores acima de 100% e alterações na análise cromatográfica como erro na identificação do analito de interesse (Nollet et al., 2010).

Quando a solução padrão é analisada por cromatografia gasosa, somente os analitos de interesse são introduzidos na coluna cromatográfica e conseqüentemente analisados. Na análise do extrato, ocorre uma competição entre os componentes da matriz e os analitos de interesse, considerando que ambos são introduzidos na coluna cromatográfica. Essa competição gera mudança na eficiência de ionização e pode resultar na supressão ou aumento da ionização levando a uma superestimação ou minimização dos resultados.

O efeito de matriz depende fortemente da natureza química do analito a ser determinado e da sua concentração na amostra, bem como do procedimento de preparo da amostra. Agrotóxicos com características polares são mais susceptíveis ao efeito de matriz. Taxas de recuperação aparentemente mais altas e com baixa precisão são observadas nos agrotóxicos com essa característica. A intensidade do efeito de matriz para um dado agrotóxico é influenciada pela natureza da amostra e pelas características dos seus compostos (tamanho das moléculas, polaridade, estabilidade térmica, volatilidade, etc.). A determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos requer etapas prévias de tratamento da amostra, visto que as medidas são efetuadas em baixas concentrações tornando as interferências problemas freqüentes que devem ser considerados (Prestes et al., 2009).

Por esse motivo, realiza-se o procedimento de limpeza do extrato através do método de extração em fase sólida dispersiva (Dispersive Solid Phase Extraction, D-SPE). Nessa etapa, são empregados adsorventes que proporcionam a redução do efeito de matriz pela afinidade que apresentam com os interferentes da amostra, como por exemplo, ácidos graxos, clorofila, esteróides etc. Os adsorventes comumente empregados são: amina primária-secundária (primary secondary amine, PSA), carbono grafitizado (Grafitized Carbon Black, GCB), octadecilsilano (C18) e Florisil [Mg₃Al₂(SiO₄)₁₀]. A realização da limpeza do extrato com a utilização dos adsorventes, também conhecida como clean-up, é muito importante para a identificação e quantificação dos analitos de interesse, pois elimina os interferentes da matriz e aumenta a sensibilidade (González et al., 2008).

2.6 Desenvolvimento de planejamento experimental

A determinação de constituintes químicos em amostras complexas e em baixas concentrações exige o uso de técnicas analíticas capazes de idealmente separar, identificar e determinar quantidades cada vez menores de analitos com alto grau de precisão e exatidão. Isso é possível pelo uso de equipamentos modernos, com amplos recursos computacionais.

A otimização de experimentos é um recurso amplamente utilizado com o objetivo de alcançar melhores resultados: menor tempo de análise, melhor seletividade, maior sensibilidade, menor custo e menor impacto para o ambiente em

decorrência do uso de reagentes, insumos e métodos menos agressivos e em quantidades reduzidas. Para obter-se um bom método, geralmente é necessário a avaliação de vários parâmetros que interferem diretamente nos resultados. O principal desafio no desenvolvimento do método é obter o melhor resultado empregando-se um número reduzido de experimentos.

A otimização pode ser feita monitorando a influência de uma variável por vez, conhecido como planejamento univariado, no qual o tempo gasto e o número de análises são maiores. Ressalta-se também, que o custo é maior além da impossibilidade de interpretação de possíveis interações entre as variáveis, resultando em uma otimização muitas vezes ineficiente. Por outro lado, as técnicas envolvendo o planejamento multivariado, por meio da quimiometria, permitem avaliar um maior número de variáveis que interferem no processo de forma simultânea, envolvendo um menor tempo e um menor número de experimentos. Por essa razão, são preferencialmente utilizadas na otimização de procedimentos e métodos analíticos (Medeiros, 2008).

A decisão sobre qual é a variável mais importante é feita, geralmente, com base nos critérios que são mais subjetivos. Os trabalhos em quimiometria podem ser agrupados em três áreas principais: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões (métodos de análise exploratória e classificação) e calibração multivariada (Netoet al., 2006).

Uma das técnicas multivariadas mais conhecidas é o planejamento fatorial, no qual estão envolvidos um determinado número de fatores (ou variáveis), cada um deles presentes em diferentes níveis. A observação dos efeitos das variáveis e das interações entre elas é de extrema importância para entender os processos que estão sendo monitorados em um determinado sistema. No planejamento fatorial completo, cada possível combinação dos níveis dos fatores precisa ser testada para se determinar o quanto o processo ou experimento em estudo é afetado por cada variável (Neveset al, 2002). Sendo assim, o planejamento fatorial completo é o planejamento simultâneo mais comum que pode ser aplicado. Entretanto, o número de experimentos pode ser reduzido sem que haja perda de informação por meio da utilização do planejamento fatorial fracionário.

No planejamento fatorial fracionário, com quatro ou mais fatores, os termos de interação de ordem mais elevada podem ser ignorados e somente os efeitos principais e as interações de dois fatores serão avaliados. Neste caso, apesar de o número de experimentos ser bastante reduzido, são geradas informações bastante relevantes sobre o processo analítico (Medeiros, 2008). Usando planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos, os pesquisadores podem obter do sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos. As informações obtidas através do planejamento fatorial permitem a otimização do método estudado.

Os métodos estatísticos multivariados mais utilizados na química em geral, podem ser convenientemente classificados de acordo com os experimentos que serão executados. O planejamento requer que o usuário forneça os valores mínimo e máximo para cada fator do domínio experimental a ser investigado (Ferreira et al., 2007).

2.7 Parâmetros de validação na análise de resíduos de agrotóxicos

O desenvolvimento de métodos analíticos constitui a etapa extremamente relevante na análise de resíduos de agrotóxicos (Brito et al., 2002). Para garantir que um método forneça informações confiáveis e interpretáveis, ele deve ser validado. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento. A necessidade de certificar a qualidade das análises químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida (Ribani et al., 2004). O processo de validação consiste na avaliação de figuras de mérito como seletividade, linearidade, faixa linear de trabalho, curva analítica, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez (Brito et al., 2002, Ribani et al., 2004, INMETRO, 2010). É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios para demonstrar, por meio da validação, que os métodos que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (INMETRO, 2010).

Para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos toma-se como base os Limites Máximos de Resíduos (LMR), estabelecidos pela legislação nacional e

internacional para cada analito associado a matrizes específicas. No Brasil, a ANVISA e o INMETRO são as agências credenciadas para verificar a competência de laboratórios. Estes órgãos disponibilizam instruções para o procedimento de validação do método analítico, respectivamente, a resolução ANVISA RE Nº 899, DE 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE 008, de 03 de fevereiro de 2010.

Na Tabela 6 são comparados os critérios adotados pela ANVISA e INMETRO. (Brito et al., 2002).

Tabela 6. Parâmetros de validação adotados pelo INMETRO e pela ANVISA.

INMETRO	ANVISA
Especificidade/Seletividade	Especificidade/Seletividade
Faixa de trabalho e Faixa linear de trabalho	Intervalos da curva de calibração
Linearidade	Linearidade
Limite de detecção (LOD)	Curva de calibração
Limite de quantificação (LOQ)	Limite de detecção (LOD)
Sensibilidade (inclinação da curva)	Limite de quantificação (LOQ)
Exatidão e tendências	Exatidão
Precisão	Precisão
Repetibilidade	Repetibilidade (precisão intra-corrída)
Precisão intermediária	Precisão intermediária (Precisão inter-corrída)
Reprodutibilidade	Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)
Robustez	Robustez
Incerteza de medição	

Fonte: Ribani et al., 2004

A **seletividade** é a capacidade que o método tem de medir, de forma inequívoca, uma substância química em presença de outros componentes que podem interferir na sua determinação. A seletividade pode ser avaliada comparando a matriz isenta da substância de interesse com a matriz adicionada do padrão. (Ribani et al., 2004).

A **linearidade** corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear (Ribani et al., 2004). A equação de reta que descreve uma curva analítica pode ser expressa pela Equação 1.

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

onde:

y = resposta medida (altura ou área do pico)

x = concentração do analito

a = coeficiente angular (inclinação da curva)

b = coeficiente linear (intersecção da curva com o eixo y)

A resolução RE N° 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA recomenda que sejam analisadas no mínimo seis concentrações diferentes na construção da curva analítica e que, para a determinação da mesma, deve-se analisar amostras extraídas da matriz apropriada.

A **faixa linear de trabalho** de um método analítico é a faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho (INMETRO, 2010).

O **limite de detecção (LOD)** corresponde à menor concentração do analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. O LOD pode ser obtido pelo método visual,

pelo método relação sinal ruído e pelo método baseado em parâmetros da curva analítica (Ribani et al.,2004, INMETRO, 2010).

O **limite de quantificação (LOQ)** corresponde à menor concentração de um analito que pode ser quantificada com exatidão aceitávelutilizando um determinado procedimento experimental.Os mesmos critérios de LOD podem ser adotados para o LOQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LOQ também pode ser calculado utilizando o método visual, o método da relação sinal - ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica (Ribaniet al., 2004; INMETRO, 2010).

A **exatidão** de um método analíticorepresenta o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão. O número de ensaios pode variar segundo a legislação ou diretrizes adotadas e também com as características da pesquisa. A ICH, a ANVISA e o INMETRO estabelecem que a exatidão deve ser medida a partir de um mínimo nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração (ANVISA, 2003; Ribani et al., 2004; INMETRO, 2010).

Os ensaios de recuperação são os mais aplicados para o estudo da exatidão, sendo definido como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na proporção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. É expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito adicionado à amostra (ANVISA, 2003; Ribani et al., 2004, INMETRO, 2010).

A **precisão** é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, ou seja, o mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento

(utilizado sob as mesmas condições, mesmo local, com repetições em curto intervalo de tempo. O resultado pode ser expresso através do coeficiente de variação (CV, usualmente expresso em %), também conhecido como desvio padrão relativo (RSD), que é calculado de acordo com a equação a seguir (ANVISA, 2003; Ribani et al., 2004; INMETRO, 2010):

$$CV (\%) \text{ ou } RSD (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (2)$$

onde:

s = desvio padrão

\bar{x} = concentração média determinada

Para o estudo da repetitividade o INMETRO recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão, a ICH e ANVISA sugerem que a repetitividade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações, cobrindo o limite especificado do procedimento ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado (ANVISA, 2003; Ribani et al., 2004; INMETRO, 2010).

A **precisão intermediária** indica o efeito das variações dentro do mesmo laboratório devido a eventos específicos como diferentes dias, diferentes analistas, diferentes equipamentos ou uma combinação desses fatores. O principal objetivo da precisão intermediária é verificar se, de fato, no mesmo laboratório, o método fornecerá os mesmos resultados. O número de procedimentos para avaliar a precisão intermediária segue a mesma recomendação da ANVISA e ICH para avaliação da repetitividade (ANVISA, 2003; Ribani et al., 2004; INMETRO, 2010).

A **reprodutibilidade** corresponde ao grau de concordância entre os resultados de medições de uma mesma amostra, obtidas em laboratórios diferentes, sendo também, denominada de precisão inter-laboratorial (ANVISA, 2003; Ribani et al., 2004; INMETRO, 2010).

A **robustez** de um método analítico mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações. Ou seja, um método pode ser considerado robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros analíticos. A robustez de um método de cromatografia gasosa, por exemplo, pode ser avaliada pela programação da temperatura e pela natureza do gás de arraste. As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (ANVISA, 2003; Ribani et al., 2004; INMETRO, 2010).

CATÍTULO 3 – PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos e materiais

3.1.1 Equipamentos

Durante a execução do trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Cromatógrafo a gás modelo GC2010 Plus acoplado a um detector de massas do tipo quadrupolo modelo GCMS-QP2010, equipado com injetor automático modelo AOC-20i (Shimadzu), com as seguintes características principais:

Ionização por impacto de elétrons (IE) com energia de 70 eV;

Faixa de varredura (Scan range): 35 - 700u;

Analisador do tipo quadrupolo;

Processador de dados (software) Lab Solutions (GCMS Solution);

Banco de dados NIST 08 e GCMS PESTICIDES 3.01

- Banho de ultra-som modelo USC 1800 (Unique).
- Balança analítica modelo AUY220 com precisão de 0,1 mg (Shimadzu analytical);
- Vortex modelo V1 IKA®;
- Centrifuga refrigerada modelo MPW-351R, ref. 10351R (Med. Instruments)

Figura 17. Sistema GC-MS utilizado na determinação e otimização das condições de extração dos agrotóxicos na matriz mamão.



3.1.2 Solventes

Os solventes orgânicos utilizados na extração dos resíduos de agrotóxicos pelo método QuEChERse na preparação de soluções padrões foram todos de alta pureza:

- Acetonitrila, grau HPLC, ref. 9012-03 (J.T. Baker);
- Acetona, grau HPLC, ref. 9002-03 (J.T. Baker).

3.1.3 Padrões

Padrões certificados de carbofuran, tiametoxan, tiabendazol, imazalil, tebuconazol, bifentrina, procloraz, difenoconazol, e azoxistrobina foram adquiridos da Fluka Analytical todos com grau de pureza superior a 97,0%.

3.1.4 Soluções padrão e de trabalho

As soluções-padrão de estoque foram preparadas com concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em acetona e foram armazenadas em freezer a -18°C . A partir destas foram preparadas soluções-padrão de trabalho em acetona com concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada composto. As soluções de trabalho também foram armazenadas no freezer a -18°C e utilizadas no máximo por três semanas, em função da sua degradação. Para construção das curvas analíticas essas soluções foram diluídas também com acetona, nas concentrações que variaram de 100 a 4800 ng mL^{-1} , as quais foram diluídas nas concentrações de 25 a 1200 ng mL^{-1} .

3.1.5 Gases especiais

Foram utilizados os seguintes gases especiais:

- Hélio ultra-puro (UP), 5.0 analítico (White Martins), para as análises por cromatografia gasosa;
- Nitrogênio comercial, 4.6 FID, (White Martins), para pré-concentração dos extratos das amostras.

3.1.6 Vidraria

Foi empregada a vidraria de uso comum em laboratório de química analítica, tais como:

- Balões volumétricos de 2, 5, 10 e 50 mL;
- Pipeta volumétrica de 5 mL
- Erlenmeyer de 250 mL; dentre outros.

3.1.7 Outros materiais

Foram utilizados também, os seguintes materiais:

- Extran Neutro[®], ref. 107553 (Merck);
- Seringa de vidro de 10 µL para análise por CG (Hamilton);
- Seringa descartável de 5 mL (BD Plastipack[®]);
- Frasco de amostra (vial), de 2,0 mL, tampa com orifício em polipropileno e septo de PTFE/Silicone, ref. 29109-0 (Supelco);
- Frasco de amostra âmbar de 10 e 50 mL (Supelco);
- Tubos para centrífuga com capacidade para 50 mL (Global Trade Technology)
- Membrana filtrante de PTFE 0,45 µm de diâmetro de poro e 13 mm de diâmetro (VertiClean[™]);
- Micropipetas 2-200 µL, 100-1000µL, 1000-5000 µL (Discovery Comfort)
- Cloreto de sódio 99.0% de pureza (Qhemis)
- Sulfato de magnésio anidro, citrato de sódiodihidratado, Citrato de sódio sesquihidratado (Sigma Aldrich)
- Primary-Secondary Amine (PSA), Octadecilsilano (C18), Graphitized Carbon Black (GCB), Florisil (Agilent Technologies);
- Espátula;
- Tubo de ensaio 13x100mm com tampa rosca capacidade 9mL, ref. 9825 (Pyrex)
- Frasco de vidro âmbar com tampa de rosca (Pyrex);
- Sistema evaporador de amostras em aço inoxidável.

3.1.8 Limpeza dos materiais

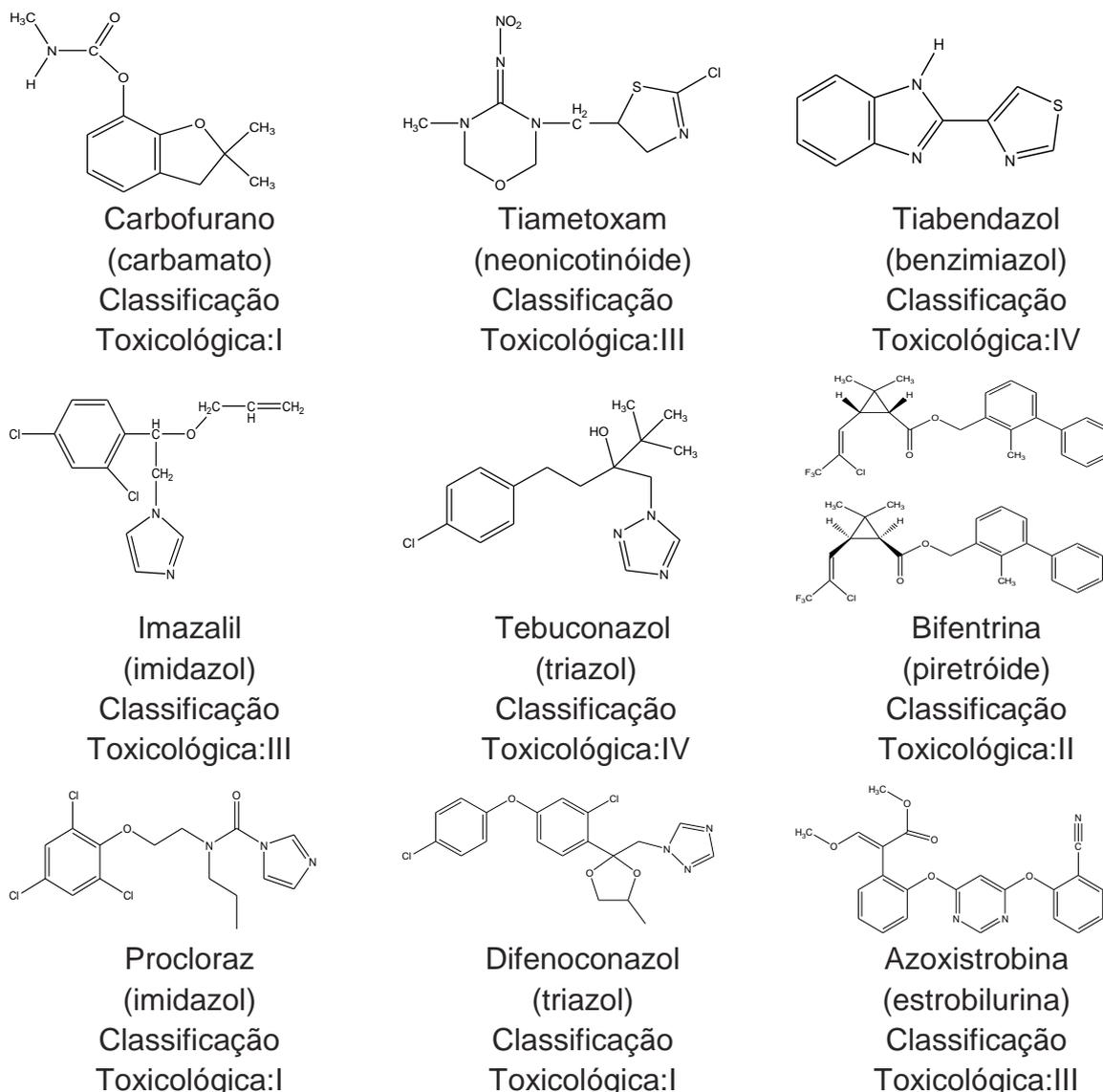
Os materiais utilizados no preparo das soluções e durante as extrações foram lavados enxaguando-se em água corrente por três vezes, seguida da lavagem com detergente neutro. Mais uma vez foi feito o enxágüe com água corrente por três vezes com posterior lavagem utilizando solução de extran neutro a 5%, na qual permaneceram por duas horas. O enxágüe com água deionizada foi realizado após o tempo de permanência no banho e logo em seguida foi feito o enxágüe com acetona. Após a secagem, os materiais foram cobertos com papel filme e guardados em armários fechados.

