



FURG

Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE
AGROTÓXICOS EM CENOURA EMPREGANDO
QuEChERS E GC-MS**

Juliana Luiz da Silva Batista

PPGQTA

Santo Antônio da Patrulha, RS - Brasil

2015

DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CENOURA EMPREGANDO QuEChERS E GC-MS

por

Juliana Luiz da Silva Batista

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

PPGQTA

Santo Antônio da Patrulha, RS – Brasil

2015

Universidade Federal do Rio Grande
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química
Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE
AGROTÓXICOS EM CENOURA EMPREGANDO QuEChERS
E GC-MS**

elaborada por

Juliana Luiz da Silva Batista

Como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves
(Universidade Federal do Rio Grande - RS)

Prof. Dr. Manoel Leonardo Martins
(Universidade Federal do Rio Grande - RS)

Prof^a Dr. Fernanda Arnhold Pagnussatt
(Universidade Federal do Rio Grande - RS)

Prof^a Dr. Emilene Mendes Becker
(Universidade Federal do Rio Grande do Sul - RS)

Santo Antônio da Patrulha, 03 de julho de 2015.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado o maravilhoso dom da vida, saúde, perseverança, proteção e por sonhar os meus sonhos, por fazer de mim um ser capaz de vencer obstáculos jamais imaginados por mim. Obrigada Pai por colocar no meu caminho pessoas especiais e tão importantes na minha vida.

Ao meu esposo Marcelo, pela paciência, companheirismo e amor, sem você com certeza essa caminhada teria sido muito mais difícil, obrigada por acalmar como ninguém o meu coração, por fazer eu me sentir uma gigante, por sempre apoiar minhas decisões. Vida te amo para sempre, essa conquista eu dedico inteiramente a você.

A minha família, mãe (Ana), pai (Osmar), meus irmãos (Diego, Ana Paula, Adriana, Andreza, Luciana e Mateus), meus afilhados (Giovanna e Henry), obrigada por compreenderem cada ausência minha e por estarem ao meu lado a cada conquista. Desculpa por inúmeras vezes ter faltado aos encontros em família e obrigada por entenderem todo cansaço que uma professora e mestranda podem sentir. Amo muito vocês.

Ao Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves, obrigada por todas as sugestões durante o trabalho, pela oportunidade, incentivo, parceria, apoio, humildade, respeito, que permitiram que eu evoluísse como pessoa. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Manoel Leonardo Martins, pelas valiosas contribuições, pela humildade em dividir em muitos momentos seu conhecimento, pela paciência em me explicar minuciosamente e pelos seus ricos ensinamentos, que foram indispensáveis para este trabalho. Sem contar na presença na banca de qualificação e defesa.

A Dr. Marcia Kurz, pelas valiosas contribuições e ajuda constante principalmente no início do mestrado, quando eu caí de paraquedas após o curso de licenciatura, jamais tinha trabalhado num laboratório antes e a Marcinha foi a pessoa perfeita para me acompanhar, obrigada pela paciência e por sempre estar disposta a ajudar.

A Prof^a Dr. Emilene Mendes Becker por aceitar participar da banca de defesa e pelas valiosas contribuições e sugestões, que enriqueceram o trabalho.

A Prof^a Dr. Fernanda Arnhold Pagnussatt por aceitar fazer parte da banca de qualificação e de defesa, por instigar curiosidades que não tinham vindo a minha memória, obrigada pelas ricas contribuições.

Aos alunos de iniciação científica, Nicolas, Lais e Juliane, por sempre se prontificarem a ajudar como podiam e pelos momentos de descontração. Gostaria de agradecer em especial ao Nicolas, que me ajudou tanto na execução de experimentos, passando suas férias no laboratório, quanto nas risadas, que faziam por um instante a tensão ir embora.

À FURG pela oportunidade, principalmente pelo ensino gratuito e de qualidade. Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	ix
	LISTA DE TABELAS	xii
	LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiii
	RESUMO	xv
	ABSTRACT	Xvi
1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1	Cenoura	4
3.1.1	Histórico	4
3.1.2	Morfologia e Tipos de Cultivares da Cenoura	5
3.1.3	Composição, importância nutricional e terapêutica	8
3.1.4	Produção mundial e nacional	10
3.1.5	Doenças na Cenoura registradas no Brasil	11
3.2	Agrotóxicos	13
3.2.1	Toxicidade e Classificação	14
3.2.2	Uso de Agrotóxicos no Cultivo da Cenoura	15
3.2.3	Agrotóxicos selecionados para o estudo	16
3.2.4	Controle de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos de Origem Vegetal no Brasil e no Rio Grande do Sul	18
3.3	Determinação de agrotóxicos em alimentos	20
3.3.1	Método Multirresíduo QuEChERS	21
3.3.2	Extração em Fase Sólida Dispersiva (d-SPE)	25
3.3.3	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)	28

3.3.4	Avanços dos Métodos para a Determinação de Agrotóxicos em Alimentos de Origem Vegetal	29
3.4	Validação de métodos cromatográficos de análise	35
3.4.1	Seleção do padrão interno	35
3.4.2	Seletividade	35
3.4.3	Efeito Matriz na Cromatografia Gasosa	36
3.4.4	Curva analítica e linearidade	37
3.4.5	Limite de detecção e Limite de quantificação	39
3.4.6	Exatidão (recuperação)	39
3.4.7	Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)	40
3.4.8	Robustez	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	Instrumentação	42
4.2	Materiais, adsorventes, solventes e reagentes utilizados	43
4.3	Processamento da amostra	44
4.4	Uso do padrão interno	45
4.5	Preparo das soluções analíticas	45
4.6	Desenvolvimento das condições do sistema cromatográfico GC-MS e identificação dos compostos	46
4.7	Desenvolvimento do método QuEChERS para análise de agrotóxicos em cenoura	47
4.7.1	Otimização da etapa de limpeza utilizando a d-SPE	47
4.7.1.1	Teste nº 1: limpeza com proporções iguais de PSA e Florisil	48
4.7.1.2	Teste nº 2: limpeza com diferentes proporções de PSA e Florisil	50
4.7.1.3	Teste nº 3: limpeza com diferentes proporções de Carvão Ativado em pó	51
4.8	Procedimento final desenvolvido	52
4.9	Validação do método proposto	53

4.9.1	Seletividade	53
4.9.2	Efeito matriz	53
4.9.3	Curva analítica e linearidade	54
4.9.4	Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)	54
4.9.5	Exatidão (recuperação)	54
4.9.6	Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)	55
4.9.7	Robustez	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	Condições do sistema cromatográfico GC-MS e identificação dos compostos	57
5.2	Avaliação do uso do padrão interno	61
5.3	Desenvolvimento do método QuEChERS para análise de agrotóxicos em cenoura	62
5.3.1	Teste nº 1: limpeza com proporções iguais de PSA e Florisil	64
5.3.2	Teste nº 2: limpeza com diferentes proporções de PSA e Florisil	66
5.3.3	Teste nº 3: limpeza com diferentes proporções de Carvão Ativado em pó	67
5.3.4	Comparação entre os melhores resultados para a etapa de limpeza	69
5.4	Validação do método proposto	70
5.4.1	Seletividade	70
5.4.2	Efeito matriz	71
5.4.3	Curva analítica e linearidade	74
5.4.4	Limites de detecção e de quantificação	75
5.4.5	Exatidão (recuperação)	76
5.4.6	Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)	78
5.4.7	Robustez	81
6	CONCLUSÕES	84

7	PERSPECTIVAS FUTURAS	86
8	REFERÊNCIAS	87
9	ANEXOS	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia completa da cenoura (<i>Daucus Carota</i> L.).	5
Figura 2: Principais Cultivares da Cenoura, sendo (a) Kuroda, (b) Nantes e (c) Brasília.	8
Figura 3: Situação da produção de cenoura em mil toneladas, entre os anos 1980 a 2011 no Brasil (EMBRAPA, 2013).	11
Figura 4: Podridão das Raízes, doença causada pelos fungos <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (a) ou pela bactéria <i>Erwinia carotovora</i> (b).	12
Figura 5: Deformações no cultivo da Cenoura causadas por Nematóides, uma doença conhecida como Nematóides das Galhas.	13
Figura 6: Percentual de amostras com resultados insatisfatórios desde o primeiro ano de monitoramento do PARA, sendo o (%) = (amostras com resultados insatisfatórios/total de amostras analisadas) x 100.	16
Figura 7: Representação das etapas das principais versões do método QuEChERS, sendo (a) original, (b) acetato e (c) citrato (ANASTASSIADES et al., 2003; PRESTES et al., 2009).	23
Figura 8: Estrutura da amina primária secundária (PSA).	27
Figura 9: Ilustração simplificada do efeito matriz no sistema de injeção do GC, sendo que X, Y- número de sítios ativos livres para adsorção no injetor; ● moléculas da substância a analisar na amostra injetada; ○ porção das moléculas de analito adsorvido no injetor; ▲ moléculas de componentes da matriz presente na amostra injetada; △ porção de componentes da matriz adsorvido no injetor. Adaptado de HAJŠLOVÁ e ZROSTLIKOVA (2003).	37
Figura 10: Pré-preparo da amostra com as seguintes etapas concluídas (a) lavagem e raspagem, (b) cenouras já picadas e (c) homogeneizadas	45
Figura 11: Esquema representativo das etapas realizadas no teste nº1 que faz uso de proporções iguais dos adsorventes PSA e Florisil no processo de limpeza.	48
Figura 12: Esquema representativo das etapas realizadas no teste nº2 que faz uso de proporções diferentes dos adsorventes PSA e Florisil no processo de limpeza.	50

- Figura 13: Esquema representativo das etapas realizadas no teste nº3 que faz uso de proporções diferentes de carvão ativado em pó no processo de limpeza 51
- Figura 14: Cromatograma dos íons monitorados no segmento 1, sendo que (a) cromatograma total, (b), (c) e (d) cromatogramas individuais para os íons monitorados 306 (trifluralina), 164 (carbofuran) e 266 (clototalonil), respectivamente. 59
- Figura 15: Cromatograma dos íons monitorados no segmento 2, sendo que (a) cromatograma total, (b), (c), (d) e (e) cromatogramas individuais para os íons monitorados 252 (pendimetalina), 79 (captan), 125 (tebuconazol) e 326 (trifenilfosfato), respectivamente. 59
- Figura 16: Cromatograma dos íons monitorados no segmento 3, sendo que (a) cromatograma total, (b), (c), (d) e (e) cromatogramas individuais para os íons monitorados 132 (praloxistrobina), 265 (difenoconazol), 181 (deltametrina) e 344 (azoxistrobina), respectivamente. 60
- Figura 17: Cromatograma da Azoxistrobina: (a) cromatograma total segmento 3, (b) íon quantificador (344), (c) íon qualificador (388) e (d) íon qualificador (345) 60
- Figura 18: Eficiência do uso de padrão interno trifenilfosfato a partir das recuperações médias obtidas com e sem o seu uso, a linha vermelha representa o limite de 70% e as barras de erro o RSD%, n=3 61
- Figura 19: Valores de RSD% com uso e sem uso de padrão interno para o clean up com 35 mg de florisil e 25 mg de PSA, n=3. 62
- Figura 20: Recuperações obtidas em cada método de extração QuEChERS (original, citrato e acetato), a linha vermelha representa o limite de 70%, n=1 63
- Figura 21: Eficiência do método QuEChERS original, citrato e acetato para a extração de agrotóxicos em cenoura. 64
- Figura 22: Recuperações obtidas para o teste nº 1 que faz uso de proporções iguais dos adsorventes PSA e Florisil, a linha vermelha representa o limite de 70%, n=1. 65
- Figura 23: Recuperações médias obtidas para o teste nº 2 que faz uso de proporções diferentes dos adsorventes PSA e Florisil. A linha vermelha representa o limite de 70% e as barras de erro o RSD%, n=3. 66
- Figura 24: RSD % do teste nº 2 que faz uso de proporções diferentes dos adsorventes PSA e Florisil, n=3. 67