3.2 Agrotóxicos selecionados para o estudo

Para escolher os agrotóxicos a serem estudados, foram aplicados questionários nas regiões produtoras de mamão, por técnicos da EBDA e da ADAB, oportunidade em que foram avaliados os seguintes parâmetros: a utilização nas propriedades, freqüência de aplicação destes na agricultura e as suas propriedades físico-químicas variadas. Os agrotóxicos selecionados para o trabalho foram: 1) carbofurano; 2) tiametoxan; 3) tiabendazol; 4) imazalil; 5) tebuconazol; 6) bifentrina; 7) procloraz; 8) difenoconazol e 9) azoxystrobina.

Os ingredientes ativos foram selecionados com base na relação de compostos autorizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para serem aplicados na cultura do mamão. Essa foi uma etapa importante para a condução do estudo, pois o método a ser desenvolvido e validado deveria estar de acordo com os agentes químicos específicos que são destinados à cultura em estudo, possibilitando assim a geração de informações compatíveis com a realidade e com a grande relevância para a sociedade.

Figura 18. Fórmulas estruturais dos agrotóxicos selecionados para estudo.



3.3 Condições cromatográficas estabelecidas para as análises por GC-MS.

As análises por cromatografia gasosa foram realizadas em um sistema Shimadzu GC-MS modelo QP2010, equipado com injetor automático split/splitless modelo AOC-20i (Shimadzu), operando no modo splitless. Para a separação dos agrotóxicos foi empregada uma coluna capilar em sílica fundida para cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR), com fase estacionária ligada do tipo 100% dimetilpolisiloxano, DB - 1MS, 30 m (comprimento) x 0,25 mm (I.D.) x 0,25 µm (espessura do filme), ref. N° AG122-0132 (©Agilent Technologies), utilizando hélio como

gásdearraste com uma vazão constante de 1,0 mL min⁻¹. A temperatura da coluna seguiu a seguinte programação: 60°C com rampa de aquecimento, 25°C / min. até 200°C, 5°C/min. até 280°C / 5min., com tempo total de análise de 27,6 min. As condições de análise utilizadas no espectrômetro de massas foram: linha de transferência aquecida a 250°C, ionização por impacto de elétrons a 70 eV, fonte de íons aquecida a 250°C e injetor a 280°C.

3.4 Aquisição da amostra para o desenvolvimento do método

As amostras de mamão livres de agrotóxicos (amostras testemunhas) usadas no desenvolvimento do método QuEChERS modificado foram adquiridas de um sítio, propriedade particular, da cidade de Alagoinhas. As amostras a serem investigadas foram coletadas em alguns pontos da cidade de Salvador, como: supermercados, pequenos mercados, Ceasa, Mercado do Rio Vermelho e Água de meninos. Além disso, foram obtidas amostras de cidades do interior da Bahia, como Santo Antônio de Jesus, Conceição do Almeida, Cruz das Almas, Sapeaçu, Governador Mangabeira, Irecê, Eunápolis, Feira de Santana, Teixeira de Freitas e Itabela. As amostras selecionadas como “testemunhas” foram conservadas da forma como foram coletadas e ao chegar ao laboratório, foram processadas e homogeneizadas sem lavar, na sua forma *in natura* (casca e polpa), em liquidificador PHILIPS (São Paulo, SP, Brasil) e armazenadas em frascos de vidro até o momento da análise. Momentos antes da extração, o mamão processado era retirado do freezer e deixado à temperatura ambiente até descongelar.

3.5 Otimização do procedimento de extração pelo método QuEChERS modificado

Foram realizadas, neste trabalho, modificações dos métodos propostos por diversos autores para a extração de resíduos de agrotóxicos em frutas pelo método QuEChERS. Para isso, foram realizados testes na etapa de otimização das condições de extração, os quais envolveram a seleção do adsorvente a ser utilizado, planejamento fatorial fracionário e o planejamento fatorial Box-Behnken. A otimização das variáveis que influenciam na eficiência da extração dos agrotóxicos no mamão por QuEChERS e análise por GC-MS foi realizada com os agrotóxicos na

presença da matriz. Considerando-se que sete variáveis seriam avaliadas, optou-se pelo estudo multivariado para uma melhor interpretação química da influência de cada variável e, também, a melhor condição de análise.

3.5.1 Seleção do adsorvente

O adsorvente tem papel fundamental na extração de resíduos de agrotóxicos pelo método QuEChERS. Entre muitas funções, promove o rompimento da estrutura física da amostra, atuando como abrasivo, e adsorve os compostos da matriz gerando um material cromatográfico adequado para posterior eluição dos analitos. A escolha do adsorvente esta relacionada com a polaridade dos analitos e com a natureza da matriz (Dórea et al., 2004).

Com o intuito de selecionar o tipo de adsorvente e a quantidade deste que possibilitasse a maior redução do sinal dos compostos da matriz e a melhor resposta cromatográfica dos analitos de interesse, foram realizados testes com adsorventes individuais na etapa *de clean-up* do método QuEChERS, utilizado na extração multirresíduos de agrotóxicos. Os adsorventes testados foram: Amina primária-secundária (PSA), octadecilsilano (C18), Carbono preto grafitizado (CGB) e Florisil [Mg₃Al₂(SiO₄)₅]. A recuperação (RE) dos agrotóxicos foi calculada pela razão entre a área da solução padrão contendo a mistura de agrotóxicos adicionado antes do início do procedimento de extração e pela área da solução padrão adicionada ao final do procedimento de extração, segundo a equação abaixo:

$$\% RE = \frac{\text{Área padrão inicial}}{\text{Área padrão final}} \times 100 \quad (3)$$

3.5.2 Planejamento Experimental

Os planejamentos experimentais foram realizados através de métodos estatísticos, utilizando-se o programa “Statística” versão 6.0.

3.5.3 Planejamento Experimental Fracionário

Para a otimização das condições de extração, foi realizado neste trabalho o planejamento fatorial fracionário. Tendo como base o método QuEChERS foram avaliados os seguintes fatores no planejamento experimental: i) massa de amostra (g); ii) massa de MgSO₄ (g); iii) massa de NaCl (g); iv) massa de PSA; v) Tempo de sonicação (min.); vi) Velocidade de centrifugação (rpm); e vii) Tempo de centrifugação (min).

O planejamento fatorial fracionário foi desenvolvido com os sete fatores predefinidos, de acordo como os níveis mínimo e máximo descritos na Tabela 7, a seguir.

Tabela 7. Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial fracionário.

Nº	Fator	Mínimo (-)	Médio (0)	Máximo (+)
01	Massa de amostra (g)	2	6	10
02	Massa de MgSO ₄ (g)	2	4	6
03	Massa de NaCl (g)	0	1	2
04	Massa de PSA (mg)	100	200	300
05	Tempo de Sonicação (min.)	7	14	21
06	Velocidade de Centrifugação (rpm)	3000	6000	9000
07	Tempo de Centrifugação (min.)	1	3	5

3.5.4 Planejamento Experimental Box- Behnken

Após a obtenção dos resultados do planejamento fatorial fracionário foi feita a avaliação das variáveis que influenciam significativamente no processo de extração pelo método QuEChERS.

Tabela 8. Fatores e níveis estudados no planejamento experimental Box- Behnken.

Nº	Fator	Mínimo (-)	Médio (0)	Máximo (+)
01	Massa de amostra (g)	2	6	10
02	Massa de NaCl (g)	0	1	2
03	Massa de PSA (mg)	100	200	300

3.5.5 Efeito Matriz empregando o método QuEChERS modificado

Para avaliar o efeito matriz sobre os compostos estudados foi injetado no sistema cromatográfico a solução padrão com a mistura dos agrotóxicos, na concentração de 2,0 mg L⁻¹, diluído com o extrato branco da matriz extraído pelo método QuEChERS e a solução padrão com a mistura dos agrotóxicos diluída com acetona. O cálculo do efeito matriz (%EM) foi realizado segundo Kruevet al. (2008) aplicando a Equação 4:

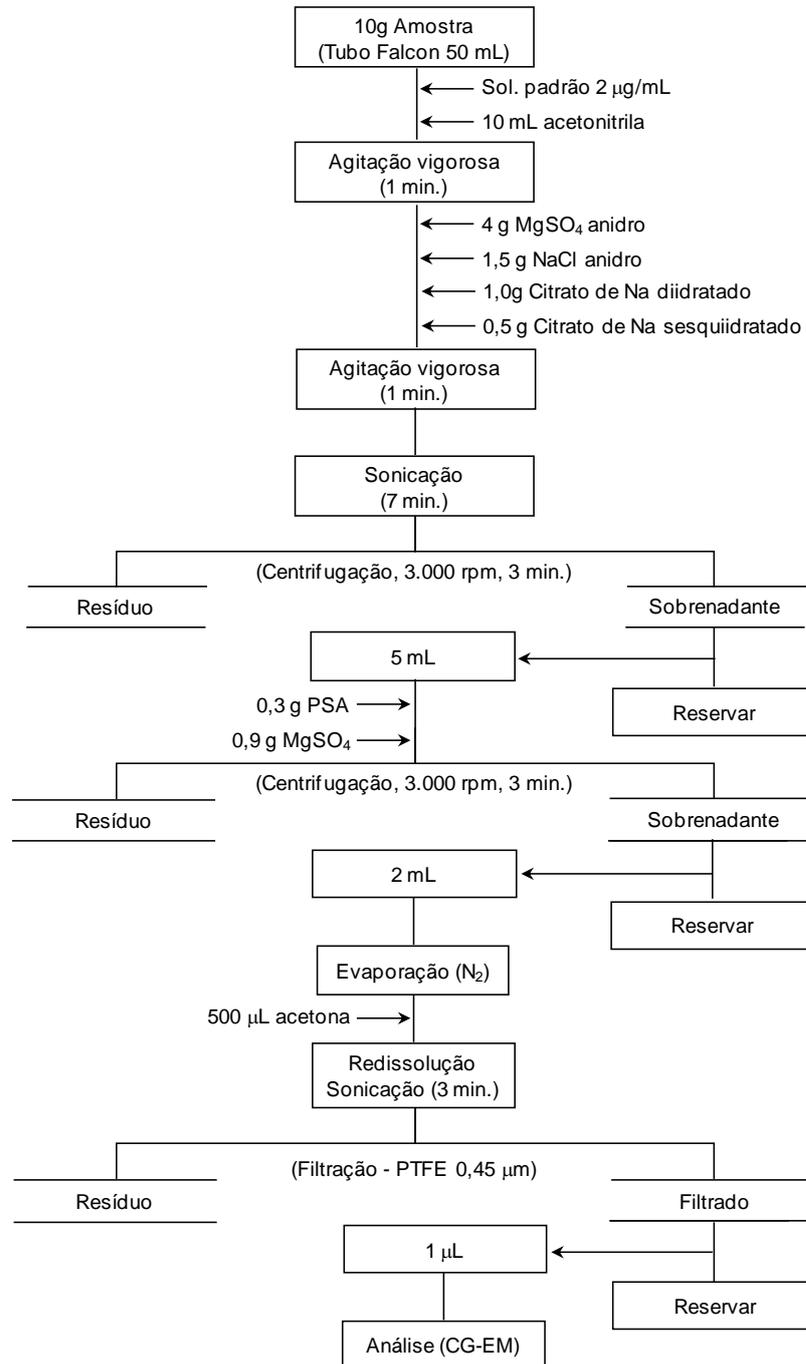
$$\% EM = \frac{\text{Área padrão matriz}}{\text{Área padrão acetona}} \times 100_{(4)}$$

3.6 Procedimento de extração pelo método QuEChERS modificado

Dentro da região experimental estudada, os maiores valores de resposta foram obtidos utilizando-se 0,3 g de PSA, 1,45g de NaCl e 10,0 g amostra. Sendo assim, o procedimento experimental foi realizado pesando-se 10,0 g de amostra em um tubo de polipropileno (capacidade 50 mL), seguida pela etapa de fortificação no nível de 2,0 mg.kg⁻¹. Para fortificação foi adicionado na amostra um volume conhecido de solução padrão de trabalho com a mistura dos agrotóxicos. Logo, foi adicionado 10,0 mL de acetonitrila e realizada agitação mecânica com auxílio de um vórtex por 1 min. Depois foram adicionados 4,0 g de sulfato de magnésio anidro, 1,45g de NaCl, 1,0 g de citrato de sódio di-hidratado e 0,5 g de citrato de sódio sesquihidratado, seguida da agitação mecânica no vórtex por 1 minuto. Em seguida foi feita a sonicação durante 7 minutos em ultrassom com banho de gelo e logo após

as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 3000 rpm. Foi retirada alíquota de 5 mL, a qual foi transferida para outro tubo de polipropileno (capacidade 50 mL) contendo 0,3g de PSA e 0,9g de MgSO₄ para a limpeza do extrato obtido. O mesmo foi centrifugado por 3 minutos a 3000 rpm e após a etapa *clean up* foi retirada alíquota de 2 mL do sobrenadante e transferida para um tubo de ensaio com tampa de rosca para posterior evaporação, com banho de gelo, sob fluxo de nitrogênio. Depois da evaporação, foi feita a ressuspensão com 500 µL de acetona e sonicação, com banho de gelo, por 3 minutos em ultrassom. Por último, foi feita a filtração com filtro de PTFE em um vial com insert para posterior injeção no GC-MS. Na figura a seguir é mostrado o esquema analítico descrito.

Figura 19. Esquema analítico para extração, pré-concentração, separação e quantificação de agrotóxicos.



3.7 Validação do método

A metodologia foi validada empregando figuras analíticas de mérito como: curva analítica, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão (recuperação) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária), os quais são

parâmetros sugeridos para validação de métodos analíticos pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e pela ANVISA.

3.7.1 Curva analítica e Linearidade

A linearidade do instrumento e do método foram avaliados pela construção de curvas analíticas através do método de adição do padrão utilizado para a quantificação dos agrotóxicos. Foi preparada uma solução estoque de concentração igual a $5000 \mu\text{g. kg}^{-1}$. A partir desta, foram preparadas soluções de trabalho por meio de diluições sucessivas, cujas concentrações foram: 100, 200, 800, 1600, 2400, 3200, 4000 e $4800 \mu\text{g. kg}^{-1}$. A curva analítica foi preparada com oito pontos correspondendo aos níveis de fortificação com 25, 50, 200, 400, 600, 800, 1000 e $1200 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Cada ponto foi obtido em triplicata.

3.7.2 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos utilizando a razão sinal/ruído de cada analito, obtidos com extrações dos compostos de interesse no extrato da matriz, quando ainda era possível obter um sinal mínimo e mensurável de cada um. A relação de 3:1 foi estimada como limite de detecção e a razão de 10:1 foi estabelecida como limite de quantificação. O menor nível de concentração na curva analítica correspondeu ao início da faixa linear de trabalho e ao LOQ para cada composto.

3.7.3 Precisão

A precisão é a estimativa da dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (MAPA, 2011). Para análise de resíduos de agrotóxicos consideram-se aceitáveis coeficientes de variação de até 20%, sendo avaliada pelo desvio padrão absoluto. A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária, reprodutibilidade.

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de

medição. Para se determinar a repetitividade deve-se preparar e analisar um conjunto de amostras constituídas de matrizes brancas fortificadas, no mínimo em três níveis de concentração, com as substâncias a analisar, cobrindo o limite especificado do procedimento, de acordo com a ANVISA (Ribani et al., 2004; Brito et al., 2003).

No presente trabalho a precisão do método foi avaliada com o estudo da repetitividade, realizando-se três extrações no mesmo dia (precisão intradia), em três níveis de concentração: 25, 50 e 250 ng.mL⁻¹

3.7.4 Recuperação

A recuperação reflete a quantidade de determinado analito recuperado em um processo em relação à quantidade real presente na amostra. É um dos métodos mais utilizados para validação de processos analíticos e está diretamente relacionada com a exatidão (Brito et al., 2003).

O estudo da recuperação consiste na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado (Brito et al., 2003). A recuperação deve ser avaliada em três diferentes níveis de concentração: próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permitida pelo método em teste e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método (RIBANI et al, 2004)

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (Ribani et al., 2004).

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento da metodologia analítica, inicialmente foram otimizadas as condições cromatográficas (GC-MS) para uma boa separação dos analitos, a partir de métodos descritos na literatura e da experiência do grupo de pesquisa envolvido neste trabalho (Rodrigues, 2007; Filho *et. al.*, 2010). Em seguida, empregando o planejamento multivariado, foi feito o estudo da extração pelo método QuEChERS, escolhendo-se as melhores condições em termos de recuperação dos agrotóxicos selecionados. Por último, foi realizada uma discussão sobre a eficiência, sensibilidade e robustez do método analítico.

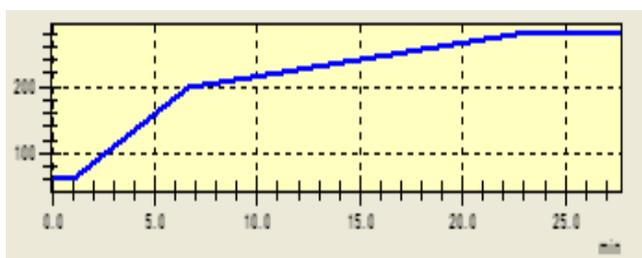
4.1 Otimização das condições cromatográficas

A partir de dados bibliográficos obtidos em artigos científicos foi feita a primeira programação de temperatura do forno da coluna para dar início ao trabalho. Inicialmente foram realizadas injeções individualizadas de 1µL de cada padrão de agrotóxico identificado com concentração de 1,0 mg.mL⁻¹, no sistema de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS), operando no modo SCAN (varredura).

Após a identificação de cada analito foi avaliada a eficiência da separação dos nove agrotóxicos presentes em uma mistura padrão. Foram efetuadas injeções de 1,0 µL da mistura padrão, na concentração 1,0mgmL⁻¹, no modo SCAN (varredura).

Várias programações de temperatura do forno foram testadas a fim de obter-se uma programação satisfatória para uma separação adequada dos nove agrotóxicos selecionados. Depois de vários testes foi possível definir as melhores condições para a programação da temperatura do forno da coluna cromatográfica: temperatura inicial de 60°C, com rampa de aquecimento de 25°C/min. até 200°C, em seguida 5°C/min. até 280°C e finalmente um patamar de 5min. (Figura 20)

Figura 20: Programação da temperatura do forno do sistema GC-MS desenvolvida para a análise dos agrotóxicos.



Definida as melhores condições de programação de temperatura do forno, foram feitas novas injeções da solução padrão com concentração de 2 mg mL^{-1} obtendo-se o cromatograma apresentado na Figura 21, a seguir, onde pode ser observada uma boa eficiência e resolução dos picos cromatográficos.

Figura 21: Cromatograma dos íons totais (GC-MS /SCAN). Volume injetado: 1µL da solução padrão 2mg.kg⁻¹, coluna DB-1MS 30m.