- Figura 25: Recuperações obtidas para o teste nº 3 que faz uso de Carvão Ativado em Pó, a linha vermelha representa o limite de 70%, n=1 68
- Figura 26: Eficiência do Carvão Ativado em Pó frente a remoção da cor, utilizando-se diferentes quantidades de carvão: (a) 5 mg, (b) 5 mg mais 50 µL de Hexano, (c) 2 mg e (d) 10 mg 68
- Figura 27: Comparação do cromatograma obtido para a amostra branco de cenoura, com o extrato do branco da matriz fortificado com solução padrão representado nos quadros, sendo (a) trifluralina, (b) carbofuran, (c) clorotalonil, (d) pendimetalina, (e) captan, (f) tebuconazol, (g) piraclostrobina, (h,i) difenoconazol, (i) deltametrina e (j) azoxistrobina. 70
- Figura 28: Avaliação do Efeito Matriz a partir da análise visual das curvas obtidas no solvente e no extrato da matriz sem o uso de padrão interno trifenilfosfato. 72
- Figura 29: Comparação dos diferentes processamentos das amostras nas diferentes proporções de água testadas: (a) sem o uso de água, (b) 50 mL de água a cada 100 g de cenoura e (c) 80 mL de água a cada 100 g de cenoura 81
- Figura 30: Recuperações médias obtidas para a robustez do método, avaliando as diferentes proporções de água e amostra empregadas, a linha vermelha representa o limite de 70% e as barras de erro o RSD%, n=3 82
- Figura 31: RSD% para o estudo da robustez considerando diferentes proporções de água e cenoura (slurry), n=3 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição Nutricional da Cenoura crua por 100 g de porção comestível	9
Tabela 2: Classificação dos agrotóxicos de acordo com os efeitos a saúde humana.	15
Tabela 3: Limites máximos de resíduos (LMRs) para cada composto utilizado para a produção de cenoura conforme a ANVISA (2015), EU (União Européia, 2013) e US-EPA (2013), bem como a classificação e aplicação dos agrotóxicos selecionados para o estudo.	17
Tabela 4: Métodos para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal	30
Tabela 5: Compostos analisados por GC-MS no modo de ionização EI positivo por aquisição no modo SIR, íons monitorados, tempo de retenção (tr), segmento e janela de tempo.	58
Tabela 6: Comparação entre os melhores resultados para a etapa de limpeza	69
Tabela 7: Efeito matriz percentual dos compostos a partir da solução padrão na concentração de 0,8 mg L ⁻¹ preparada em acetonitrila e no extrato branco da matriz	73
Tabela 8: Equação da reta, coeficiente de determinação e faixa linear para cada agrotóxico em estudo, a partir de curvas construídas no extrato branco da matriz.	74
Tabela 9: Limites de detecção e quantificação do método, que atingiram os critérios de precisão e exatidão	75
Tabela 10: Média dos percentuais de recuperação e RSD% da repetibilidade, obtidos a partir dos ensaios de recuperação nos níveis de fortificação 45, 90, 180 e 450 µg Kg ⁻¹ para cada agrotóxico.	77
Tabela 11: Compostos que apresentaram outlier com a avaliação pelo teste de Grubbs.	79
Tabela 12: Média dos percentuais de recuperação e RSD% da precisão intermediária, obtidos a partir de ensaio de recuperação no nível de fortificação 180 µg Kg ⁻¹ para cada agrotóxico.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AOAC – Associação de Químicos Analíticos Oficiais, do inglês *Association of Official Analytical Chemists*
- BPA – Boas Práticas Agrícolas
- CRC – Coordenação de Resíduos e Contaminantes
- DEA – dietilaminopropil de sílica modificada
- DFIA – Departamento de Fiscalização de Insumos Agrícolas
- DL – Dosagem Letal ou Dose Letal
- DMFS – Dispersão da Matriz em Fase Sólida
- DIPOV – Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Vegetal
- EMBRAPA – Empresa de Pesquisa Agropecuária
- Envi-CARB – Carbono grafitizado
- EU – União Européia, do inglês *European Union*
- FAO – Organização das Nações Unidas para para alimentação e agricultura.
- GCB – Carbono grafitizado, do inglês *graphitized carbon black*
- GC-ECD – Cromatografia Gasosa com detector de Captura de Elétrons, do inglês *Gas Chromatography with Electron Capture Detector*
- GC- MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*
- GC- MS/MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry in Series*
- GPC – Cromatografia de Permeação em Gel, do inglês *Gel Permeation*
- HAc – Ácido acético
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IDA – Ingestão Diária Aceitável
- LMR – Limite Máximo de Resíduos
- LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*
- Log K_{ow} – Coeficiente de Partição Octanol-Água, do inglês *Octanol-Water Partition Coefficient*
- Lod K_{oc} – Coeficiente de adsorção ao carbono orgânico
- LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeCN – Acetonitrila

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

MWCNTs – nanotubos de carbono de paredes múltiplas

ODS – Octadecilsiloxano

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

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

PNCRC/Vegetal – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal

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

PS-DBV – Coluna de poliestireno divinil benzeno altamente reticulado

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

RSD – Desvio padrão relativo

SAP – Santo Antônio da Patrulha

SDA – Secretaria de Defesa Agropecuária

SIR – Monitoramento seletivo de íons

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

SPME – Micro Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Micro-Extraction*

USDA – Agricultural Research Service United States Department of Agriculture

US-EPA – Agência Americana de Proteção Ambiental, do inglês *United States Environmental Protection Agency*

v:v – Volume por volume

v:v:v – Volume por volume por volume

XAD – Agentes dispersantes em resinas amberlite

RESUMO

DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CENOURA EMPREGANDO QuEChERS E GC-MS

Autor: Juliana Luiz da Silva Batista

Orientador: Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves

A cenoura figura entre as cinco hortaliças mais consumidas no Brasil, sendo considerada um vegetal que contribui para aumentar a imunidade do nosso organismo, entretanto, ela é atacada por algumas doenças e o uso de agrotóxicos favorece o aumento da produtividade rural. Em contrapartida, a exposição a pequenas quantidades pode causar efeitos adversos e irreparáveis à saúde humana. A disponibilidade de um método de alto rendimento, rápido, sensível, seguro e pouco dispendioso se faz necessário. Neste estudo, otimizou-se e validou-se um método multirresíduo para determinação de agrotóxicos em cenoura empregando QuEChERS e GC-MS. O procedimento de extração, constituiu na pesagem de 10 g da amostra, adição de 10 mL de acetonitrila, seguida de agitação em vórtex por 1 min. A partição utilizando sais foi realizada com 1 g de NaCl e 4 g de MgSO₄ e agitação em vórtex por 1 min, seguida de centrifugação a 5000 rpm por 5 min. Uma alíquota de 1 mL do extrato foi retirada e transferida para um tubo de 15 mL contendo 150 mg de MgSO₄, 35 mg de florisil e 25 mg de PSA para a etapa de limpeza do extrato com SPE dispersiva, repetindo a agitação por 1 min em vórtex e centrifugação a 5000 rpm por 5 min. Um volume de 700 µL do extrato final foi retirado e transferido para um vial juntamente com 7 µL de padrão interno e, posteriormente analisado por GC-MS. Os parâmetros analíticos avaliados neste trabalho foram seletividade, linearidade da curva analítica, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão, exatidão, robustez e efeito matriz para os 10 compostos estudados. O método demonstrou-se eficiente e robusto, com resultados de recuperação na faixa de 72 a 117% nos níveis de fortificação 45, 90, 180 e 450 µg kg⁻¹ com sete replicatas verdadeiras e com RSD variando de 4,9 a 16,6%. Os valores de LOD e LOQ do instrumento foram de 6,0 e 20,0 µg L⁻¹, respectivamente, e o valor de LOQ do método foi de 45 a 90 µg kg⁻¹. A linearidade da curva analítica foi obtida entre 0,02 a 0,8 mg L⁻¹, com valores de coeficiente de determinação (r^2) maiores que 0,99 para a maioria dos compostos preparados no extrato da matriz, com exceção do clorotalonil e captan, que não foram quantificados de acordo com os parâmetros estabelecidos neste trabalho para análise na cenoura. Desta forma, conclui-se que o método desenvolvido mostrou-se adequado para análise da maioria dos resíduos de agrotóxicos estudados em cenoura, pois os parâmetros avaliados encontram-se dentro dos limites exigidos para validação de métodos cromatográficos aplicados à análise de resíduos.