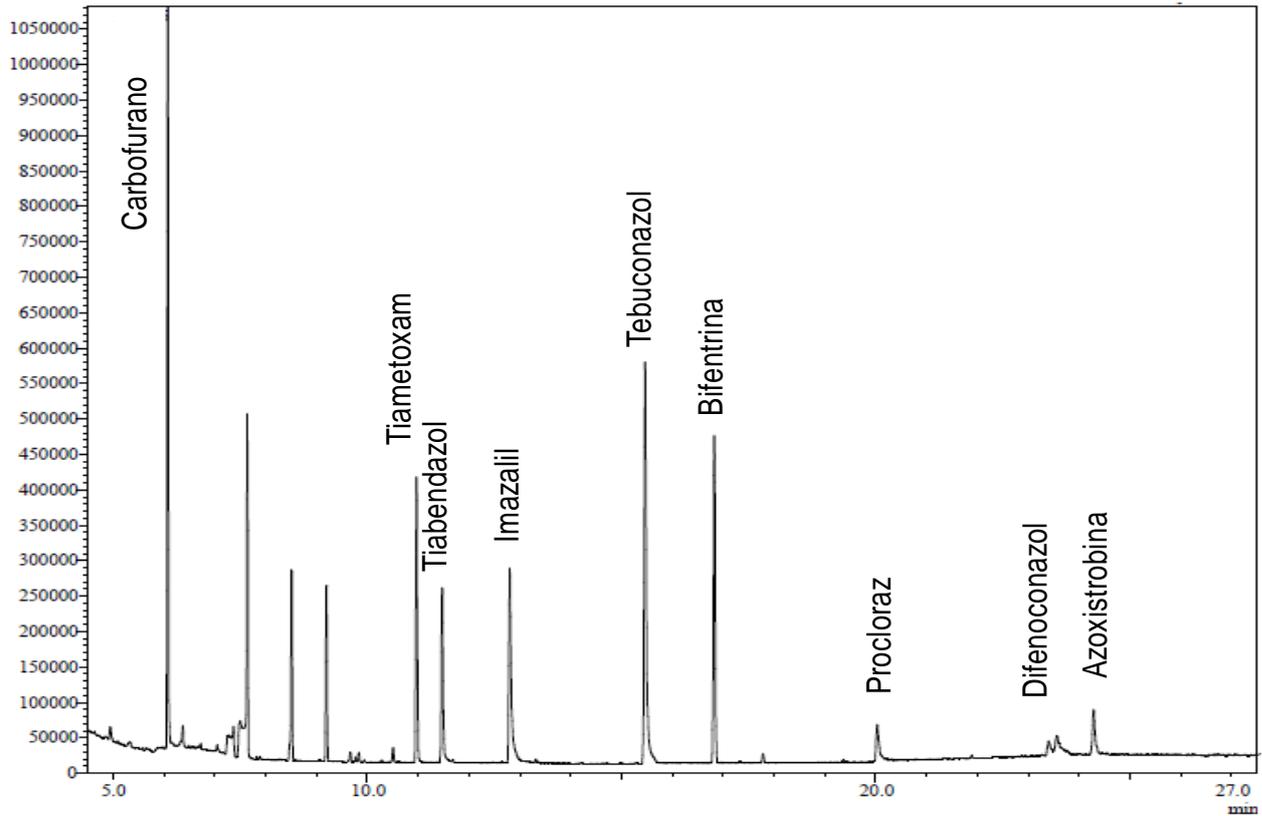
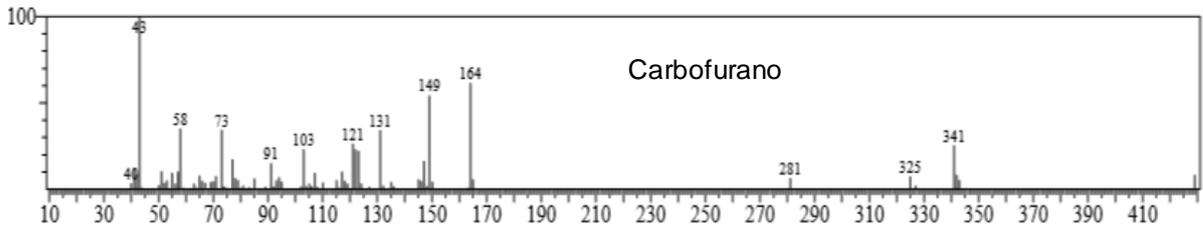


Tabela 9. Condições empregadas no sistema cromatográfico.

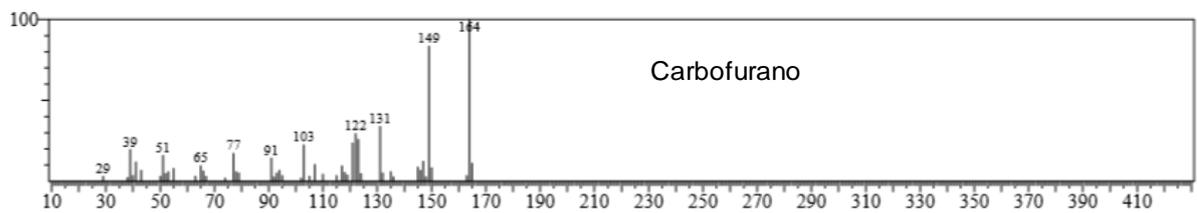
Parâmetros	GC-MS
Coluna	DB - 1MS, 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm
Temperatura do Injetor	280°C
Temperatura da coluna	60°C com rampa de aquecimento, 25°C/min até 200°C, 5°C/min até 280°C/5min
Temperatura da interface	250°C
Temperatura da fonte de íons	250°C
Modo	Splitless
Gás de arraste	Hélio
Vazão	1mL/min

A confirmação da identidade dos analitos foi feita por comparação dos espectros de massas obtidos com os espectros de massas das bibliotecas eletrônicas NIST 147 e WILLEY MS Library. O grau mínimo de similaridade usado para aceitação variou de 97 a 99%.

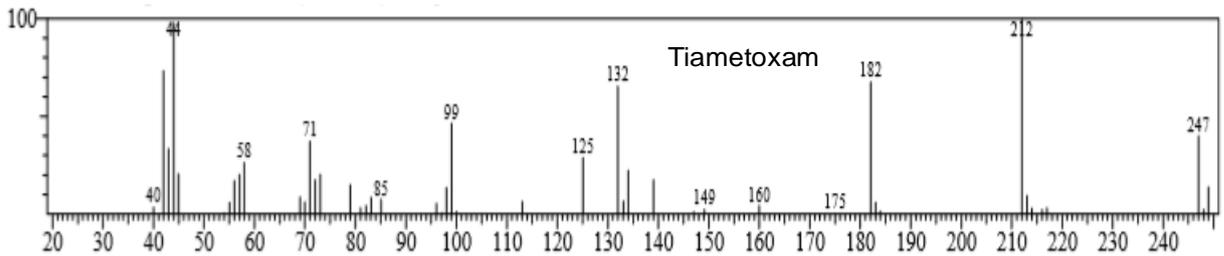
Figura 22: Espectros de massas dos agrotóxicos obtidos do cromatograma de íons totais (GC-MS /SCAN) comparado com aqueles obtidos da biblioteca *NIST*.



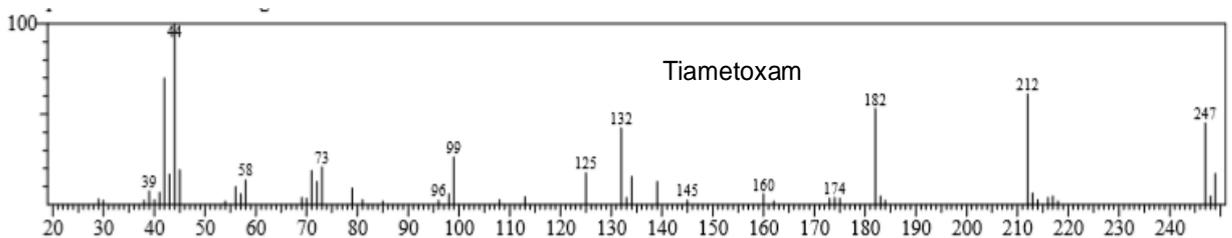
Espectro de massas do carbofurano obtido cromatograma (Shimadzu GCMS-QP2010).



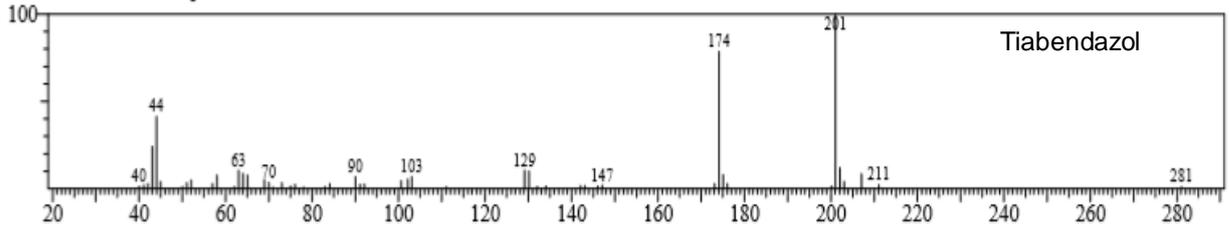
Espectro de massas do carbofurano obtido da biblioteca *NIST*.



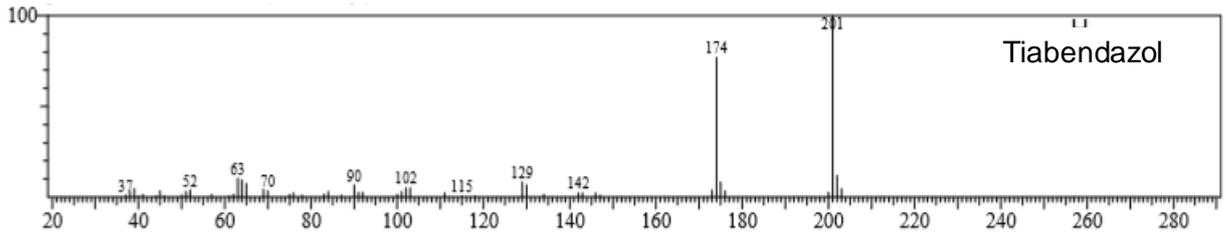
Espectro de massas do tiametoxam obtido cromatograma (Shimadzu GCMS-QP2010) .



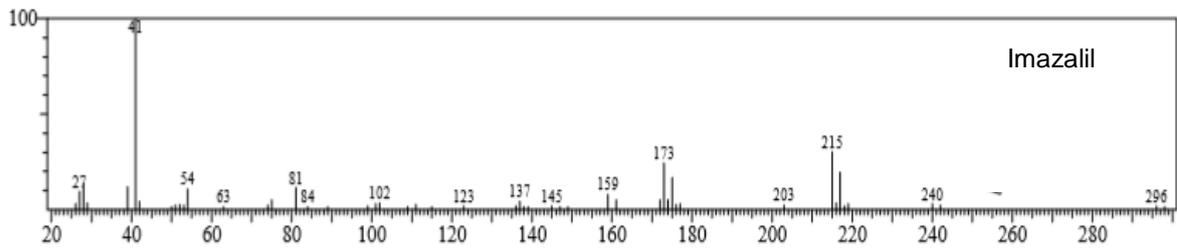
Espectro de massas do tiametoxam obtido da biblioteca *NIST*.



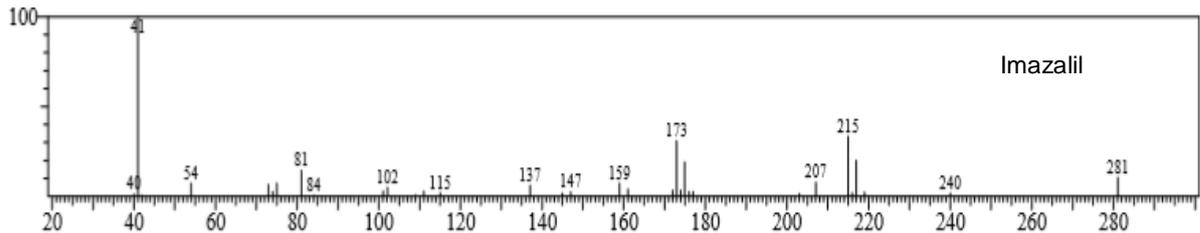
Espectro de massas do tiabendazol obtido cromatograma (Shimadzu GCMS-QP2010).



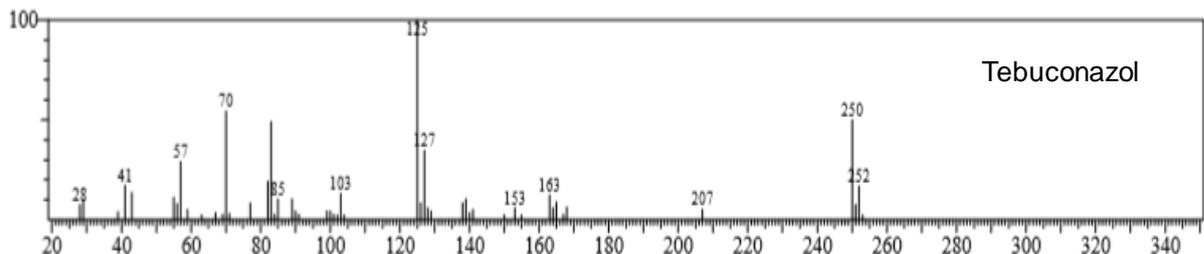
Espectro de massas do tiabendazol da biblioteca *NIST*.



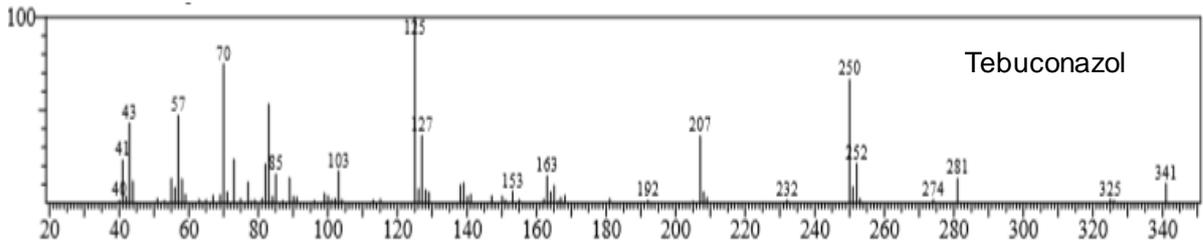
Espectro de massas do imazalil obtido cromatograma (Shimadzu GCMS-QP2010).



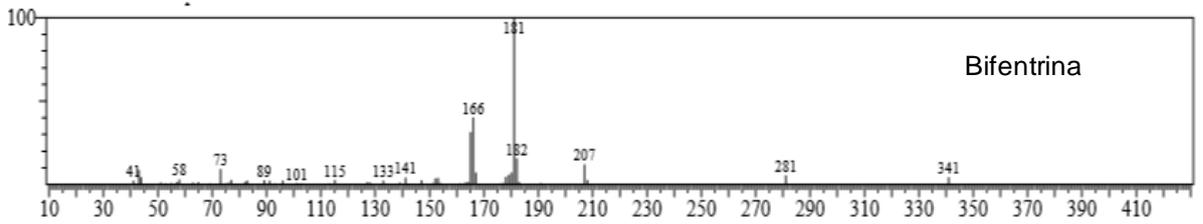
Espectro de massas do imazalil obtido da biblioteca *NIST*.



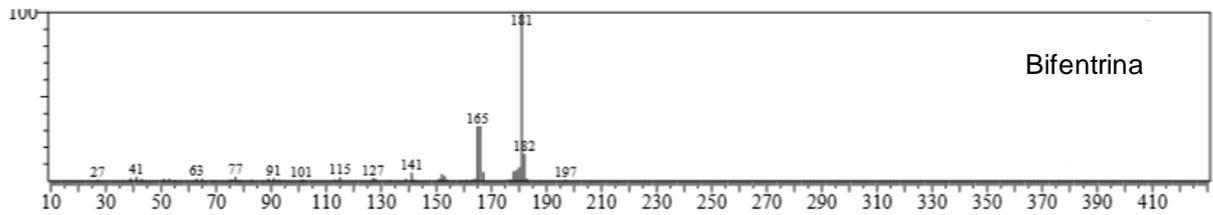
Espectro de massas do tebuconazol obtido cromatograma (Shimadzu GCMS-QP2010).



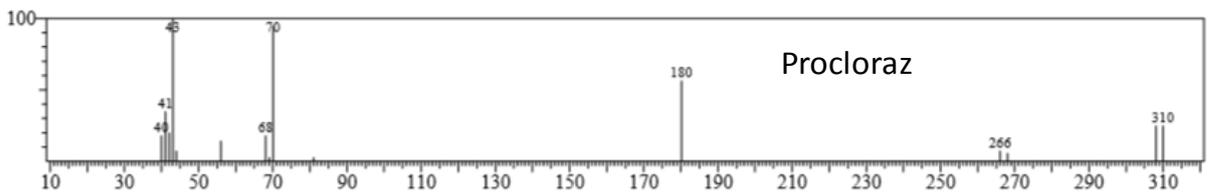
Espectro de massas do tebuconazol obtido da biblioteca *NIST*.



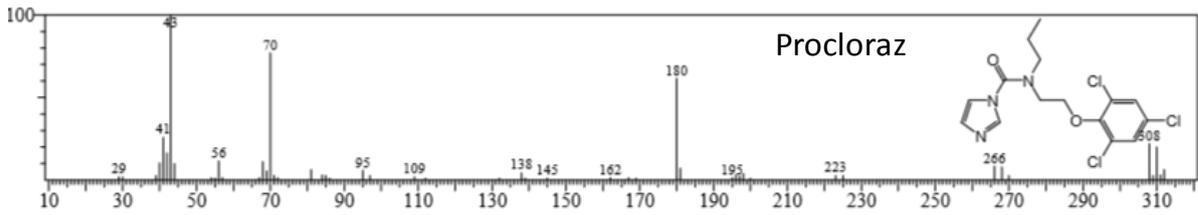
Espectro de massas da bifentrina obtido do cromatograma (Shimadzu GCMS-QP2010).



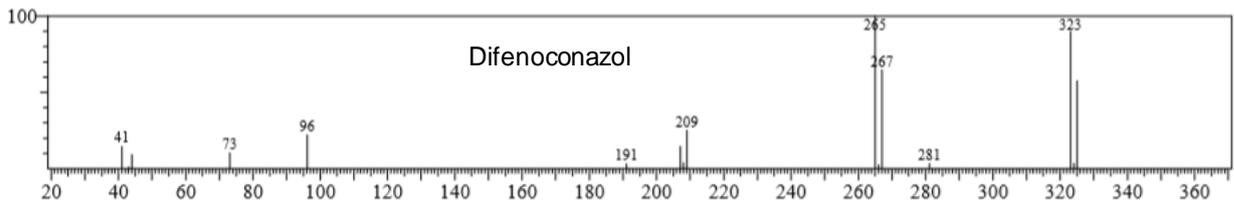
Espectro de massas da bifentrina obtido da biblioteca *NIST*.



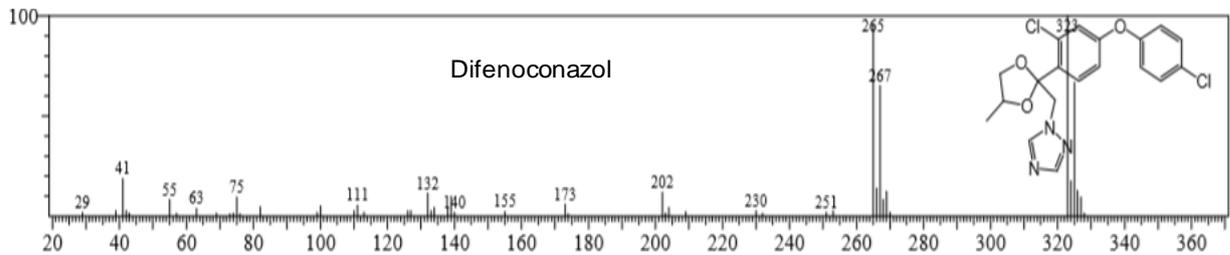
Espectro de massas do procloraz obtido do cromatograma (Shimadzu GCMS-QP2010).