Palavras chaves: agrotóxicos, cenoura, QuEChERS, GC-MS

ABSTRACT

DETERMINATION MULTICLASS OF RESIDUE OF PESTICIDES IN CARROT USING QuEChERS AND GC-MS

Author: Juliana Luiz da Silva Batista

Advisor: Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves

The carrot is among the five most consumed vegetables in Brazil, and is considered a vegetable that contributes to increase the immunity of our body, however, she is attacked by certain diseases and the use of pesticides helps to increase rural productivity. On the other hand, exposure to small amounts can cause adverse effects and irreparable human health. The availability of a high throughput method, rapid, sensitive, safe and inexpensive is needed. This study was optimized and validated, a method for determining multiresidue carrot pesticides employing QuEChERS and GC-MS. The extraction procedure consisted in weighing 10 g of sample, add 10 ml of acetonitrile, followed by vortexing for 1 min. The partition salts was carried out using 1 g NaCl and 4 g of MgSO₄ and vortexing for 1 min, followed by centrifugation at 5000 rpm for 5 min. A 1 mL aliquot of the extract was removed and transferred to a 15 ml tube containing 150 mg of MgSO₄, 35 mg and 25 mg of florisil PSA for cleaning step to extract dispersive SPE, repeating the stirring for 1 min in vortexing and centrifugation at 5000 rpm for 5 min. A volume of 700 µL of the final extract was removed and transferred to a vial with 7 µL of internal standard and subsequently analyzed by GC-MS. The analytical parameters evaluated in this study were selectivity, linearity of the calibration curve, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision, accuracy, robustness and effect matrix for the 10 compounds studied. The method proved to be efficient and robust, recovering results in the range 72-117% at fortification levels 45, 90, 180 and 450 µg kg⁻¹ replicates with seven true and RSD ranging from 4.9 to 16, 6%. The LOD and LOQ values of the instrument were 6.0 and 20.0 ug L⁻¹, respectively, and the value of the method LOQ was 45-90 µg kg⁻¹. The linearity of the calibration curve was obtained between 0.02 to 0.8 mg L⁻¹ to determine coefficient values (r^2) greater than 0.99 for most of the compounds prepared in the matrix extract with the exception of chlorothalonil and captan, which were not quantified in accordance with the parameters established in this work for analysis in carrots. Thus, it is concluded that the developed method was adequate for analysis of most pesticide residues studied in carrot, for the evaluated parameters are within the limits required for validation of chromatographic methods applied to residue analysis.

Keywords: pesticides, carrots, QuEChERS, GC-MS

1. INTRODUÇÃO

A cenoura (*Daucus carota L.*) é uma hortaliça tuberosa da família das Apiaceae e tradicionalmente conhecida como uma hortaliça de clima ameno. Porém, hoje é cultivada ao longo do ano em praticamente todas as regiões do Brasil, graças ao desenvolvimento de novas cultivares mais adaptadas ao clima tropical. Atualmente, os maiores produtores desta apiácea no país são os estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Bahia (GUIMARÃES, 2012).

O uso de agrotóxicos é essencial para prevenir ou reduzir perdas na agricultura, melhorando assim, a produção, obtendo produtos com qualidade, que satisfaçam os consumidores e garantam seu comércio. A produção de alimento tem crescido em um ritmo acelerado e o uso de agrotóxicos favorece o aumento da produtividade agrícola. Em contrapartida, a exposição a pequenas quantidades de agrotóxicos pode causar efeitos adversos e irreparáveis a saúde humana, principalmente durante o estágio fetal e em crianças, que são as fases de maior vulnerabilidade do desenvolvimento do homem. É importante ressaltar que dentro deste contexto a cenoura é um alimento que pode estar presente desde os primeiros estágios de vida.

Segundo CHOWDHURY *et al.* (2013), o monitoramento de resíduos de agrotóxicos, não só no solo ou em amostras ambientais, mas também em produtos alimentícios, especialmente frutas e vegetais crus que podem ter sido expostos a agrotóxicos, deve ser realizado. Para a avaliação destes resíduos é necessário um método analítico rápido, sensível, seguro e pouco dispendioso para a detecção simultânea de múltiplos resíduos de uma ampla gama de agrotóxicos.

O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) foi iniciado em 2001 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com o objetivo de avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor. A ANVISA coordena o programa em conjunto com as vigilâncias sanitárias dos estados participantes, que realizam os procedimentos de coleta dos alimentos nos supermercados e de envio aos laboratórios para análise. Este programa avalia a qualidade e segurança dos alimentos disponíveis a população, bem como o uso inadequado e não autorizado de agrotóxicos na produção destes produtos. Estas avaliações fornecem subsídios para

a reavaliação dos estudos de resíduos de agrotóxicos apresentados à ANVISA para fins de registro de agrotóxicos e estimula a adoção de Boas Práticas Agrícolas (BPA).

Para tanto, diversas culturas são monitoradas no Brasil, incluindo a cenoura, que se destacou de forma negativa nos últimos monitoramentos do PARA. Em 2010 apresentou um percentual de amostras contaminadas em torno de 49%. Em 2011, o percentual foi ainda maior, chegando a 67%, o que levou essa hortaliça a estar entre as culturas em maior evidência para controle de resíduos de agrotóxicos. Esse foi um dos motivos que levou a escolha da cenoura como matriz, bem como, a escassez de trabalhos publicados para análise de resíduos de agrotóxicos em cenoura, sendo que dos poucos publicados, nenhum fez uso do método proposto neste estudo. Além disso, segundo MARGNI *et al.* (2002) a ingestão de alimentos é uma fonte toxicológica de exposição cerca de 103 a 105 vezes maior do que a induzida pela água potável ou por inalação, o que reforça a escolha da matriz ser de fonte alimentícia, sendo que, o tipo de plantio que a cenoura necessita, ou seja, imerso ao solo, faz com que ela esteja em contato direto com agrotóxicos usados no plantio, como também com os resíduos deixados por outras colheitas.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Desenvolver metodologia para análise de resíduos de 10 agrotóxicos (trifluralina, carbofuran, clorotalonil, pendimetalina, captan, tebuconazol, piraclostrobina, difenoconazol, deltametrina e azoxistrobina), a partir de 7 classes diferentes (estrobilurina, dicarboximida, metilcarbamato de benzofuranila, isoftalonitrila, piretróide, triazol e dinitroanilina), abrangendo 5 tipos de aplicações diferentes (fungicidas, inseticidas, nematicida, formicida e herbicida) em cenoura empregando o QuEChERS como método de extração e posterior determinação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

Objetivos Específicos

- Testar diferentes adsorventes na etapa de limpeza, avaliando qual ou quais adsorventes são mais eficientes tanto na remoção de interferentes quanto na recuperação dos analitos.
- Ensaar diferentes procedimentos de extração QuEChERS (original, citrato, acetato), identificando qual extrai melhor os analitos.
- Validar o método analítico empregando as principais figuras de mérito: seletividade, efeito matriz, curva analítica e linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão (recuperação), precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e robustez.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cenoura

3.1.1 Histórico

A introdução do cultivo da cenoura no Brasil ocorreu no século XVI, com a vinda das expedições portuguesas que trouxeram as sementes de cenoura em meio a outras “plantas de horta”. Acredita-se que as primeiras plantações de cenoura no Brasil tenham sido realizadas no século XIX, no Rio Grande do Sul, na horta de um mosteiro pelos jesuítas espanhóis. Posteriormente, de forma empírica, o cultivo se espalhou em diversos municípios desse estado (VILELA e BORGES, 2008).

No Brasil, até meados de 1980, devido à ocorrência da queima-das folhas, doença causada por um complexo de patógenos que inclui os fungos *Alternaria dauci* e *Cercospora carotae* e a bactéria *Xanthomonas carotae*, o cultivo da cenoura na época chuvosa de verão exigia a aplicação quase diária de fungicidas. Para eficácia contra esses patógenos, eram necessárias cerca de 50 aplicações durante o ciclo de produção da cenoura, por um período estimado de 120 dias (REIFSCHNEIDER *et al.*, 1984).