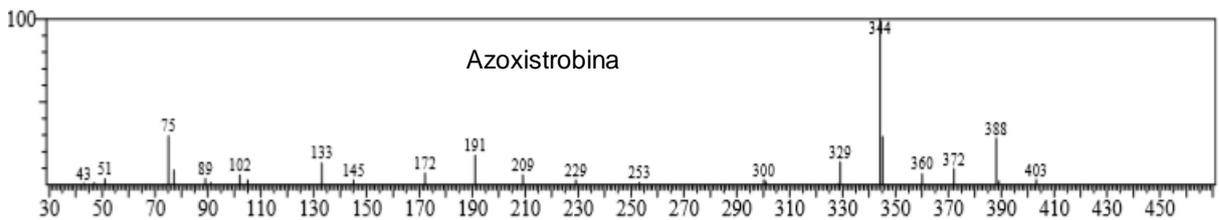
Espectro de massas do procloraz obtido da biblioteca *NIST*.



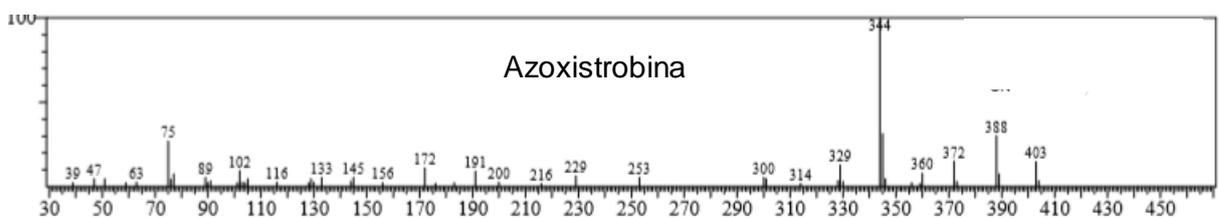
Espectro de massas do difenoconazol obtido do cromatograma (Shimadzu GCMS-QP2010).



Espectro de massas do difenoconazol obtido da biblioteca *NIST*.



Espectro de massas da azoxistrobina obtido do cromatograma (Shimadzu GCMS-QP2010).



Espectro de massas da azoxistrobina obtido da biblioteca *NIST*.

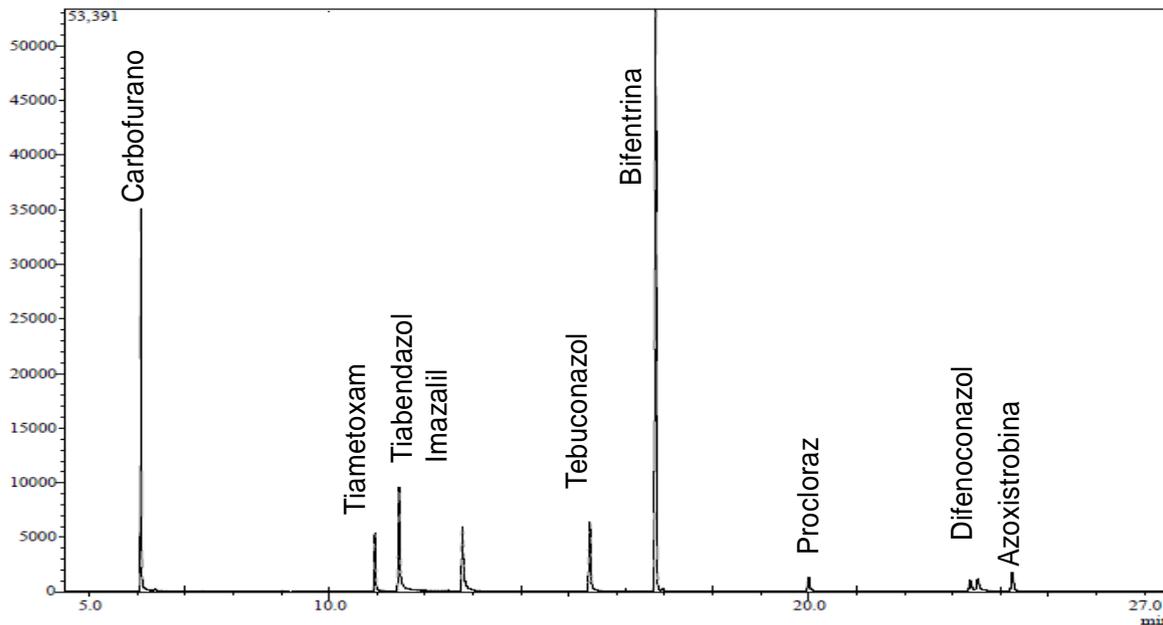
Depois de estabelecer a programação de temperatura ideal para a separação dos analitos (no modo SCAN) e identificá-los, foi feita uma seleção dos íons de maior intensidade para cada agrotóxico, objetivando sua qualificação e quantificação por meio do monitoramento de íons selecionados (SIM), os quais estão relacionados na Tabela 10.

Tabela 10. Fragmentos monitorados na quantificação dos agrotóxicos.

Agrotóxico	Tempo de retenção (min)	Íon quantificador	Íons qualificadores
Carbofurano	6,075	149	164
Tiametoxam	10,97	212	182
Tiabendazol	11,47	201	129, 174
Imazalil	12,80	215	41, 173
Tebuconazol	15,46	125	70, 250
Bifentrina	16,82	181	166, 182
Procloraz	20,02	180	43, 70, 308
Difenoconazol	23,57	323	265
Azoxystrobina	24,28	344	388

Com o espectrômetro de massas operando no modo SIM (monitoramento de íons selecionados), foram realizadas injeções de uma solução padrão de agrotóxicos para construção da curva analítica e, posteriormente, para determinação em amostras comerciais. A Figura 23 mostra o cromatograma de uma mistura de padrões em solução de concentração 2,0 mgmL⁻¹

Figura 23. Cromatograma obtido por GC-MS (MODO SIM) de solução padrão contendo os agrotóxicos selecionados para estudo com concentração igual a $2\mu\text{g mL}^{-1}$



1

4.2 Otimização das condições de extração dos agrotóxicos da matriz mamão pelo método QuEChERS para análise por GC-MS.

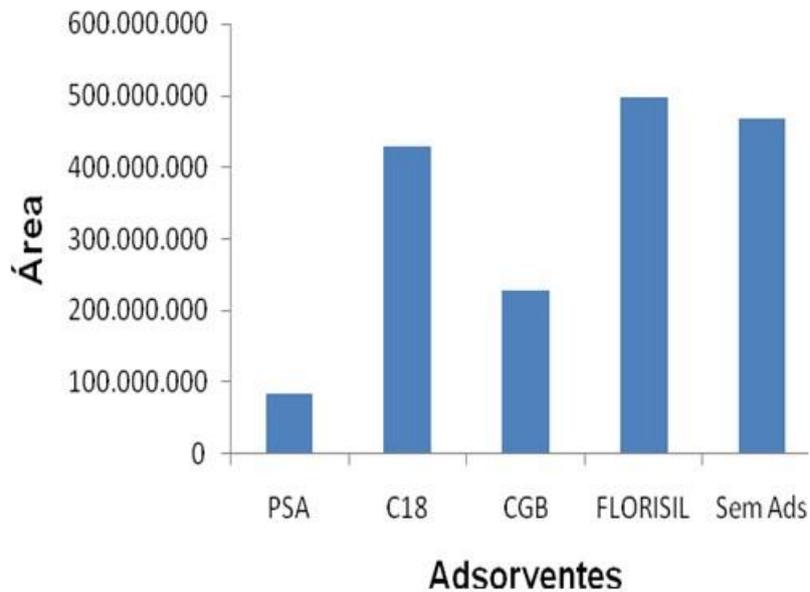
A otimização das condições de extração envolveu a seleção do adsorvente para etapa de limpeza do extrato (*clean up*) e o estudo das variáveis que influenciam na eficiência da extração dos agrotóxicos no mamão pelo método QuEChERS, através da realização do planejamento fatorial fracionário e do planejamento Box-Behnken.

4.2.1 Seleção do adsorvente

Os adsorventes testados foram amina primária e secundária (PSA), Octadecil (C18), carbono negro grafitizado (CGB) e Florisil. As extrações foram realizadas utilizando-se 300 mg de cada adsorvente. Além disso, foi feito um teste sem a utilização de adsorvente, ou seja, sem a etapa de *clean up*.

Na Figura 24 são comparados os valores das áreas totais obtidas após a extração utilizando os referidos adsorventes.

Figura 24. Área total de picos no cromatograma (GC-MS), com diferentes adsorventes na etapa de *clean-up*, obtido a partir da extração pelo método QuEChERS.



Através da análise da Figura 24 é possível observar que, dentre os adsorventes selecionados para estudo, o PSA e o CGB apresentaram menores valores de áreas totais. Houve uma redução significativa dos sinais dos componentes da matriz, gerando menores valores de resposta desses mesmos interferentes no cromatograma. Isso indica que o PSA e o CGB apresentaram maior capacidade de retenção dos interferentes da matriz.

Nas Figuras 25 - 29 são apresentados os respectivos cromatogramas obtidos a partir dos extratos de cada um dos adsorventes estudados.

Figura 25. Cromatograma GC-MS/SCAN obtido utilizando PSA adsorvente.

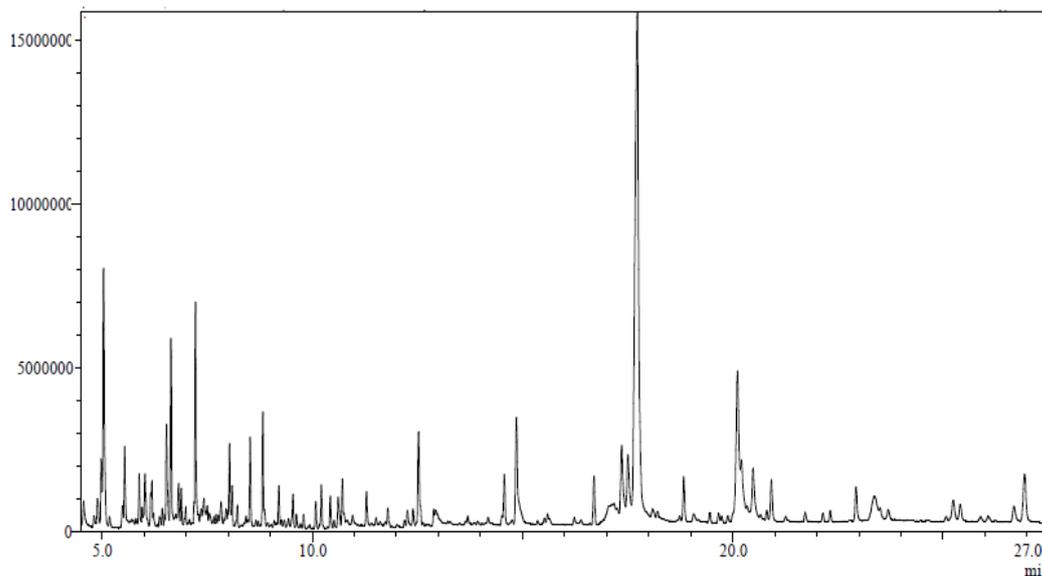


Figura 26. Cromatograma GC-MS/SCAN obtido utilizando C18 como adsorvente.

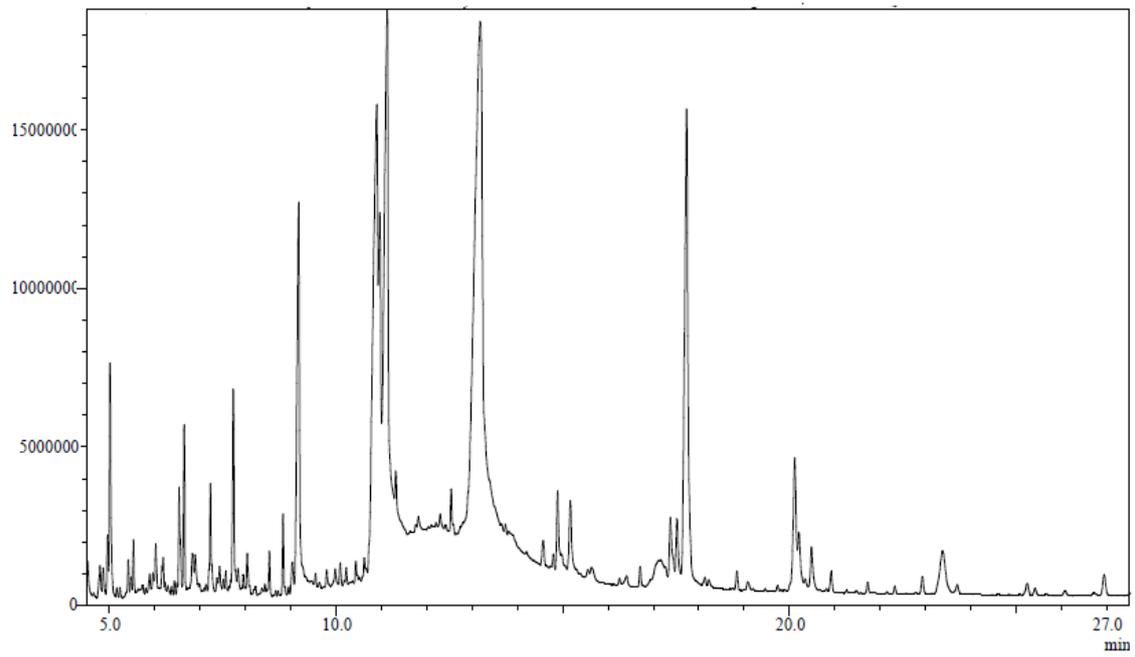


Figura 27. Cromatograma GC-MS/SCAN obtido utilizando CGB como adsorvente.

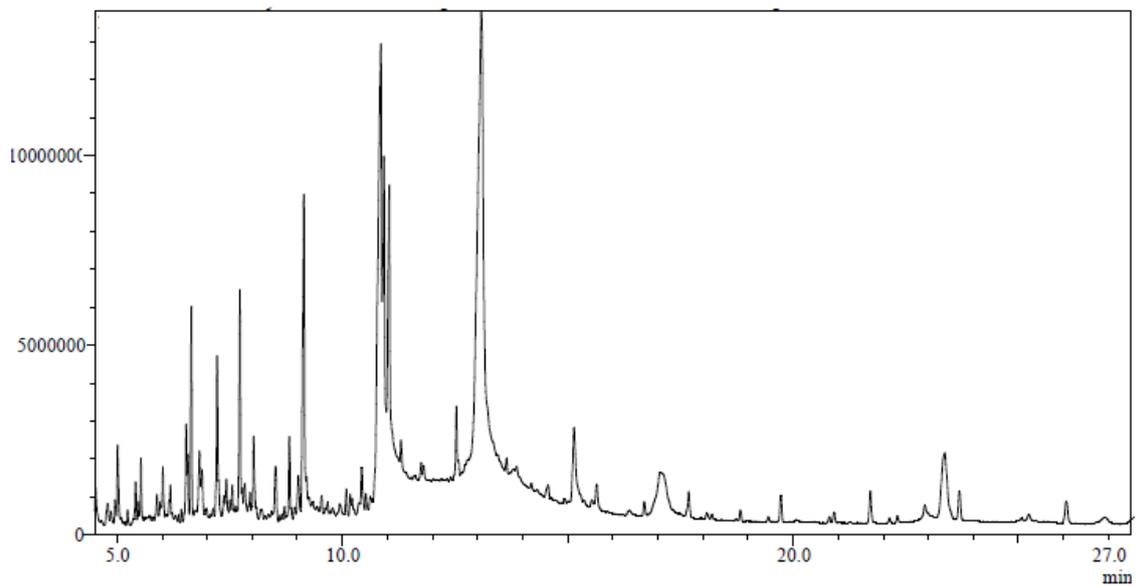


Figura 28. Cromatograma GC-MS/SCAN obtido utilizando Florisil como adsorvente.

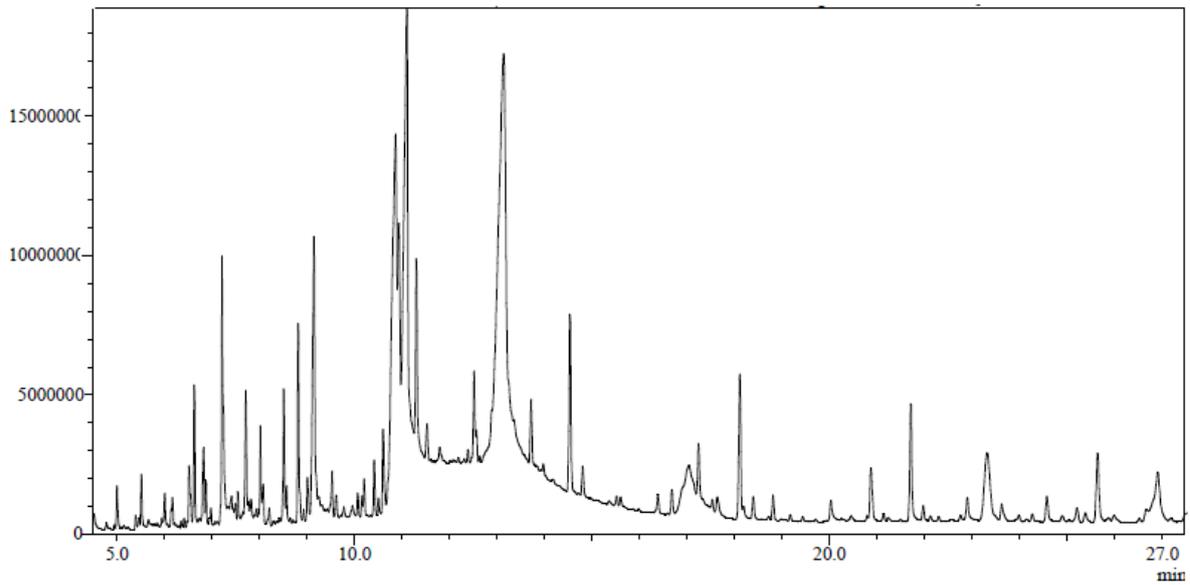
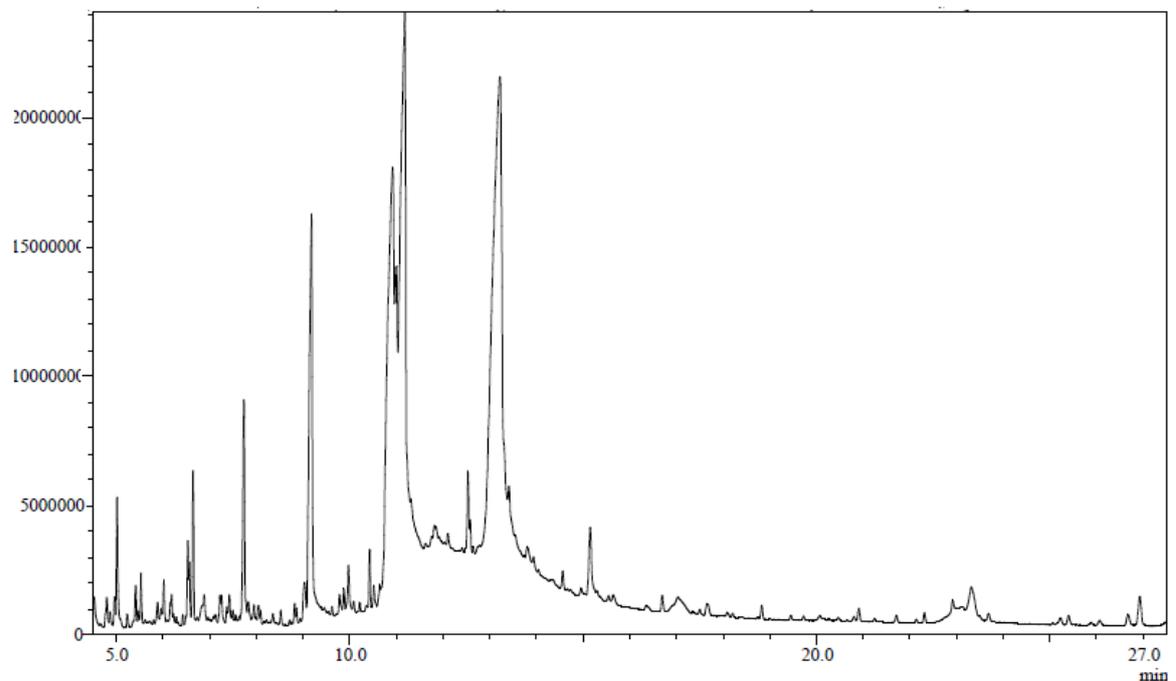


Figura 29. Cromatograma GC-MS/SCAN obtido sem a etapa de *clean up*.