Conseqüentemente, baixa produtividade e elevados custos de produção gerados por aplicações excessivas de agrotóxicos tornavam baixa a rentabilidade da cultura, o que acarretava em um consumo limitado, pois só as classes de alto poder aquisitivo podiam consumir. Tendo em vista as demandas por agroquímicos na produção da cenoura, associado ao elevado risco a saúde humana que esses produtos podem causar, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) em parceria com a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP), iniciaram em 1976 um programa de melhoramento genético da cultivar. Esse programa permitiu o desenvolvimento de uma cultivar (cv.), a cv. Brasília, mais resistente ao complexo patogênico envolvido na queima-das-folhas e ao calor, além de alta tolerância aos nematóides formadores de galhas e ao pendoamento. Além

disso, a cultivar adaptou-se em todas as regiões brasileiras. Atualmente essa cultivar está presente em 75% da área plantada de cenoura do Brasil.

Essa hortaliça de textura macia e paladar agradável, atualmente além do consumo *in natura*, é utilizada também como matéria prima para indústrias processadoras de alimentos, que a comercializam na forma de minimamente processada (minicenouras, cubos, ralada, em rodela) ou processada na forma de seleta de legumes, alimentos infantis e sopas instantâneas (CEASA, 2013).

3.1.2 Morfologia e Tipos de Cultivares da Cenoura

A cenoura é morfológicamente dividida em caule, colo, ombro, lenticelas e ápice e, sua parte interior inclui córtex e coração, como pode ser visto na Figura 1.

As características de cada parte são:

- Caule: Parte aérea da cenoura. Através dele circulam a seiva.
- Colo: Região de transição entre a raiz e o caule.
- Ombro: Local de maior reserva de nutrientes.
- Lenticelas: Responsável pela fixação da raiz no solo e pela retirada de água e minerais do solo.
- Ápice: Ajuda a raiz a penetrar no solo.
- Córtex: Auxilia na condução de água e minerais dissolvidos através da raiz, desde a epiderme até ao xilema, e armazena várias moléculas translocadas.
- Coração: Parte central da cenoura. Região mais fibrosa da raiz.

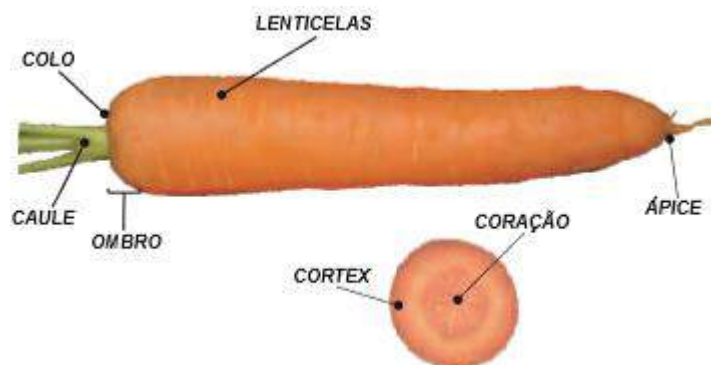


Figura 1: Morfologia completa da cenoura (*Daucus Carota* L.).

Até a década de 1980, as cenouras cultivadas no Brasil eram importadas e melhor adaptadas para climas amenos, mais comuns no período de inverno nas regiões centro-sul. No período de verão, os preços da cenoura subiam significativamente, inviabilizando seu consumo por grande parte da população brasileira. A criação de novas cultivares culminou na produção de cenoura o ano todo e sem dúvida foi uma solução eficaz para o problema.

Para VIEIRA e PESSOA (2008), cada cultivar tem características próprias quanto ao formato das raízes, resistência às doenças e, principalmente, quanto à época de plantio. Esta última característica permite a produção de cenoura durante o ano todo na mesma região, desde que se plante a cultivar apropriada às condições de clima predominantes em cada época.

Segundo VIEIRA e PESSOA (2008), as principais cultivares da cenoura (Figura 2), bem como suas características são:

- Kuroda:
 - As plantas apresentam folhagem vigorosa, com até 50 cm de altura;
 - As raízes são cônicas, de coloração vermelha-alaranjada e apresentam a película bastante delicada;
 - O comprimento das raízes varia entre 15 e 20 cm;
 - As cultivares deste grupo apresentam tolerância a temperaturas mais elevadas e resistem bem às doenças de folhagem quando semeadas no verão de regiões quentes;
 - Elas não são recomendadas para semeaduras sob condições de clima ameno pois suas características não permitem competir em qualidade com as do grupo Nantes;
 - Seu ciclo vegetativo é de aproximadamente 100 dias.

- Nantes:
 - Cultivar de origem francesa;
 - As plantas têm folhagem verde escura e podem atingir até 30 cm de altura;
 - As raízes apresentam formato cilíndrico com 15 a 18 cm de comprimento, 3 a 4 cm de diâmetro e coloração alaranjada escura;
 - Esta cultivar é muito sensível às doenças de folhagem, não sendo recomendável o seu cultivo em estação chuvosa e quente;

- Por sua exigência em temperaturas amenas é recomendada para plantio em época fria;
 - Seu ciclo vegetativo é de 90 a 110 dias.
- Brasília:
 - Resultou de um programa de melhoramento de cenoura para cultivo no verão desenvolvido pelo Centro Nacional de Pesquisas de Hortaliças - EMBRAPA-Hortaliças e Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ;
 - As plantas têm porte médio de 25 a 35 cm, com folhagem vigorosa e coloração verde escura;
 - As raízes são cilíndricas, com coloração alaranjada clara e baixa incidência de ombro verde ou roxo;
 - O comprimento varia de 15 a 22 cm e o diâmetro de 3 a 4 cm;
 - É resistente ao calor, apresentando baixos níveis de florescimento prematuro sob condições de dias longos;
 - Tem alta resistência de campo à queima-das-folhas, produzindo em média 30-35 t/ha nas condições de verão;
 - A colheita pode ser efetuada de 85 a 100 dias após a semeadura;
 - É recomendada para semeaduras de outubro a fevereiro nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil, embora esteja sendo utilizada, com sucesso, em todo o país.

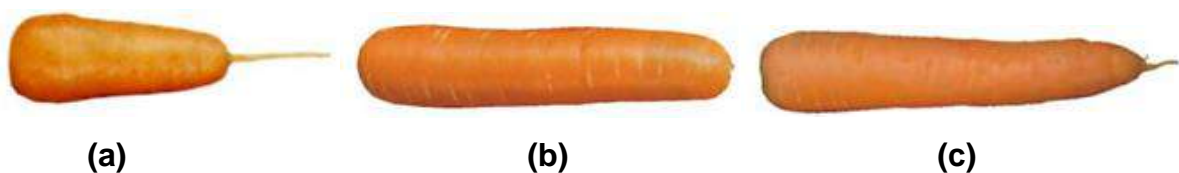


Figura 2: Principais Cultivares da Cenoura, sendo (a) Kuroda, (b) Nantes e (c) Brasília.