A eficiência do adsorvente foi avaliada pelo estudo da recuperação determinada a partir das áreas dos picos cromatográficos dos analitos.

Na Tabela 11 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada adsorvente estudado.

Tabela 11. Valores de recuperação obtidos para os adsorventes estudados (%).

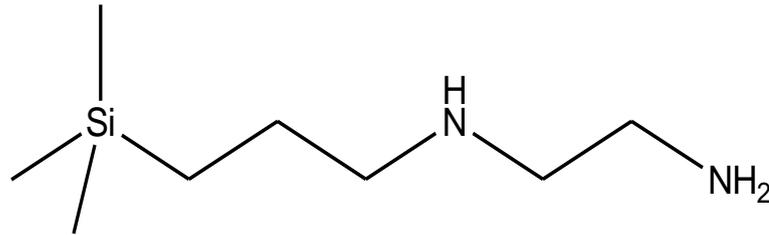
Analito	PSA	C18	CGB	Florisil	S/A
Carbofurano	100,7	77,3	96,4	97,7	58,4
Tiametoxam	97,0	111,3	83,0	101,9	76,4
Tiabendazol	84,3	75,5	1,2	101,6	116,4
Imazalil	93,8	77,1	76,3	93,8	110,5
Tebuconazol	93,3	68,6	41,5	113,1	119,6
Bifentrina	96,0	80,1	63,7	110,5	107,3
Procloraz	95,7	65,0	22,3	107,6	81,9
Difenoconazol	93,1	65,8	47,0	111,0	114,5
Azoxistrobina	92,1	69,5	74,0	115,1	119,7
Média	94,0	76,7	56,2	105,8	100,5

*S/A: Sem Adsorvente

Os dados de recuperação dos analitos, presentes na Tabela 9 revelam que o PSA apresentou melhores resultados, com recuperação média igual a 94%, a qual está dentro da faixa aceitável que é de 70 a 120%.

As aminas contêm um ou mais átomos de nitrogênio com um par de elétrons não compartilhados. O PSA é caracterizado como amina primária-secundária por apresentar em sua estrutura os grupamentos RNH_2 e R_2NH , como representado na Figura 30. Com a estrutura bidentada, o PSA tem um elevado efeito quelante devido à presença desses grupamentos. Como resultado, a retenção dos ácidos graxos livres e de outros compostos polares presentes na matriz é muito eficaz, podendo ocorrer a retenção de analitos que interferem no resultado da análise (Prestes et al., 2009; Cabrera et al., 2012).

Figura 30. Fórmula estrutural do PSA.



Quando comparado com o carbono preto grafitizado (CGB), octadecilsilano (C18) apresentou maior valor de área total como consequência de um maior número de picos (Figura 24). Entretanto, ambos apresentaram os menores valores médios de recuperação e para alguns dos agrotóxicos estão abaixo da faixa aceitável (70 a 120%). Os respectivos cromatogramas são mostrados nas Figuras 26 e 27.

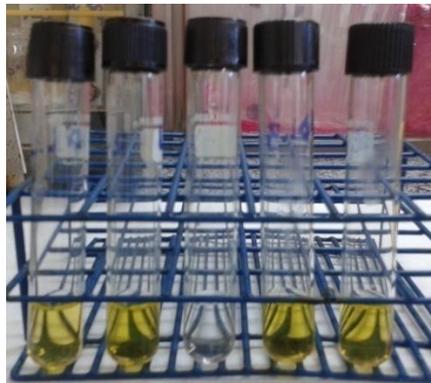
O C18, por ser um adsorvente apolar, tem pouca afinidade com boa parte dos componentes da matriz, removendo apenas os compostos apolares, tais como os lipídios e ceras (Georgakopoulos et al., 2011). Entre os analitos determinados, o tiametoxam apresentou maior valor de recuperação (111,3%) (Tabela 9). O seu coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) é igual a 0,89 ($\log K_{ow} = -0,13$) a 20°C (Tabela 4). Isso indica que o tiametoxam apresenta maior polaridade do que os demais agrotóxicos e, portanto, não interage com o C18, sendo removido totalmente pelo eluente. Já para o difenoconazol, que é um agrotóxico de mais baixa polaridade ($\log K_{ow} = 4,36$), o valor da recuperação foi baixo (65,8%) indicando a interação existente entre o adsorvente em questão e o analito de interesse que é parcialmente removido pelo eluente.

Por outro lado, a bifentrina, apresenta um $\log K_{ow} = 6,6$ o que indica que é um composto mais apolar e que, portanto, deveria apresentar uma forte interação com o adsorvente. Entretanto, através dos resultados da Tabela 9, observa-se que a recuperação do composto em questão foi igual a 80,1%, um valor relativamente elevado, indicando uma pequena interação com o adsorvente.

O CGB proporcionou, visivelmente, uma boa limpeza do extrato, como pode ser visto na Figura 31, pois remove substâncias coloridas (pigmentos) das amostras tratadas. Entretanto, apresenta pouca capacidade de eliminar os ácidos graxos, que

são interferentes da matriz e capazes de alterar a eficiência da ionização quando se usa um espectrômetro de massas como detector. Além disso, ácidos graxos residuais podem produzir amplos picos que se sobrepõem e interferem na análise de vários agrotóxicos. Por esse motivo, observa-se baixos valores nos percentuais de recuperação, sobretudo para o tiabendazol (1,2%), que é uma molécula planar susceptível a adsorção pelo CGB devido a forte afinidade entre esse agrotóxico e o adsorvente sendo parcialmente removido pelo eluente. A maioria dos componentes removidos pelo CGB, contudo, não interfere diretamente na análise de resíduos de agrotóxicos por cromatografia gasosa (Shimelis et al.,2007).

Figura 31. Extratos obtidos de acordo com diferentes adsorventes da esquerda para a direita: 1) PSA, 2) C18, 3) CGB, 4) Florisil, 5) Sem adsorvente.



O florisil (silicato de magnésio) é formado pela ligação de unidades tetraédricas $(\text{SiO}_4)^{4-}$ repetidas, com átomos de silício, ligando as cadeias Si-O-Si. As quatro ligações tetraedricamente direcionadas, derivadas dos quatro elétrons de valência de cada átomo de silício, resultam em ligações fortes e direcionadas. O florisil é um adsorvente com características polares. Alguns componentes da matriz são apolares, não sendo retidos pelo adsorvente. O uso do Florisil como adsorvente apresentou alto valor de área total, como pode ser visto na Figura 24, com um cromatograma apresentando vários picos (Figura 28), indicando a presença de vários interferentes capazes de comprometer a análise e gerar valores de recuperação superiores a 100%. Essa superestimação dos resultados é causada pelo aumento no sinal do detector. Isso ocorre quando impurezas voláteis são eluídas com mesmo tempo de retenção dos agrotóxicos (Pinho, et al., 2009).

Na etapa de *clean up* o objetivo principal não é concentrar a amostra, mas, sim, isolar o analito de interesse dos interferentes da matriz. Na análise de resíduos de agrotóxicos, por se tratar de uma matriz complexa, com diversos compostos presentes, é necessário isolar o agrotóxico dos outros componentes presentes no extrato antes da análise por cromatografia gasosa (Lanças, 2004). Essa etapa é fundamental, uma vez que reduz as interferências e o efeito da matriz, além de diminuir a necessidade de manutenção do sistema cromatográfico. O efeito da matriz é observado quando uma considerável diferença de resposta é obtida entre padrões preparados no solvente e aqueles preparados no extrato da matriz, com boa precisão (Cabrera et al., 2012).

Os valores de recuperação obtidos sem a realização da etapa de *clean up* variaram de um analito para outro e, em muitos casos, ficou acima da faixa de recuperação ideal. A presença dos componentes da matriz interferiu na análise, provocando aumento no sinal do detector para a maioria dos compostos. O valor de recuperação mais baixo para o carbofurano pode ter sido causado pela supressão da ionização provocado pelo efeito de matriz.

Tendo em vista os resultados apresentados o PSA foi escolhido como o adsorvente preferencial para o processo de extração dos agrotóxicos.

4.3 Planejamento Experimental

A eficiência do processo de extração e recuperação dos analitos de interesse foi avaliada por meio da análise multivariada, utilizando o planejamento fatorial fracionário, seguido do planejamento experimental Box-Behnken. A resposta utilizada na avaliação dos resultados foi a recuperação dos analitos. Os agrotóxicos selecionados foram adicionados às amostras na concentração de $2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

4.3.1 Planejamento Fatorial Fracionário

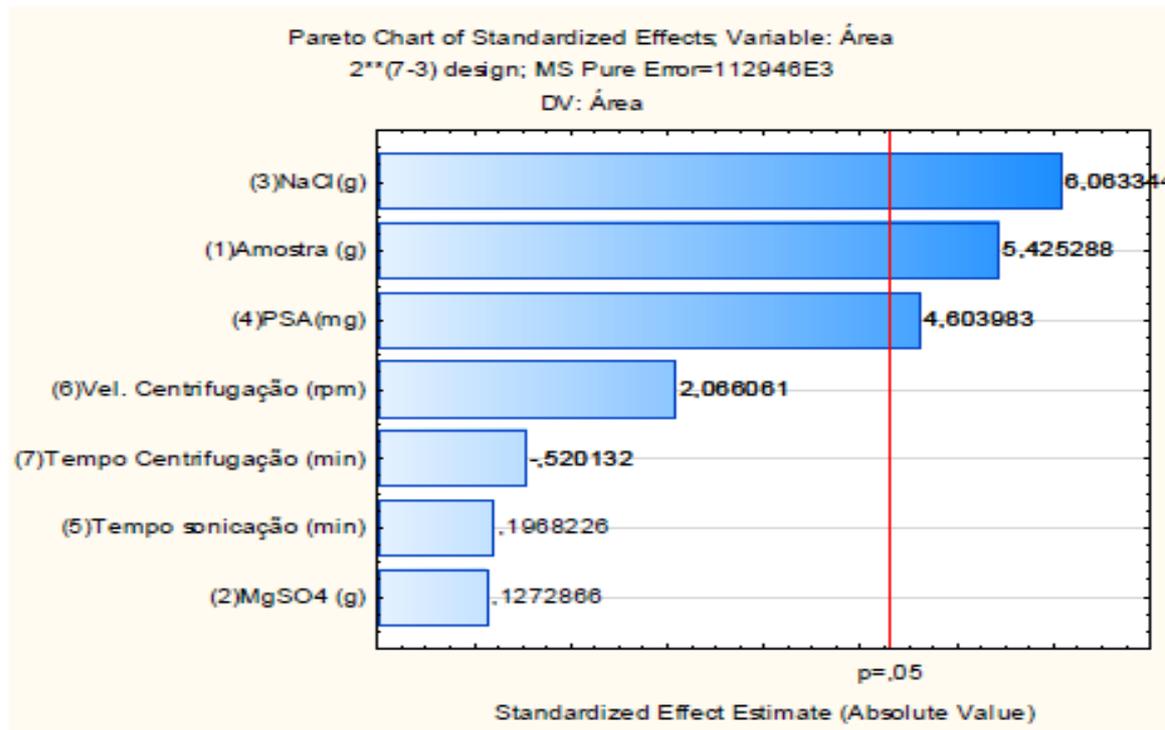
O planejamento fatorial fracionário do tipo 2^{7-3} , com três réplicas no ponto central, resultou em 19 experimentos que estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12. Matriz do planejamento fatorial fracionário.

Ensaio	Variáveis							Resposta (área total)
	Massa de amostra (g)	Massa de MgSO ₄ (g)	Massa de NaCl (g)	Massa de PSA (mg)	Tempo de Sonicação (min)	Velocidade de Centrifugação (rpm)	Tempo de Centrifugação (min)	
1	2	2	0	100	7	3000	1	137591
2	10	2	0	100	21	3000	5	139950
3	2	6	0	100	21	9000	1	143902
4	10	6	0	100	7	9000	5	145576
5	2	2	2	100	21	9000	5	183267
6	10	2	2	100	7	9000	1	221636
7	2	6	2	100	7	3000	5	153003
8	10	6	2	100	21	3000	1	199546
9	2	2	0	300	7	9000	5	170451
10	10	2	0	300	21	9000	1	187193
11	2	6	0	300	21	3000	5	172036
12	10	6	0	300	7	3000	1	196753
13	2	2	2	300	21	3000	1	166582
14	10	2	2	300	7	3000	5	212954
15	2	6	2	300	7	9000	1	180182
16	10	6	2	300	21	9000	5	232237
17 (C)	6	4	1	200	14	6000	3	221483
18 (C)	6	4	1	200	14	6000	3	204249
19 (C)	6	4	1	200	14	6000	3	202092

A partir dos experimentos realizados e da análise estatística das respostas descritas na Tabela11, utilizando os recursos do programa *Statistica* (StatSoft), obteve-se o diagrama de Pareto apresentado na Figura 32, a seguir:

Figura 32: Diagrama de Pareto do planejamento fatorial fracionário mostrando a influencia dos fatores estudados.



A magnitude dos efeitos é representada pelas colunas e a linha transversal às colunas mostra a magnitude dos efeitos com significado estatístico para $p=0,05$, o que quer dizer que os fatores são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança.

A análise da Figura 32 mostra que os fatores i) massa de amostra (g); ii) massa de NaCl (g); e iii) massa de PSA (g) influenciaram significativamente no processo de extração. Os números positivos para esses três fatores indicam que o aumento dos valores acarretaria um aumento na resposta e, em consequência, melhores resultados. O fator massa de NaCl apresentou uma influência relativamente maior do que os outros dois fatores. Isso pode ser explicado pelo fato de a adição de NaCl promover o efeito *salting out*, o que diminui a solubilidade dos analitos na fase aquosa favorecendo a sua transferência para a fase orgânica, o que, conseqüentemente, melhora a recuperação dos agrotóxicos.

4.3.2. Planejamento Box-Behnken

Uma vez que o número de variáveis significativas foi reduzido para três e que uma região em que as respostas obtidas se aproximaram do desejado foi localizada, elaborou-se um novo planejamento experimental. Os níveis mínimo e máximo de cada fator empregado no planejamento Box-Behnken estão descritos na Tabela 12 a seguir.

Nesse novo planejamento, buscou-se estimar uma superfície de resposta com base em uma equação quadrática e, também, a localização do máximo (ponto ótimo) desta superfície. Sendo assim, foi empregado o planejamento experimental do tipo Box-Behnken, associado à metodologia da superfície de resposta levando em consideração a média dos valores de recuperação e de efeito de matriz para os agrotóxicos estudados.

Decidiu-se utilizar como critério de avaliação do planejamento Box-Behnken uma resposta composta, que levasse em consideração o valor de recuperação e o efeito de matriz obtido em cada experimento. Além de um valor de recuperação adequado, é desejável que haja um mínimo de efeito de matriz possível para que assim os erros de análise possam ser reduzidos. A minimização de efeito da matriz também reduz os custos com a manutenção do equipamento de GC-MS já que não haverá necessidade frequente de limpeza do injetor e da fonte de íons do mesmo. Estes co-extrativos, responsáveis pelo efeito de matriz, podem suprimir ou aumentar a ionização dos analitos na fonte de íons do espectrômetro de massas, interferindo na detecção dos mesmos (Taylor, 2005; Niessem et al. 2006).

Kruve et al. 2008 propuseram um parâmetro, chamado de eficiência de processo, que leva em consideração os valores de recuperação e efeito de matriz conjuntamente. No entanto, para valores de efeito de matriz muito acima de 100%, o termo eficiência de processo também aumenta, tornando este parâmetro impróprio para utilização como resposta no planejamento Box-Behnken. Desse modo, foi desenvolvido um novo termo, chamado de desejabilidade global (D), que será discutido a seguir. (Derringer e Suich, 1980)

Para o cálculo da resposta foram utilizadas as equações mostradas abaixo, onde os valores de Recuperação (R) e Efeito de Matriz (EM) foram codificados. As equações (5), (6) e (7) descrevem o cálculo da recuperação codificada, denominada de desejabilidade da recuperação (d_R).

$$d_R = \left(\frac{R - 70}{100 - 70} \right)^3 \quad \text{se } 70 \leq R \leq 100 \quad (5)$$

$$d_R = \left(\frac{R - 120}{120 - 100} \right)^3 \quad \text{se } 100 \leq R \leq 120 \quad (6)$$

$$d_R = 0 \quad \text{se } R > 120 \text{ ou } R < 70 \quad (7)$$

Onde:

R = recuperação

d_R = desejabilidade da recuperação

O valor de recuperação (R) utilizado foi calculado conforme detalhado no item 3.5.1. Este sistema de equação leva em consideração se a faixa de valores de R adequada está entre 70 e 120% (Ribani et al., 2004). Desse modo, pode-se observar que quanto mais próximo de 100% maior o d_R e que quanto mais se afasta desse valor o d_R diminui. Se a média das recuperações estiver abaixo de 70% ou acima de 120%, d_R será zero.

As equações (8), (9) e (10) descrevem o cálculo de efeito de matriz codificado, denominada de desejabilidade do efeito de matriz (d_{EM}).

$$d_{ME} = \left(\frac{ME - 90}{100 - 90} \right)^3 \quad \text{se } 90 \leq ME \leq 100 \quad (8)$$

$$d_{ME} = \left(\frac{ME - 200}{200 - 100} \right)^3 \quad \text{se } 100 \leq ME \leq 200 \quad (9)$$

$$d_{EM} = 0 \quad \text{se } ME > 200 \text{ ou } ME < 90 \quad (10)$$

Onde:

ME = efeito de matriz (do inglês, *Matrix Effect*)

d_{ME} = desejabilidade do efeito de matriz

Para o valor de ME, considerou-se a faixa de 90 a 200%, que abrange os resultados de ME obtidos em análises prévias através deste método. Ressalta-se que não existe uma regulamentação para a faixa adequada de EM, pois o mesmo irá variar dependendo da metodologia aplicada, da natureza da amostra e do tipo de co-extrativos. Sendo assim, quanto mais próximo de 100% maior será o valor de d_{EM} e que quanto mais se afasta desse valor o d_{EM} diminui. Se os valores do efeito de matriz estiverem abaixo de 90% ou acima de 200% o valor de d_{ME} será zero.

Após obter os valores de R e ME, foi empregada a função desejabilidade para a otimização multiresposta do processo de extração. Essa função permitiu combinar em uma única resposta (a desejabilidade global) à média dos valores de recuperação e efeito de matriz obtidos para os agrotóxicos estudados. A desejabilidade global (D) é a raiz quadrada do produto de R xME, como pode ser visto na equação (8).

$$D = \sqrt{d_R \cdot d_{ME}} \quad (8)$$

A desejabilidade global (D) pode variar de 0 a 1. Desta forma, quanto mais próximo de 1 for o valor obtido, mais próximo de 100% estarão os valores de recuperação e efeito de matriz. A tabela 14 mostra os valores obtidos nos experimentos realizados.

Foram realizados 15 experimentos com três réplicas no ponto central, cujos fatores estão descritos na Tabela 13, tendo como resposta a desejabilidade global (D).

Tabela 13. Matriz do planejamento Box-Behnken.

Ensaio	Variáveis			Resposta (D)
	Massa de amostra (g)	Massa de NaCl (g)	Massa de PSA (mg)	
1	2	0	200	0,0000
2	10	0	200	0,0000
3	2	2	200	0,0000
4	10	2	200	0,1633
5	2	1	100	0,0000
6	10	1	100	0,0802
7	2	1	300	0,2318
8	10	1	300	0,2979
9	6	0	100	0,0052
10	6	2	100	0,0071
11	6	0	300	0,0417
12	6	2	300	0,1342
13 (C)	6	1	200	0,1442
14 (C)	6	1	200	0,2274
15 (C)	6	1	200	0,1723

D = desejabilidade global

Os valores dos parâmetros utilizados no cálculo da desejabilidade global são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14. Valores obtidos nos experimentos para o estudo do efeito de matriz.

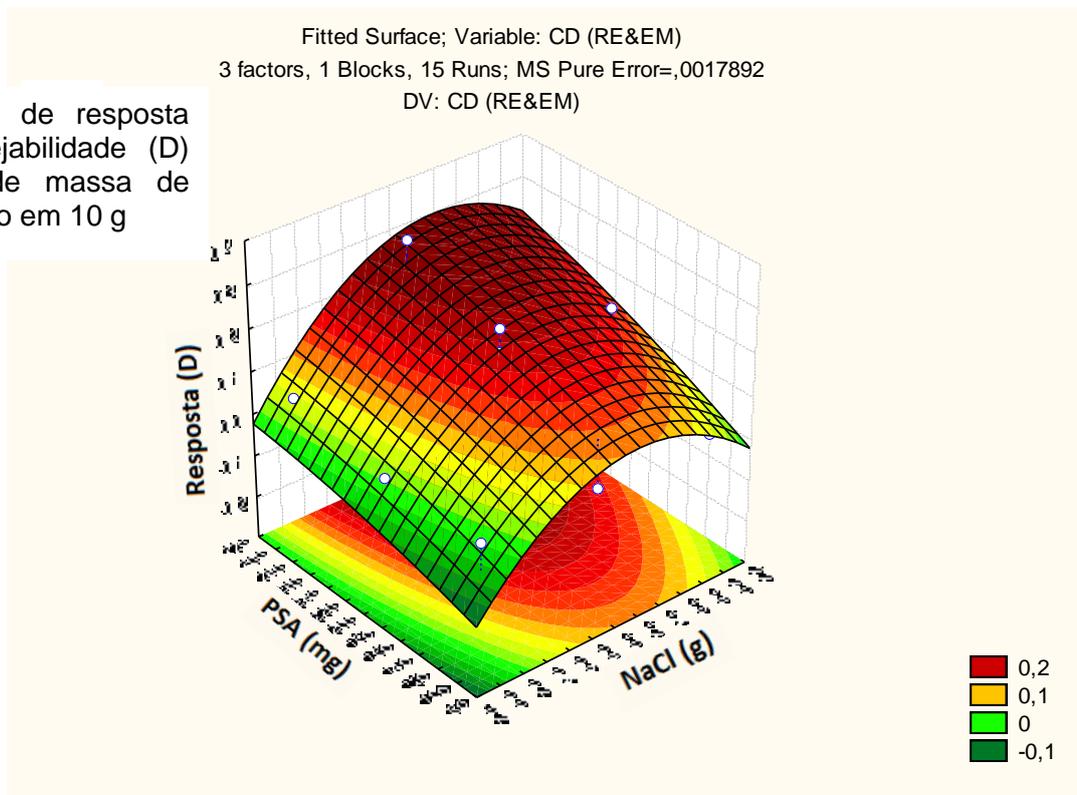
Ensaio	Recuperação (%)	Efeito de Matriz	d_R	d_{EM}	D
1	78,7	253,2	0,0244	0,0000	0,0000
2	79,1	321,1	0,0279	0,0000	0,0000
3	88,3	320,6	0,2270	0,0000	0,0000
4	97,0	166,8	0,7290	0,0366	0,1633
5	42,4	155,1	0,0000	0,0905	0,0000
6	84,3	161,0	0,1083	0,0593	0,0802
7	87,0	133,4	0,1820	0,2954	0,2318
8	95,2	146,9	0,5927	0,1497	0,2979
9	72,2	158,9	0,0004	0,0694	0,0052
10	72,0	144,4	0,0003	0,1719	0,0071
11	75,9	138,9	0,0076	0,2281	0,0417
12	84,3	145,0	0,1083	0,1664	0,1342
13	86,7	150,6	0,1725	0,1206	0,1442
14	94,4	154,2	0,5380	0,0961	0,2274
15	88,0	148,4	0,2160	0,1374	0,1723

D = desejabilidade global; d_R = desejabilidade da recuperação; d_{EM} = desejabilidade do efeito de matriz.

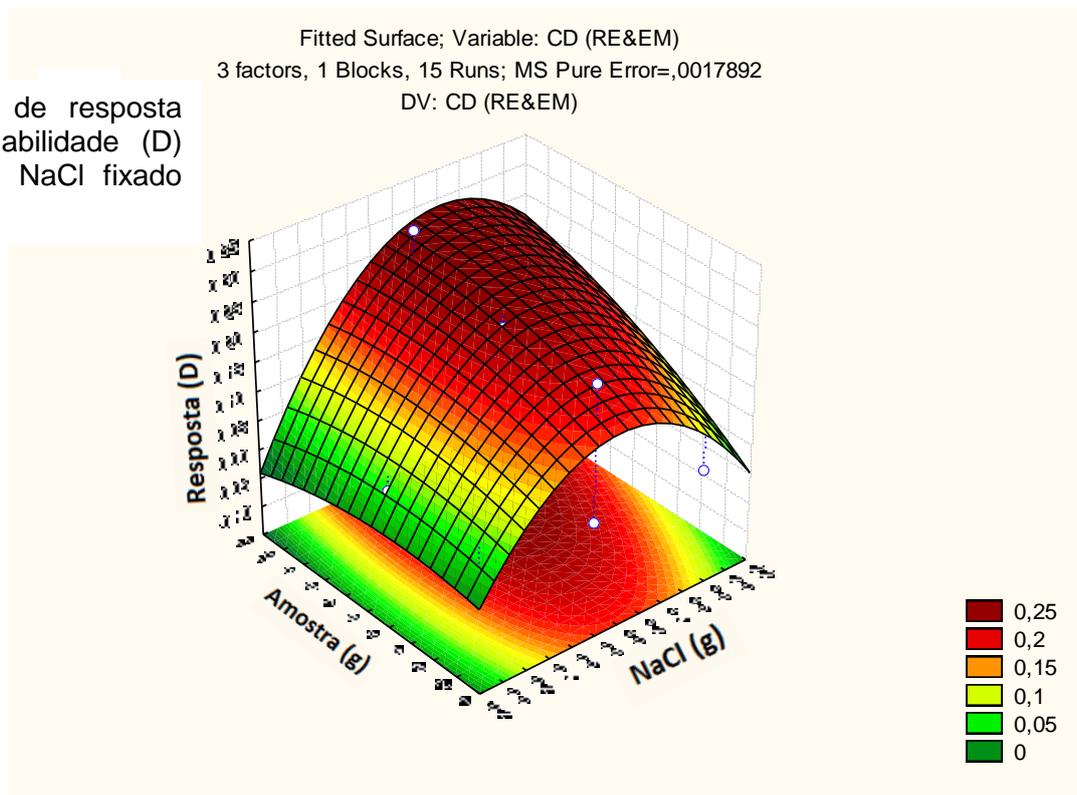
Pela análise da tabela acima, observou-se que o critério de desejabilidade global (D) variou de 0,0000 (experimentos 1, 2, 3 e 5) a 0,2979 (experimento 8). A análise estatística das respostas obtidas, utilizando o programa Statistica 6.0, permitiu a obtenção dos gráficos de superfície de resposta para a matriz Box-Behnken, conforme apresentado na Figura 33.

Figura 33. Superfícies de resposta (Box-Behnken).

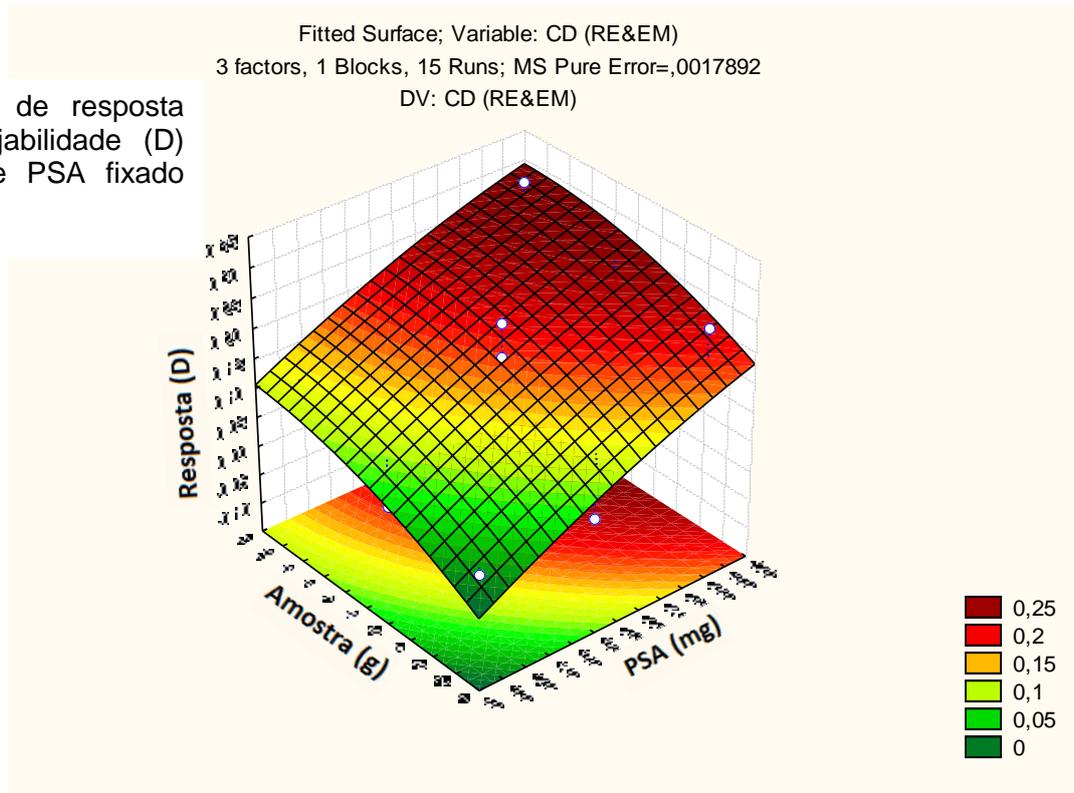
a) Superfície de resposta para a desejabilidade (D) com valor de massa de amostra fixado em 10 g



b) Superfície de resposta para a desejabilidade (D) com valor de NaCl fixado em 1,25 g.



c) Superfície de resposta para a desejabilidade (D) com valor de PSA fixado em 300 mg.

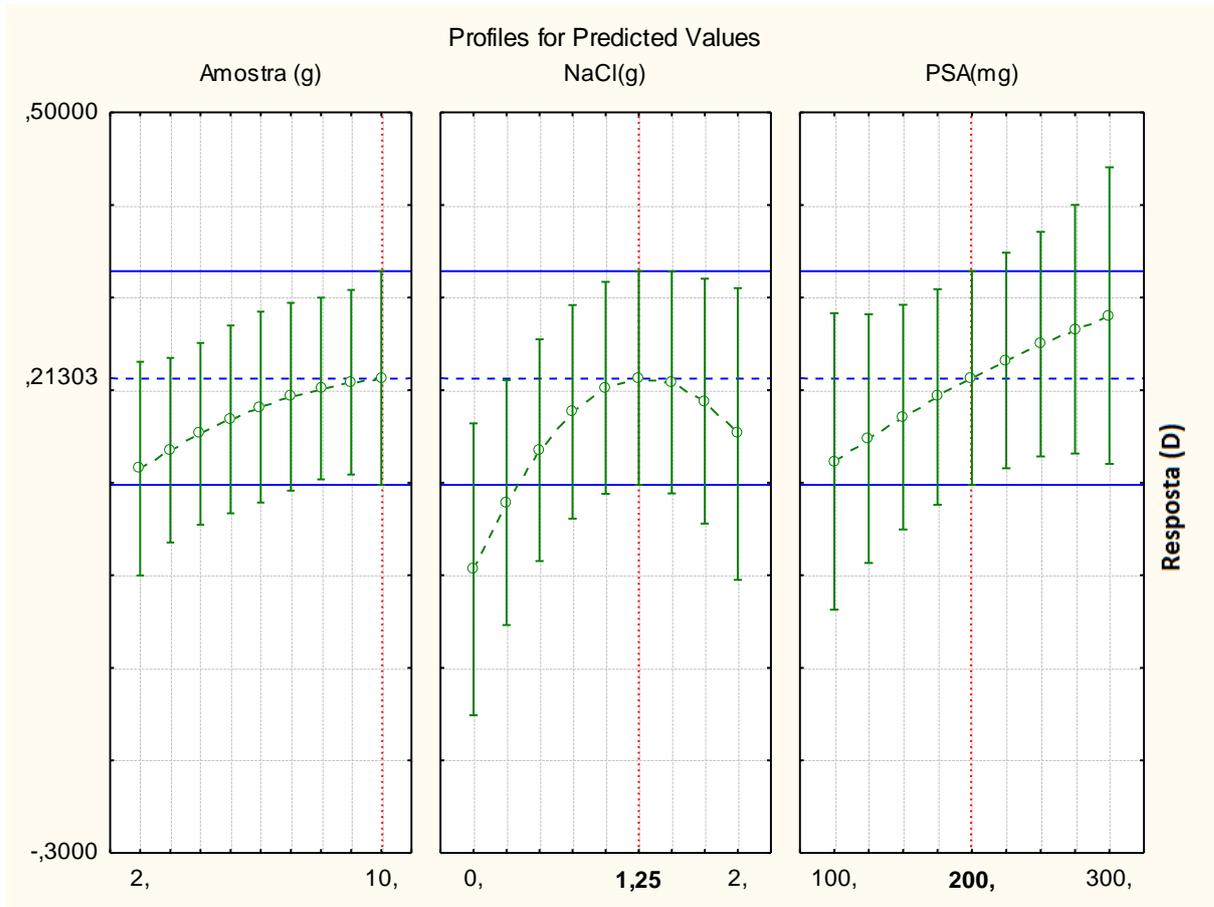


As curvas de superfície de resposta estão descritas através da equação a seguir:

$$D = (-0,20 \pm 0,04) - (0,121 \pm 0,02)m_{\text{NaCl}}^2 + (0,000766 \pm 0,00015)\text{PSA} + (0,273964 \pm 0,05)m_{\text{NaCl}} + (0,0097 \pm 0,004)m_{\text{amostra}} \quad (9)$$

A interpretação dos gráficos de superfície de resposta permite concluir que foi obtido um ponto ótimo para o parâmetro massa de NaCl, enquanto que para os outros dois parâmetros (massa de PSA e massa de amostra) está indicado uma tendência de aumento dos valores. A Figura 34 mostra os valores previstos para cada parâmetro, através do modelo construído.

Figura 34. Gráficos de previsão de valores para os parâmetros avaliados.



Através dos gráficos de superfície de resposta e de previsão de valores obtidos, foi possível estimar o valor ótimo para massa de NaCl em 1,45g, o qual está dentro da faixa de valores ótimos para o referido sal. Para o parâmetro massa de amostra observa-se que existe uma tendência de aumento deste parâmetro, extrapolando o limite experimental estabelecido, ou seja, indicando a utilização de uma massa de amostra acima de 10g. No entanto, o aumento da massa de amostra se torna limitado em função do espaço disponível no tubo de extração, que também deve conter o solvente extrator e os sais. Desse modo, decidiu-se fixar a massa de amostra em 10g, que foi o nível que apresentou maior resposta no planejamento experimental realizado.

Para o parâmetro massa de PSA, também foi observada uma tendência de aumento deste parâmetro além do limite experimental utilizado, ou seja, além de 300 mg. No entanto, decidiu-se não aumentar a massa de PSA devido ao custo é

relativamente elevado. Desse modo, considerando-se as respostas otimizadas com as quantidades de 1,45g de NaCl, 10g de amostra e 300mg de PSA. Portanto, estas condições foram consideradas como ótimas e aplicadas para o método de extração desenvolvido.

A tabela 15 mostra os valores de recuperação e efeito de matriz obtidos após aplicação das consideradas ótimas.

Tabela 15. Valores de Recuperação (%) e Efeito de matriz (%) obtidos no ponto ótimo.

Analito	Recuperação (%)	Efeito de Matriz (%)
Carbofurano	84,4	167,6
Tiametoxan	88,1	132,0
Tiabendazol	83,3	148,3
Imazalil	87,6	163,0
Tebuconazol	87,9	177,2
Bifentrin	92,0	127,8
Procloraz	87,3	174,6
Difenoconazol	89,3	151,2
Azoxistrobina	82,1	173,7

Os dados da Tabela 15 demonstram que todos os valores de recuperação variaram entre 82,1 e 92,0 e estão dentro da faixa recomendada (70 e 120%) pela ANVISA, INMETRO e AOAC, enquanto que os valores de efeito de matriz foram inferiores a 200%, variando entre 127,8% e 177,2%.

4.4 Figuras de mérito

Após a otimização das condições de extração pelo método QuEChERS e estabelecidas as condições cromatográficas para análise por GC-MS, foi realizado o estudo de linearidade, limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), precisão (RSD) intradia e interdia, exatidão pelo estudo de recuperação relativa em diferentes

níveis de fortificação e a recuperação absoluta. Todas as análises foram feitas em triplicata.

4.4.1 Curvas analíticas (Linearidade)

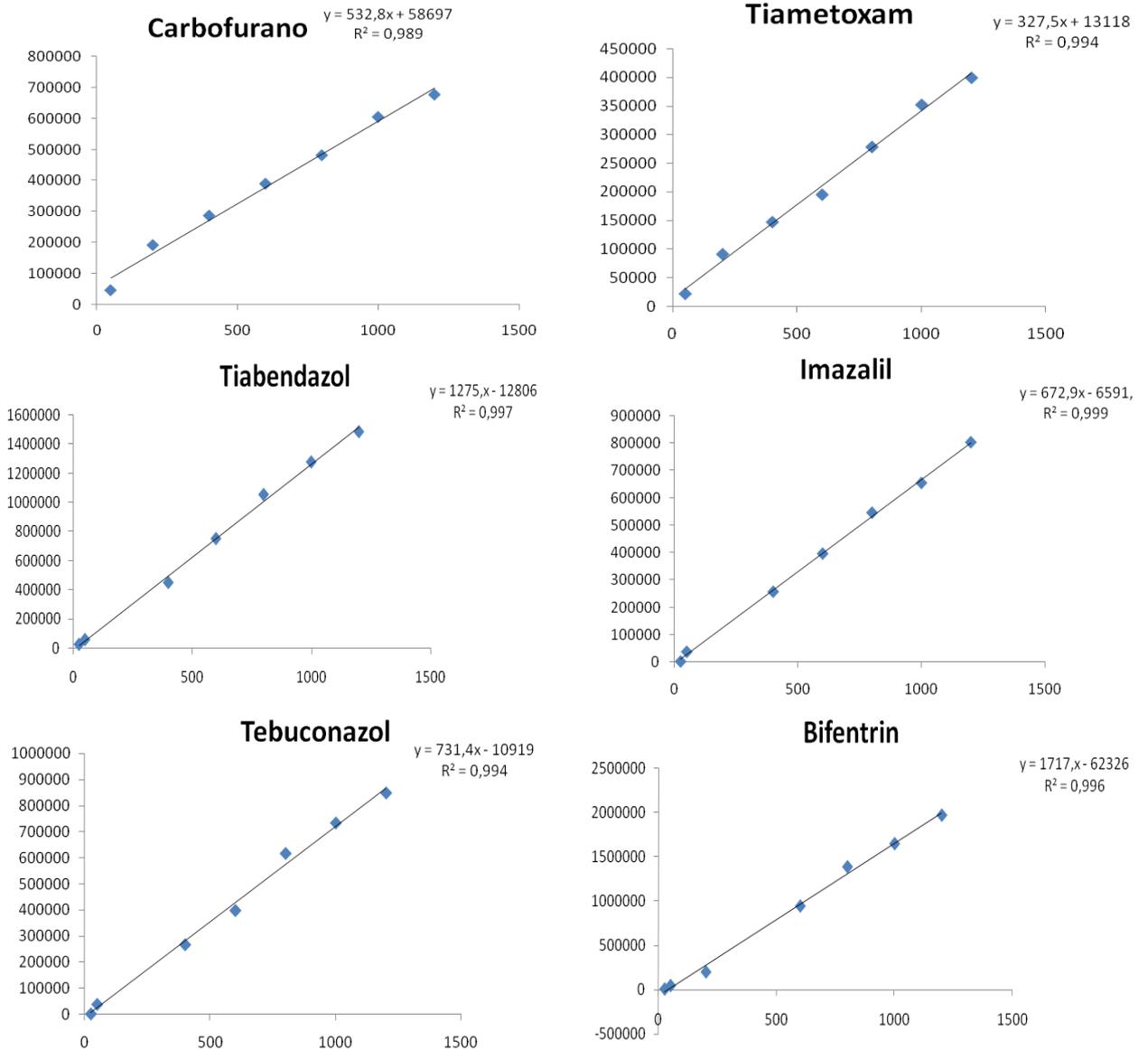
Os parâmetros de linearidade obtidos através do método do padrão externo estão apresentados na Tabela 16 juntamente com os valores dos limites máximos de resíduos de agrotóxicos estabelecidos pela ANVISA em 2014. Vale ressaltar que não há valor de LMR estabelecido para o carbofurano, pois o mesmo não é autorizado para o cultivo do mamão. As curvas analíticas foram obtidas a partir de soluções padrão com os analitos adicionados ao extrato da matriz, pois assim é possível eliminar ou reduzir a influência dos interferentes por compensação (Zrostlíková et al., 2002).