3.1.3 Composição, importância nutricional e terapêutica

A cenoura é uma raiz de cor alaranjada e se destaca pelo fato de ser uma das principais fontes naturais de carotenóides, como o β -caroteno, o qual representa 45-70% dos carotenóides totais da cenoura. O β -caroteno é responsável por uma grande variedade de efeitos benéficos para a saúde humana, bem como, pela coloração característica desse vegetal.

Sua importância nutricional reside em ser precursora da vitamina A, pois dentro do organismo cada molécula de β -caroteno é convertida em duas moléculas dessa vitamina (DE ARAÚJO, 2010). O β -caroteno é um carotenóide e ambos possuem esta denominação por representarem a maior parte dos pigmentos em cenouras (*Daucus carota L.*) (DA SILVEIRA, 2014).

O β -caroteno atua na conservação e manutenção das membranas mucosas, na pele e ossos, e em conjunto com a vitamina C, ambos presentes na cenoura, contribuem para reduzir o risco de catarata. Diversos estudos científicos demonstram que a probabilidade de ataques cardíacos se reduz pela ingestão deste nutriente. Este é um antioxidante lipossolúvel que neutraliza os radicais livres, combinando-se diretamente com eles, o que aumenta a eficácia do sistema imune (FARIÑA *et al.*, 2007).

A vitamina A é muito importante para a visão, pois ajuda no desempenho dos receptores da retina, também previne a xeroftalmia, comumente chamada de cegueira noturna e no crescimento saudável das crianças (GALLAGHER, 2005).

A cenoura é muito rica em outras vitaminas como B1 e B2, que ajudam a regular o sistema nervoso e a função do aparelho digestivo. Ela é rica também em sais minerais (GALLAGHER, 2005). As fibras, importantes para o funcionamento do intestino e a pectina capaz de baixar a taxa de colesterol do organismo são abundantes na cenoura e constituem mais uma razão para o seu uso na alimentação diária (DE MATTOSA, 2000).

Além disso, CHRISTENSEN e BRANDT (2006) em seus estudos apontaram as cenouras como um vegetal importantíssimo na proteção contra o desenvolvimento do cancro (proliferação anormal de células), isto por conter um grupo de poliacetilenos bioativos, dos quais falcarinol é claramente o mais bioativo destes. Assim, a cenoura apresenta importante papel na alimentação humana.

Em resumo, a cenoura é um vegetal que pode contribuir significativamente para aumentar a imunidade do nosso organismo, pois seu consumo pode auxiliar no combate as infecções, diminuir o risco de derrames e a fibra solúvel encontrada nela pode diminuir também o colesterol no sangue (CEASA, 2013).

No ser humano, apenas cem gramas de cenoura são suficientes para suprir as necessidades diárias de vitamina A (CEASA, 2013). Na Tabela 1 encontra-se a composição nutricional para cada 100 gramas de cenoura crua (USP, 2015).

Tabela 1: Composição Nutricional da Cenoura crua por 100 g de porção comestível

Nutriente	Unidade	Valor por 100 g
Umidade	g	91,89
Energia	Kcal	19,00
Proteína	g	1,01
Lipídios	g	0,20
Carboidratos totais (por diferença)	g	6,09
Carboidratos “disponíveis” (por diferença)	g	3,28
Fibra alimentar total	g	2,80
Açúcares	g	2,81
Cinzas	g	0,81
Vitamina A	mcg	800

3.1.4 Produção mundial e nacional

A produção mundial em 2010 foi de 33,6 milhões de toneladas, cultivadas em uma área de 1,16 milhões de hectares, o que proporcionou produtividade média de 28,9 t ha⁻¹. Já em 2011, a produção mundial alcançou 35,6 milhões de toneladas, cultivadas em uma área de 1,18 milhões de hectares, o que proporcionou produtividade média de 30,2 t ha⁻¹, segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO).

A cenoura possui grande importância socioeconômica para o agronegócio brasileiro, figurando entre as cinco hortaliças mais consumidas no Brasil (GUIMARÃES, 2012), principalmente por apresentar elevada capacidade de geração de emprego e renda em todos os segmentos de sua cadeia produtiva durante o ano

inteiro (VILELA e BORGES, 2008). Com uma retrospectiva da produção de cenoura, foi possível constatar que ocorreu um aumento expressivo entre os anos de 1980 a 2011, como pode ser visto na Figura 3, segundo dados da EMBRAPA (2013). Na safra de 1980, foram colhidas 150,0 mil toneladas de cenoura em uma área de 10,6 mil ha, com produtividade média de $14,0 \text{ t ha}^{-1}$. Já na safra de 2006, a produção de cenoura foi estimada em 750 mil toneladas em uma área de 25,8 mil hectares, com produtividade de 29 mil t ha^{-1} e disponibilidade de $4,016 \text{ kg habitante}^{-1}$. A partir de 2004, a crise na agricultura brasileira, gerada pela política econômica vigente no país, afetou também a cultura da cenoura (VILELA e BORGES, 2008), como pode ser visto na Figura 3, pelo decréscimo na produção nos anos seguintes, em 2005 e 2006.

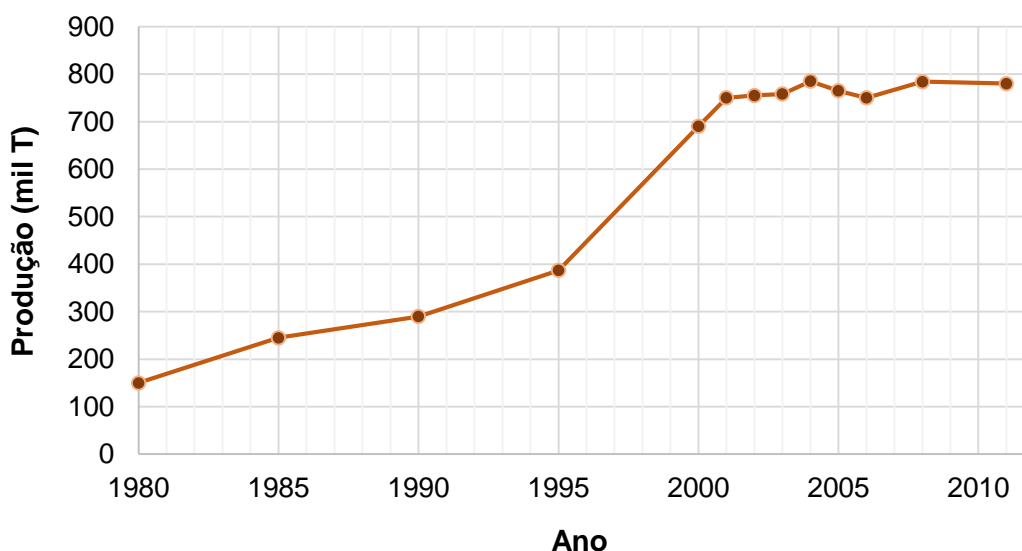


Figura 3: Situação da produção de cenoura em mil toneladas, entre os anos 1980 a 2011 no Brasil (EMBRAPA, 2013).

Em São Paulo ela é a quarta hortaliça mais consumida, com mais de 82 mil toneladas vendidas anualmente. Em valor, sobe para o terceiro lugar, com faturamento anual superior a R\$ 24 milhões. São Paulo fornece mais de 300 mil toneladas, produzidas por 3,5 mil pessoas que trabalham em mais de 2 mil propriedades, ocupando uma área de pouco mais de 10,5 mil hectares (CEASA, 2013).

3.1.5 Doenças na Cenoura registradas no Brasil

Estão registradas no Brasil mais de quinze doenças na cenoura, causadas por fungos, vírus, bactérias e nematóides. Destas, um número relativamente pequeno é responsável pela maior parte dos danos ocorridos na cultura. O controle destas enfermidades tem sido feito através do uso de cultivares resistentes e/ou fungicidas (LOPES, REIFSCHNEIDER e CHARCHAR, 2008).

Entre as doenças mais comuns na cenoura, pode-se citar: queima-das-folhas, podridão das raízes e a que ocorre por nematóides. Abaixo segue a definição de cada doença, bem como, alguns agrotóxicos autorizados para serem utilizados na cultura da cenoura.

- Queima das Folhas: é causada por alternária (*Alternaria dauci*) e por cercóspora (*Cercospora carotae*) e estão entre as mais importantes doenças fúngicas em nosso meio. Ambas as doenças são de distribuição mundial e caracterizam-se por serem altamente destrutivas. Afetam principalmente a parte aérea da planta, com notável reflexo negativo sobre a produção e a qualidade das raízes. Embora um programa baseado em medidas culturais possa minimizar o potencial destrutivo das queimas por alternária e cercóspora, o uso de fungicidas é necessário; para isso se faz uso de fungicidas específicos e inespecíficos (TÖFOLI e DOMINGUES, 2006).
 - Inespecíficos: antes da plantação, de maneira preventiva (durante a fase vegetativa). O fungicida autorizado para esse fim (ANVISA, 2013) pertence ao grupo da Ftalonitrila – Clorotalonil.
 - Específicos e de contato: assim que ocorram condições favoráveis para agir, ou seja, assim que forem evidenciados os primeiros sintomas da doença no campo. Pode-se citar o uso das Estrobilurinas – Azoxistrobina e Piraclostrobinas; e os Triazóis – Tebuconazol e Difenconazol, que são autorizados para a cultura da cenoura segundo ANVISA (2013).
- Podridão das raízes: Em geral é causada pelos fungos *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* (Figura 4 a) ou pela bactéria *Erwinia carotovora* (Figura 4 b). As plantas atacadas apresentam crescimento reduzido com as folhas superiores amareladas, as quais tornam-se

murchas no horário mais quente do dia (LOPES, REIFSCHNEIDER e CHARCHAR, 2008). O único fungicida registrado para a cultura é a Casugamicina (ANVISA, 2013).



Figura 4: Podridão das Raízes, doença causada pelos fungos *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* (a) ou pela bactéria *Erwinia carotovora* (b).

- Nematóides: As espécies dos nematóides das galhas *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla* são os mais importantes nos cultivos de cenoura no Brasil. As plantas infectadas mostram crescimento reduzido e amarelecimento nas folhas. As raízes tornam-se de tamanhos reduzidos com deformações devido a intensa formação de galhas como mostra a Figura 5 (LOPES, REIFSCHNEIDER e CHARCHAR, 2008). Um dos fungicidas autorizados para o uso na cultura da cenoura é o Carbofuran (ANVISA, 2013).



Figura 5: Deformações no cultivo da Cenoura causadas por Nematóides, uma doença conhecida como Nematóides das Galhas.

3.2 Agrotóxicos

Agrotóxicos, defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, remédios de planta, veneno. Essas são algumas das inúmeras denominações relacionadas a um grupo de substâncias químicas utilizadas no controle de pragas (animais e vegetais) e doenças de plantas (PERES e MOREIRA, 2003).

Na literatura internacional, o grupo de substâncias/produtos químicos aqui definidos como agrotóxico recebe a denominação de pesticida (do inglês *pesticide*). O termo “agroquímico”, o mais próximo de agrotóxico encontrado em literatura internacional (do inglês *agrochemicals*) e, em menor escala, também em trabalhos publicados no Brasil, engloba um número maior de produtos, como os fertilizantes e adubos inorgânicos, esse termo, portanto, não representa o real sentido do termo agrotóxico, que indica não apenas a sua finalidade de uso, mas também o caráter prejudicial destas substâncias, visualizado no radical “tóxico” (PERES e MOREIRA, 2003).

Assim como no Brasil, as classes de agrotóxicos mais utilizados em todo o mundo são as dos inseticidas, herbicidas e fungicidas. Em conjunto, essas três categorias representam a grande quantidade de agrotóxicos que se estima em torno de bilhões de quilogramas, usados anualmente na agricultura. Como relatado anteriormente, as capacidades atuais, principalmente relacionadas aos países

desenvolvidos, de produzir e colher grandes quantidades de alimentos em áreas relativamente pequenas, com a participação reduzida de trabalho humano, têm sido possíveis especialmente com o uso de agrotóxicos (JARDIM, 2009).

3.2.1 Toxicidade e Classificação

Os agrotóxicos englobam uma vasta gama de substâncias químicas – além de algumas de origem biológica – que podem ser classificadas de acordo com o tipo de praga que controlam, com a estrutura química das substâncias ativas e com os efeitos à saúde humana e ao meio ambiente (PERES e MOREIRA, 2003). O uso extensivo e indiscriminado de agrotóxicos é uma grande preocupação por causa do dano potencial que estes compostos podem causar ao meio ambiente e por causa dos efeitos tóxicos conhecidos ou suspeitos em humanos. Alguns desses efeitos tóxicos incluem toxicidade aguda, neurológica, disfunção do neurodesenvolvimento, distúrbios no sistema imunológico, perturbações nos sistemas reprodutivo e endócrino, câncer, doenças renais crônicas e várias outras doenças (HERCEGOVÁ *et al.*, 2007; CHOWDHURY *et al.*, 2013).

A classificação dos agrotóxicos em função dos efeitos à saúde, decorrentes da exposição humana a esses agentes, pode resultar em diferentes classes toxicológicas, sumarizadas na Tabela 2. Essa classificação obedece ao resultado de testes ou estudos realizados em laboratórios, que tentam estabelecer a dosagem letal (DL) do agrotóxico em 50% dos animais utilizados naquela concentração, segundo dados da ANVISA (2013).

Tabela 2: Classificação dos agrotóxicos de acordo com os efeitos a saúde humana.

Classe Toxicológica	Toxicidade	DL₅₀	Cor no rótulo
I	Extremamente tóxico	≤ 5 mg/kg	Vermelho
II	Altamente tóxico	entre 5 e 50 mg/kg	Amarelo
III	Mediamente tóxico	entre 50 e 500 mg/kg	Azul
IV	Pouco tóxico	entre 500 e 5.000 mg/kg	Verde

Em alimentos, a maior concentração em que um agrotóxico pode estar presente sem causar prejuízo à saúde humana é denominada limite máximo de resíduos (LMR) (PAYÁ *et al.*, 2007). No Brasil esse limite (LMR) é definido pela ANVISA.