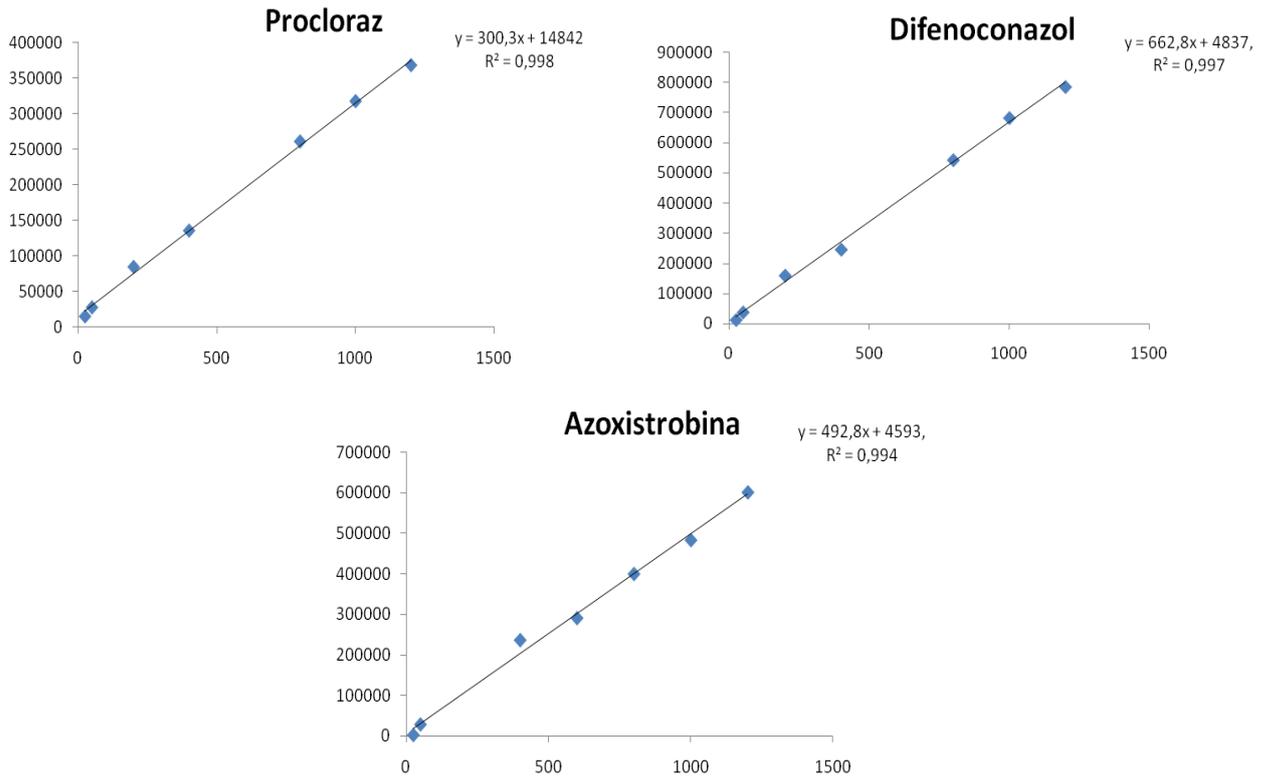
Tabela 16. Parâmetros da curva analítica, coeficientes de determinação e LMR de cada agrotóxico.

Analito	Equação da curva	R ²	Faixa linear de trabalho (µg kg ⁻¹)	LMR (µg kg ⁻¹)
Carbofurano	y= 532,8x + 58697	0,9894	25-1200	-
Tiametoxan	y= 327,5x + 13118	0,9945	25-1200	100
Tiabendazol	y= 1275,6x - 12806	0,9971	25-1200	6000
Imazalil	y= 672,9x - 6591,2	0,9990	25-1200	1000
Tebuconazol	y= 731,4x - 10919	0,9945	25-1200	1000
Bifentrin	y= 1717,4x - 62326	0,9962	25-1200	300
Procloraz	y=300,3x + 14842	0,9980	25-1200	1000
Difenoconazol	y= 662,8x + 4837,7	0,9972	25-1200	300
Azoxistrobina	y= 492,8x + 4593,3	0,9942	25-1200	300

Graficamente, as curvas analíticas para os nove agrotóxicos estudados estão representadas na Figura 36, a seguir:

Figura 35. Curvas analíticas para os nove agrotóxicos estudados.





A partir dos dados das curvas analíticas, observou-se que as equações apresentaram boa linearidade com coeficiente de determinação variando de 0,989 para o carbofurano e 0,999 para o Imazalil. Sendo assim, o modelo de regressão linear mostrou-se adequado para as determinações analíticas em estudo, visto que estão de acordo com as orientações da ANVISA e do INMETRO que recomendam respectivamente um valor igual a 0,99 e acima de 0,90.

A faixa linear de trabalho contempla os limites máximos de resíduos de agrotóxicos (LMR) estabelecidos pela ANVISA. Exceto para o Tiabendazol que apresenta um LMR maior do que o último ponto da curva analítica ($6000\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

4.4.2 Limites de detecção (LOD) e Limites de quantificação (LOQ)

Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos em conjunto com o estudo da faixa linear de trabalho na construção da curva analítica, estando os agrotóxicos em presença do extrato da matriz. Foram realizadas extrações sucessivas por QuEChERS, adicionando os padrões de analitos ao final do processo de extração.

Os LOD e LOQ foram estabelecidos utilizando a razão sinal/ruído de cada analito, obtidas com extrações dos analitos no extrato da matriz, quando ainda era obtido um sinal mínimo e mensurável de cada analito. A relação de 3:1 foi estimada como limite de detecção e a razão de 10:1 foi estabelecida como limite de quantificação. O menor nível de concentração na curva analítica corresponde ao início da faixa linear de trabalho e ao LOQ para cada composto. Os limites de detecção e de quantificação obtidos pelo método proposto são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17. Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) obtidos pelo método QuEChERS e CG-MS e LMR.

Analito	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Carbofurano	2,5	25	-
Tiametoxan	2,5	25	100
Tiabendazol	2,5	25	6000
Imazalil	2,5	25	1000
Tebuconazol	2,5	25	1000
Bifentrin	2,5	25	300
Procloraz	2,5	25	1000
Difenoconazol	2,5	25	300
Azoxistrobina	2,5	25	300

4.4.3 Precisão e Exatidão do método

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária, reprodutibilidade. No presente trabalho a precisão do método foi avaliada com o estudo da repetibilidade, realizando-se a avaliação da recuperação dos agrotóxicos selecionados para o estudo em três níveis de fortificação, os quais foram determinados seguindo as recomendações do GARP (Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas) para análises de resíduos, nos níveis de adição de 1, 2 e 10 vezes o valor de limite de quantificação. Na Tabela 18 constam os resultados obtidos.

Tabela 18. Recuperação (%) e RSD (%) para o estudo da precisão e exatidão do método em três níveis de fortificação.

Agrotóxico	Nível de Fortificação (μgkg^{-1})	Recuperação (%)	RSD (%)
Carbofurano	25	76,5	1,3
	50	116	3,3
	250	106,6	7
Tiametoxam	25	82,9	4,4
	50	96,6	2,7
	250	101,6	2
Tiabendazol	25	78,9	3,7
	50	87,7	0,7
	250	96,9	2,9
Imazalil	25	73,8	6,8
	50	94,7	1,3
	250	104,5	1,8
Tebuconazol	25	80,8	3,3
	50	99,7	1
	250	107	2,9
Bifentrin	25	100,2	4,4
	50	118,5	5,6
	250	112,2	2
Procloraz	25	74,9	2,2
	50	102,9	1,2
	250	106,9	4,2
Difenoconazol	25	79,1	3,4
	50	101,5	6,3
	250	110,5	2,9
Azoxistrobina	25	76,7	4,2
	50	103,5	4,7
	250	112,3	3,8

Para validação de métodos cromatográficos, os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos de agrotóxicos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$ (Ribani et al., 2004). De acordo com os dados da tabela acima, observa-se que os resultados obtidos são satisfatórios, pois estão todos na faixa indicada.

As recuperações dos agrotóxicos em amostras de mamão fortificadas foram mais eficientes em um nível de concentração mais elevado. É importante considerar como a eficiência do método varia em função da concentração da substância e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Os agrotóxicos são suscetíveis a efeitos adversos como problemas com a degradação e efeitos provenientes do sistema de injeção e da coluna cromatográfica (perda de capacidade). Quanto maior a disponibilidade desses agrotóxicos na matriz, maior será a probabilidade de recuperá-los. Por esse motivo, a recuperação foi avaliada na faixa de concentração esperada para o analito de interesse, adicionando-se a substância padrão em três diferentes concentrações.

A maioria dos agrotóxicos apresentou valores de recuperação acima de 100%, com exceção do tiabendazol que o maior valor apresentado foi 96,9%. A bifentrina foi o agrotóxico que apresentou melhores valores de recuperação em todos os níveis de concentração, sendo que com a fortificação de $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ houve uma maior recuperação acompanhada de um maior desvio padrão relativo (RSD). Dentre os agrotóxicos estudados, a bifentrina é a que apresenta maior valor do $\text{Log } K_{ow}$ (6,6). Isto significa que ele é o mais lipofílico e, portanto, tem menor afinidade com a fase aquosa no processo de extração, sendo mais disponibilizado para a fase orgânica, gerando maiores respostas.

Entre os analitos que não são afetados pelo efeito da matriz, estão os compostos considerados termicamente estáveis. Outros, porém, são mais suscetíveis apresentando resposta cromatográfica mais acentuada induzida pela matriz. O efeito de matriz é fortemente dependente da estrutura química do analito. As substâncias que apresentam em sua estrutura grupo fosfato ($-\text{P}=\text{O}$), hidroxila, amino, imidazol, benzimidazol e carbamato são mais susceptíveis ao efeito de

matriz, visto que são mais susceptíveis à adsorção pelos sítios ativos do insertor (Poole, 2007; Pinho et al., 2009).

Foi realizado também o estudo da precisão intermediária, onde foram feitas 15 extrações, três por dia, durante cinco dias consecutivos, com nível de fortificação de 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Esse estudo tem como objetivo certificar-se de que, no mesmo laboratório, o método fornecerá os mesmos resultados. Na Tabela são mostrados os valores do CV (%) variando entre 10,2 % para o Tebuconazol e 18,9% para o Procloraz. Estes valores estão abaixo do limite máximo permitido que é de 20% (Ribani et al.,2004).

Tabela 19. Coeficientes de variação obtidos no estudo da precisão intermediária do método QuEChERS por GC-MS.

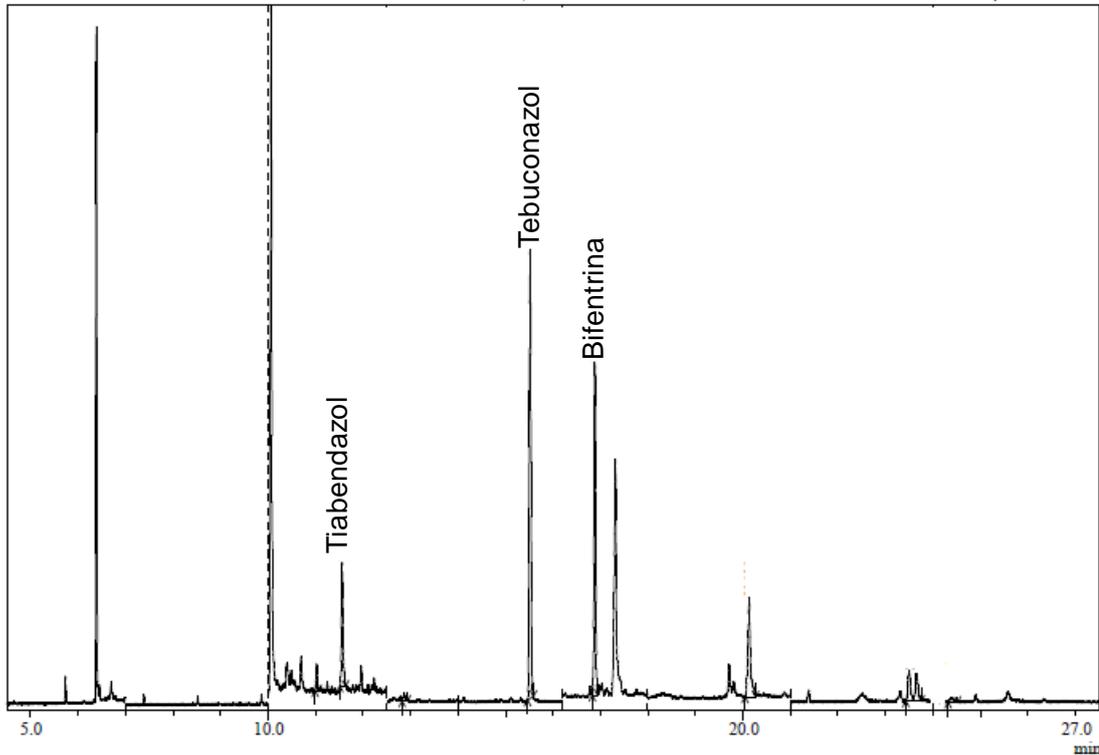
Agrotóxico	C.V (%), nível de fortificação agrotóxicos (50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) Precisão Intermediária (n=15)
Carbofurano	17,8
Tiametoxam	12,2
Tiabendazol	12,1
Imazalil	10,8
Tebuconazol	10,2
Bifentrin	12,0
Procloraz	18,9
Difenoconazol	16,5
Azoxistrobina	15,7

4.5 Aplicação do método QuEChERS modificado na análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de mamão

O método proposto foi aplicado na análise de 76 amostras de mamão papaia e formosa, das quais 37 apresentaram resíduos de agrotóxicos. As amostras foram coletadas em alguns pontos da cidade de Salvador, como supermercados, pequenos mercados, Feira de Água de Meninos e Mercado do Rio Vermelho. Foram obtidas também amostras de cidades do interior da Bahia, como Santo Antônio de Jesus, Conceição do Almeida, Cruz das Almas, Sapeaçu, Governador Mangabeira, Irecê, Eunápolis, Feira de Santana, Teixeira de Freitas e Itabela. De acordo com a origem as amostras foram divididas em grupos - mercado (M) e feira (F) ou em lotes (L1, L2, L3 e L4). Em seguida, todas foram imediatamente processadas seguindo o procedimento descrito no subitem 3.4. As análises foram feitas em triplicata e entre as análises de cada amostra foi sempre realizado um branco do método para evitar o efeito de memória e garantir a exatidão das medidas.

Na Figura 37, está ilustrado um cromatograma (GC-MS/SIM), de uma amostra de mamão, obtido nas condições otimizadas, em um tempo de análise de 27,5 minutos. Essa amostra foi coletada em Santo Antônio de Jesus, Bahia (mercado), observando-se no cromatograma os sinais referentes aos seguintes analitos: tiabendazol ($t_R = 11,47$ min.); tebuconazol ($t_R = 15,46$ min.); e bifentrina ($t_R = 16,82$ min.)

Figura 36. Cromatograma de uma amostra de mamão obtido no GC-MS modo SIM, coletada em Santo Antônio de Jesus, Bahia (mercado). Coluna DB1 J & Scientific (30 m x 0,25 mm ID x 0,25 μ m), utilizando hélio como gás de arraste, com velocidade linear de 40 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$.



Nas Tabelas 20, 21 e 22 são apresentados os resultados obtidos nas análises das amostras. Através dos dados das tabelas, é possível observar que para um dado agrotóxico os valores das concentrações são próximos para a maioria dos lotes. Isso se deve ao fato de as amostras serem provenientes de regiões vizinhas e que, provavelmente, são fornecidas por um mesmo produtor.

Em algumas amostras foram detectados os agrotóxicos tiabendazol, imazalil, tebuconazol, bifentrina e difenoconazol. Como pode ser visto nas tabelas a seguir, os valores da concentração desses compostos estão acima do limite de detecção ($\text{LOD} = 2,50 \mu\text{g kg}^{-1}$). Entretanto, somente o tebuconazol e a bifentrina foram quantificados, estando as suas concentrações em algumas amostras acima do LOQ ($25,00 \mu\text{g kg}^{-1}$). Não foram detectados os agrotóxicos carbofurano, tiametoxam, procloraz e azoxistobina. As concentrações dos agrotóxicos quantificadas nas amostras analisadas estavam abaixo do limite máximo de resíduo (LMR) (ANVISA, 2014).

Tabela 20. Resultados obtidos ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) das análises de mamão por QuEChERSem amostras de Salvador.

Local de coleta	Pequenos mercados			Supermercado Bompreço			Feira de Água de Meninos			Mercado Rio Vermelho		
	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3
Agrotóxico	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3
Carbifurano	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tiametoxam	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tiabendazol	10,43	10,29	n.d.	232,3	146,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Imazalil	10,36	9,830	9,870	10,48	10,91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tebuconazol	15,19	15,04	15,01	15,28	15,59	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Bifentrina	36,47	36,33	36,33	n.d.	37,94	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	37,44	36,60	36,82
Procloraz	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Difenoconazol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Azoxistrobina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,087	9,790	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Obs:

L= Lote; n.d.=não detectado

BP = Bompreço: L1, L2 e L3= mamão papaya;

Pequenos mercados: L1, L2 e L3 = Mamão papaia

Água de meninos: L1, L2 e L3 = Mamão papaia

Mercado Rio Vermelho: L1: mamão formosa; L2 e L3 = mamão papaia

Tabela 21. Resultados obtidos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) das análises por QuEChERS das amostras de algumas cidades do interior da Bahia.

Local de coleta	Santo Antonio de Jesus		Conceição do Almeida		Cruz das Almas		Sapeaçu		Governador Mangabeira	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Agrotóxico	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Carbifurano	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tiametoxam	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tiabendazol	11,50	10,53	10,40	10,84	10,42	10,22	n.d.	10,52	10,40	10,39
Imazalil	n.d.	n.d.	10,29	10,39	11,97	10,11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tebuconazol	24,23	23,48	16,52	16,46	28,26	18,53	n.d.	25,77	19,70	15,02
Bifentrina	39,13	36,50	38,01	39,36	50,79	38,51	n.d.	37,91	36,91	36,41
Procloraz	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Difenoconazol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,610	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Azoxistrobina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Obs:

M= mercado; F= feira; n.d.=não detectado

Tabela 22. Resultados obtidos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) das análises por QuEChERS das amostras de algumas cidades do interior da Bahia.

Local da coleta	Irecê		Eunápolis		Feira de Santana			Teixeira de Freitas				Itabela			
	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4
Agrotóxico	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4
Carbifurano	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tiametoxam	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tiabendazol	n.d.	n.d.	10,48	10,41	10,73	10,52	10,46	33,37.	n.d.	n.d.	n.d.	10,44	10,30	11,54	10,40
Imazalil	n.d.	n.d.	9,960	10,83	n.d.	10,05	9,86	10,25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9,840	13,91	n.d.
Tebuconazol	n.d.	n.d.	15,59	16,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	15,03	15,22	28,23	15,08
Bifentrina	36,99	37,72	39,44	44,96	36,39	36,45	36,45	40,45	37,26	41,41	37,30	36,38	37,39	58,02	36,57
Procloraz	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Difenoconazol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Azoxistrobina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Obs:

n.d.=não detectado

5 CONCLUSÕES

Os resultados mostram que o método de extração de resíduos de agrotóxicos desenvolvido a partir do método QuEChERS e análise por GC-MS pode ser aplicado em análises qualitativas e quantitativas de resíduos de agrotóxicos em mamão. A metodologia analítica proposta mostrou-se eficiente para extrair agrotóxicos carbofurano, tiametoxam, tiabendazol, imazalil, tebuconazol, bifentrina, procloraz difenoconazol e azoxistrobina em amostras de mamão.

O estudo do adsorvente adequado para etapa de *clean up* do processo de extração mostrou que o PSA foi capaz de promover a limpeza do extrato bem como melhorou a resposta do sinal analítico dos compostos de interesse.

Através da realização do planejamento experimental fracionário foi possível definir que as variáveis massa de amostra (g), massa de NaCl (g), massa de PSA (g) influenciaram significativamente no processo de extração. A utilização conjunta de matriz Box-Behnken e função de desejabilidade como recursos estatísticos permitiram a otimização da extração, mostrando que as melhores respostas foram obtidas com 1,45g de NaCl, 10 g de amostra e 300mg de PSA. O efeito de matriz deve ser considerado, uma vez que pode resultar em mudanças na eficiência de ionização ocorrendo supressão ou aumento da ionização dos analitos, causando alterações nas análises cromatográficas. Além disso, componentes da matriz presentes na amostra podem co-eluir com os analitos de interesse provocando aumento na resposta do detector.

Para validação do método, foram determinadas a linearidade, precisão, limites de detecção e de quantificação, além de estudos de recuperação. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram respectivamente iguais a $2,50\mu\text{g kg}^{-1}$ e $25,00\mu\text{g kg}^{-1}$. No estudo da precisão e exatidão foram obtidos resultados satisfatórios, na faixa de 0,7 % a 7 %, os quais estão dentro dos limites estabelecidos para a análise de traços (ANVISA). Os valores de recuperação variaram de 73,8% a 118,5%, estando dentro do intervalo aceitável.

A aplicação do método em amostras de mamão (formosa e papaya), comercializadas na cidade de Salvador, BA, permitiu a detecção de resíduos

de quatro dos nove agrotóxicos estudados: tiabendazol, imazalil, tebuconazol, bifentrina e azoxistrobina. Estes compostos apresentaram valores de concentração acima do LOD ($2,50 \mu\text{g kg}^{-1}$), como pode ser visto nas tabelas 19, 20 e 21. Somente a bifentrina e o tebuconazol apresentaram concentrações acima do LOQ, respectivamente nas faixas de 36, 33 a $58,02 \mu\text{g kg}^{-1}$ e 15,01 a $28,23 \mu\text{g kg}^{-1}$. A bifentrina foi o composto presente em um maior número de amostras.

As análises das amostras coletadas nos municípios do interior da Bahia (mamão papaya) apresentaram resíduos de tiabendazol, imazalil, tebuconazol, bifentrina e difenoconazol, sendo que a bifentrina foi o composto presente em um maior número de amostras e com maiores concentrações. A bifentrina é um acaricida, inseticida e formicida com amplo espectro de ação.

As concentrações individuais encontradas foram menores do que os valores estabelecidos pela legislação brasileira. Apesar disso, os resultados demonstram a necessidade do monitoramento de resíduos de agrotóxicos em frutas pelos órgãos responsáveis para que a segurança alimentar da população seja resguardada e o meio ambiente preservado.

6 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Aplicar o método desenvolvido em outros tipos de matrizes de diferentes naturezas, por exemplo, outras frutas e hortaliças.

Fazer o estudo comparativo deste método com outras técnicas de extração como, por exemplo, a micro-extração líquido-líquido dispersiva (*Dispersive liquid-liquid microextraction - DLLME*) e a micro-extração com gota diretamente suspensa (*Directly suspended droplet microextraction - DSDME*);

6.1 Trabalhos apresentados em congressos

CARVALHO, G. A.; GUARIN, R. R.; ARAÚJO, C. B.; MESQUITA, P. R. R.; LOPES, W. A.; RODRIGUES, F. M. Avaliação de diferentes adsorventes na extração de agrotóxicos em mamão utilizando o método QuEChERS. 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas e Lindóia, São Paulo, 2012.

Graziele de A. Carvalho, Paulo R. R. Mesquita, Fábio S. Oliveira, Frederico de M. Rodrigues, Wilson A. Lopes. Otimização multivariada de método QuEChERS para extração de agrotóxicos em mamão. 17º Encontro Nacional de Química Analítica. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2013.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitosanitários (2012). MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Available at <http://www.agricultura.gov.br/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit>.

ALBERO, B.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; TADEO, J. L. Multiresidue determination of pesticides in juices by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Talanta** v. 66, p. 917–924, 2005.

ANASTASSIADES, M.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **J. AOAC Int.**, v.86, p. 412-431, 2003.

ANJOS, J. P. **Desenvolvimento e aplicação de método multirresíduo por sdme/gc-ms para a determinação de 19 pesticidas em amostras de água de coco e vinho branco**. Salvador, 2014. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Bahia.

ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

ANVISA. Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Rev. Saúde Públ.**, v. 40, n.2, p. 361-363, 2006.

ANVISA; UFPR. **Seminário A Regulação e o Mercado de Agrotóxicos no Brasil**. Brasília: ANVISA. Acesso em: 6 de abril de 2013.

ARAÚJO, A. C.; SILVA, L. M. R.; KHAN, A. S.; ARAÚJO, L. V. **A Cultura do Mamão em Municípios Selecionados do Extremo Sul da Bahia: Análise do Índice Tecnológico da Comercialização e do Custo Social das Perdas**. Documentos Técnicos Científicos. Vol 41, Nº 4, Out-Dez, 2010

BARBIERI, E. Pesticidas: **Um problema grave de saúde pública e ambiental** Fevereiro de 2006. Disponível em: <http://abdl.org.br/article/articleview>. Acessado em 08 de julho de 2011.

BEYER, A.; BIZIUK, M. Applications of Sample Preparation Techniques in the of Pesticides and PCBs in Food. **Food Chem.** v. 108, p. 669-680, 2008.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos, **Quim. Nova**, Vol. 34, Nº 1, p. 10-15, 2012.

BRITO, N. M.; JÚNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; SANTOS, T. C. R.; RIBEIRO, M. L. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Vol. 12, p. 155-168, 2002.

BULL, D.; HATHAWAY, D. **Pragas e venenos: agrotóxicos no Brasil e no terceiro mundo**. Petrópolis: Vozes, 1986.

CABRERA, L. C.; MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Extração em fase sólida dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, Vol4, Nº 3, p. 227-240 2012.

CARNEIRO, F. F; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G.S..RIZZOLO, A; MULLER, N M; ALEXANDRE, V P.; FRIEDRICH, K; MELLO. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 - **Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde**. MSC. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012.

CERQUEIRA, M. B. R.; CALDAS, S. S; PRIMEL, E. G. New sorbent in the dispersive solid phase extraction step of quick, easy, cheap, effective, rugged and safe for te extraction of organic contaminants in drinking water treatment sludge. **J. Chromatogr. A**, Vol. 1336, p. 10-22, 2014.

CHU, Xiao-G.; HU, Xiao-Z.; YAO, Hui-Y. Determination of 266 pesticides residues in apple by matrix solid-phase dispersion and gás chromatography-mass selective detection.**J. Chromatogr. A**, v. 1063, p. 201-210, 2005.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. e BONATO, P.S. **Introdução a métodos Cromatográficos**. 5ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; MICHEREFF, S. J.; NASCIMENTO, L.C; GURGEL, L. M. S.; PESSOA, W. R. L.S; Doenças Fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na central de abastecimento do Recife.**Fitopatol. Bras.**, Vol28, nº 5, Set - Out 2003.

DERRINGER G.; SUICH R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **J. QUAL. TECHNOL**, Vol. 12, p. 214-219, 1980.

DÓREA, H.S.; LOPES, G.W. Aplicação da Técnica de Dispersão da Matriz em Fase Sólida (DMFS) na Análise de Pesticidas em Quiabo por CG-EM.**Quím.Nova**, v.27, p. 892-896, 2004.

EDWARDS, D. J.; MEE, R. W. **Fractional Box-Behnken Designs**.

FARIA, A. B. C. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 5 nº. 2, p. 345-358, Maio/Ago, 2009.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; SILVA, E. G.P.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; DAVID, J. M.; ANDRADE, J. B.; BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; NETO, B. B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **J.Chromatogr.A**, Vol. 1158. p. 2-14, 2007.

FILHO E. R. P.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Emprego de planejamento fatorial para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, cd, mo e pb por ETAAS. **Quím. Nova**, v. 25, n. 2, p. 246-253, 2002.

FILHO, A. M.; SANTOS, F. N.; PEREIRA, P. A. P. Development, validation e application of a method based on DI-SPME and GC-MS for determination of pesticides of different chemical groups in surface and groundwater samples. **Microchem.J.**, Vol 96, p 139-145, 2010.

FILHO, A. M; SANTOS, F. N.; PEREIRA, P. A. P. Development, validation e application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticides residues in mangoes. **Talanta**, Vol 81, p 346-354, 2010.

FILHO, A. M **Desenvolvimento, aplicação de metodologia para a determinação de resíduos de pesticidas em tomate por dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)**. Aracaju, 2005. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe.

FILHO, A. M **Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologias para determinação de resíduos de agrotóxicos em manga por SPME-GC-MS e SPME-HPLC-UV-ViS**. Salvador, 2010. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Bahia.

FILHO, H. P. S.; OLIVEIRA, A. A. R.; NORONHA, A. C. S.; SANCHES, N. F.; LOPES, F. F.; ANDRADE, P. R. O.; OSÓRIO, A. C. B.; SOUZA, J. A.; OLIVEIRA, A. M. G; SANTOS, M. J. **Monitoramento e controle da pinta preta do mamoeiro**. ISSN 1809-502X, EMBRAPA. Cruz as Almas-Ba. Dez, 2007.

FORD, K. A.; GULEVICH, A. G.; SWENSON, T. L.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticides: oxidative stress in planta and metallo-oxidase inhibition. **J. Agric. Food Chem.**, v.59, p.4860–4867, 2011.

FÜRSTENAU, V. Política de Crédito Rural na Economia Brasileira após 1960. Ensaio FEE, Porto Alegre, 8(1): p.139-154, 1987.

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; Coutinho, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVZCA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Quím. Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.

Instituto Nacional e Metrologia, Normalização e Qualidade e Tecnologia (INMETRO). **Orientação sobre validação de métodos analíticos** DOQ-CGCRE-008, Revisão 03 – FEV/2010.

JARDIM, I.C.S.F.; ANDRADE, J.A. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Quim.Nova**, Vol. 32, No. 4, 996-1012, 2009.

KEBARLE, P.; TANG, L. From ions in solution to ions in the gas phase: The Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry. **Anal. Chem.**, v 65, nº. 22, 1993.

KRUVE, A.; KÜNNAPAS, A.; HERODES, K.; LEITO, I.; Matrix effects in pesticides multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. **J.Chromatogr. A**, Vol. 1187. p. 58-66, 2008.

KUGLER, H. Revista Ciência Hoje, Vol 50, p. 20-25, 2012.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (Solid phase extraction)**. São Carlos: Ed. Rima, 2004.

LEHOTAY, S.J., Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **J. Chromatogr. A**, Vol. 1217, p. 2548-2560, 2010.

LEHOTAY, S.J.; KOESUKWIWA, U.; KAM, H. V. D.; MOL, H. G. J.; LEEPIPATPIBOON, N. Qualitative Aspects in the Analysis of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables Using Fast, Low-Pressure Gas Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, Vol. 59, p. 7544–7556, 2011.

LI, Y-F; QUIAO, L-Q; LI, F-W; DING, Y; YANG, Z-J; WANG, M-L. Determination of multiple pesticides in fruits and vegetables using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method with magnetic nanoparticles and gas chromatography tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, Vol. 1361, p. 77-87, 2014.

LING, Y.-C.; Huang, I. P. Multi-residue matrix solid-phase dispersion method for the determination of six synthetic pyrethroids in vegetables followed by gas chromatography with electron capture detection. **J. Chromatogr. A**, Vol. 695, p. 75-82, 1995.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil um Guia Para Ação em Defesa da Vida**, 1ª ed. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.

LORENZ, J. G.; COSTA, L. L. F.; SUCHARA, E. A.; SANT'ANNA, E. S. Multivariate Optimization of the QuEChERS-GC-ECD Method and Pesticide Investigation Residues in Apples, Strawberries, and Tomatoes Produced in Brazilian South. **J. Braz. Chem. Soc.** Vol. 25, P. 1583-1591 N.º. 9, 2014.

LUCCHESI G. **AGROTÓXICOS-CONSTRUÇÃO DA LEGISLAÇÃO**. Consultoria Legislativa, Brasília, 2005.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Análise de resíduos e contaminantes em alimentos**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, MAPA/ACS, 2011.

MARGNI, M.; ROSSIER, D.; CRETZAZ, P.; JOLLIET, O.; Life cycle impact assessment of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to pesticides on human health and ecosystems. **Agriculture, Ecosyst. Environ.**, Vol. 93, p.379, 2002.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Quim.Nova**, Vol. 36, Nº.8, p.1248-1255, 2013.

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

MAZOYER, M.; ROUDART L. História das agriculturas no mundo: do neolítico à crise contemporânea; [tradução de Cláudia F. Falluh Balduino Ferreira]. – São Paulo: Editora UNESP; Brasília, DF: NEAD, 2010.

MEDEIROS, F. R. **Análise de COV por HS-MEFS acoplada a CGAR-EM**. Salvador, 2008. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia.

MENDES, L.G. (Ed.). **Mamão no Brasil**. Cruz das Almas: EAUFBA/EMBRAPA-CNPMP, p.179, 1996.

MEYER T.N.; RESENE, I. L. C.; ABREU, J. C. Incidência de Suicídios e Uso de Agrotóxicos por Trabalhadores Rurais em Luz (MG), Brasil. **Rev. Bras. Saúde Ocup.**, Vol 32, nº116,: p.24-30, 2007.

MONTEIRO, S. Mamão: vitórias e desafios. **Revista frutas e derivados**. Ano 1, Ed. 2. Junho, 2006.

MOREIRA, J.C.; JACOB, S.C.; PERES, F.; LIMA, J.S. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola em Nova Friburgo-RJ, **Ciência e Saúde Coletiva**, Vol 7, p.1-22, 2002.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 6, p.1401-1406, 2006.

NEVES, C. F. C.; SCHVARTZMAN, M. M. A. M.; JORDÃO, E. Técnica para seleção de variáveis aplicada à separação de gases. **Quim. Nova**, Vol. 25, No. 2, 327-329, 2002.

NGUYEN, T. D.; LEE, M. H.; LEE, G. H; Rapid determination of 95 pesticides in soybean oil using liquid-liquid extraction followed by centrifugation, freezing and dispersive solid phase extraction as cleanup steps and gas chromatography with mass spectrometric detection. **Microchem. J.**, Vol 95, p. 113-119, 2010.

NIESSEM, W. M. A.; MANINI, P.; ANDREOLI, R. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography–mass spectrometry.**Mass Spectrom. Rev.**, Vol. 25, p. 881– 899, 2006.

PINHO, G.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Quím.Nova**, Vol. 32, nº.4, p. 987-995, 2009.

POOLE, C. F. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. **J.Chromatogr.A**, v. 1158, p 241-250, 2007.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 6, 1620-1634, 2009.

QUEIROZ, S. C. N; FERRACINE, V. L.; ROSA, M. A. Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando QuEChERS e UPLC-MS/MS. **Quim. Nova**, Vol. 35, No. 1, p.185-192, 2012.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B.G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, Vol. 27, No. 5, p.771-780, 2004.

RICE, P.J.; RICE, P. J.; ARTHUR, E. L.; BAREFOOT, A. C. Advances in Pesticide Environmental Fate and Exposure Assessments. **J. Agric. Food Chem**, Vol 55, p. 5367–5376, 2007.

RODRIGUES, F. M. **Determinação de compostos orgânicos voláteis por meio das técnicas “headspace” e microextração em fase sólida, associada à cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas.** Salvador, 2007. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia.

RODRIGUES, S. A.; CALDAS, S. S.; FURIONG, E. B.; PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R. Otimização e Validação de Método Empregando QuEChERS Modificado e LC-ESI-MS/MS Para Determinação de Agrotóxicos em Cebola. **Química Nova**, Vol.34, Nº 5, p. 780-786, 2011.

ROMERO-GONZALES, R.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, Vol. 76, p. 211–225, 2008.

SERRANO, L. A. L.; CATTANEO, F. L. O Cultivo do mamoeiro no Brasil. **Rev.Bras. Frutic.**, Vol 32, Nº.3 p. 657-959, 2010.

SHIMELIS, O.; YANG, Y.; STERNESON, K.; KANEKO, T.; YE, M. Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis. **J. Chromatogr. A**, Vol. 1165, p 18-25, 2007.

SILVA, C.M.M.S; MELO, I. T; Biodegradação de fungicidas benzimidazóis. **Microbiologia Ambiental**, EMBRAPA, p. 141-160.

SILVA, C.M.S.S; FAY, E. F. **Agrotóxicos e Ambiente**, Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004.

SKOOG, WEST, HOLLER & CROUCH; Tradução GRASSI, M. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª ed. São Paulo; Cenage Learning, 2008.

SNYDER, L. R. Linear elution adsorption chromatography videactivated florasil as adsorbent. **J. Chromatogr. A**. Vol. 12, p 488-509 (1963).

SOARES, W.L. **Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a Agricultura**. Tese de Doutorado em Saúde Pública e Meio Ambiente. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

SPADOTTO, C. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. **Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar - FMR**, São Manuel, 9p., 2006.

TAYLOR, P. J. Matrix effects: the Achilles hell of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tanem mass spectrometry. **Clin.Biochem**.Vol. 38, p. 328–334, 2005.

THOMSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. **Pure Appl. Chem.**, Vol. 74, N^o. 5, p. 835–855, 2002.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, Vol. 64, n. 2, p. 135-142, 2002.

TORRES, F. Z. V. **Translocação do inseticida tiametoxam no floema de mamoneira e cafeeiro**. Minas Gerais, 2009. Tese (Doutorado em Agronomia/Entomologia) – Universidade Federal de Lavras.

WILKOWSKA, A.; DROZDZYNSKI, D.; GNUSOWSKI, B.; Determination of Pesticide Residues in Food Matrices Using the QuEChERS Methodology. **Food Chem.**, Vol. 125, p. 803-812, 2010.