3.2.2 Uso de Agrotóxicos no Cultivo da Cenoura

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013), é permitida aos produtores de cenoura a aplicação de 25 princípios ativos para controle de pragas e doenças, o que gera um número considerável de formulações disponíveis no mercado. Além dos princípios ativos autorizados, o PARA tem identificado continuamente nos seus monitoramentos o uso de agrotóxicos não permitidos para a cultura, acarretando em um aumento da contaminação dos alimentos. É importante ressaltar, que a maioria dessas substâncias não se degrada completamente na natureza, surgindo aí um enorme interesse em pesquisa e monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos, a fim de promover a qualidade dos alimentos que chegam até o consumidor, evitando assim possíveis riscos à saúde dos mesmos devido a ingestão indireta de agrotóxicos.

Os relatórios anuais do PARA disponibilizados pela ANVISA, apresentam os resultados para a cultura da cenoura (Figura 6), desde a fase inicial do programa em 2001 até o último publicado em 2012 e mostram o percentual de amostras com resultados insatisfatórios. Esses resultados são referentes a amostras que apresentaram níveis de resíduos de agrotóxicos acima dos limites máximos estabelecidos pela legislação ou amostras que apresentaram resíduos de agrotóxicos não autorizados para a cenoura.

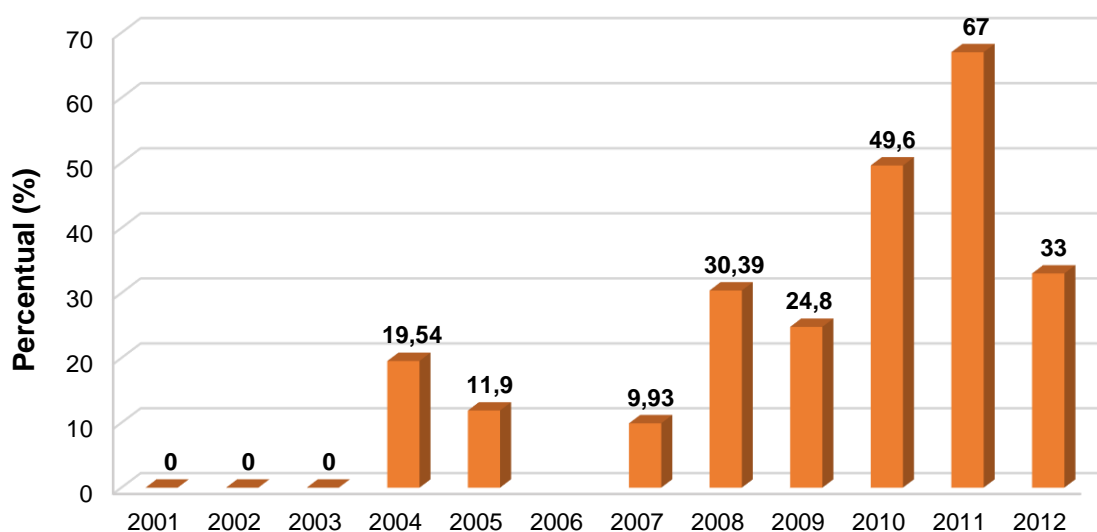


Figura 6: Percentual de amostras com resultados insatisfatórios desde o primeiro ano de monitoramento do PARA, sendo o (%) = (amostras com resultados insatisfatórios/total de amostras analisadas) x 100.

O número de locais em que são recolhidas as amostras analisadas por cultura varia de ano para ano, totalizando 102, 165, 141, 152 e 229 entre 2008 a 2012 respectivamente, sendo recorde o número de amostras de cenoura analisadas em todo território brasileiro no último ano de amostragem.

3.2.3 Agrotóxicos selecionados para o estudo

Os agrotóxicos utilizados na cultura da cenoura avaliados neste trabalho, foram selecionados com base no Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA, 2010 e 2011) e na ANVISA (2013), nos quais são extensivamente utilizados, estando entre esses, agrotóxicos não autorizados para a cultura, como captan, pendimetalina e deltametrina.

Os compostos selecionados para este estudo estão listados na Tabela 3, na qual apresenta a classificação e aplicação dos agrotóxicos, juntamente com os limites máximos de resíduos (LMR) permitidos para cada composto, segundo cada agência

regulamentadora consultada: ANVISA (2013), EU (União Européia, 2013) e US-EPA (2013).

Tabela 3: Limites máximos de resíduos (LMRs) para cada composto utilizado para a produção de cenoura conforme a ANVISA (2015), EU (União Européia, 2013) e US-EPA (2013), bem como a classificação e aplicação dos agrotóxicos selecionados para o estudo.

Composto	Classe ou Tipo	Grupo Químico	Classe Toxicológica	Aplicação	LMR (mg Kg ⁻¹)		
					ANVISA	US-EPA	EU
Azoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	III	Folhas	0,2	0,5	1,0
Captan	Fungicida	Dicarboximida	IV	—	NA	0,05	0,1
Carbofuran	Inseticida e Nematicida	Metilcarbamato de benzofuranila	I	Solo	0,5	NA	NA
Clorotalonil	Fungicida	Isoftalonitrila	III	Folhas	0,2	1,0	1,0
Deltametrina	Inseticida e Formicida	Piretróide	III	—	NA	0,2	0,1
Difenoconazol	Fungicida	Triazol	I	Folhas	0,2	0,5	0,4
Piraclostrobina	Fungicida	Estrobilurina	II	Folhas	0,2	0,4	0,5
Pendimetalina	Herbicida	Dinitroanilina	III	—	NA	0,5	0,2
Tebuconazol	Fungicida	Triazol	IV	Folhas	0,6	NA	0,5
Trifluralina	Herbicida	Dinitroanilina	III	Pré-Emergência	0,05	1,0	0,01

(NA) Não autorizado

(—) Não apresentou registro

É importante salientar, que a legislação brasileira é mais restritiva em relação aos seus LMR's quando comparados aos limites estabelecidos pelas agências regulamentadoras internacionais da Europa (EU) e dos Estados Unidos (US-EPA).

3.2.4 Controle de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos de Origem Vegetal no Brasil e no Rio Grande do Sul

Existem dois Programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal de cunho Federal, sendo um monitorado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o outro pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Dentro do MAPA, a Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) abriga em sua estrutura a Coordenação de Resíduos e Contaminantes (CRC), que é responsável por organizar as ações de garantia de qualidade e de segurança química dos produtos de origem vegetal, por meio de procedimentos de amostragem e análise laboratorial, com a colaboração de outros setores da SDA, como o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Vegetal (DIPOV), o Departamento de Fiscalização de Insumos Agrícolas (DFIA) e a Coordenação Geral de Apoio Laboratorial (CGAL).

As diretrizes, programas, planos de trabalho e ações correspondentes constam do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal (PNCRC/Vegetal), instituído pela Instrução Normativa SDA N.º 42, de 31 de dezembro de 2008. Este Plano é uma união de todos os Programas Nacionais de Controle de Resíduos e Contaminantes, sendo que cada Programa corresponde a uma cultura (MAPA, 2013).

O PNCRC/Vegetal tem como função inspecionar e fiscalizar a qualidade dos produtos de origem vegetal produzidos em todo o território nacional, em relação à ocorrência de resíduos de agrotóxicos e contaminantes químicos e biológicos. São monitorados produtos de origem vegetal destinados ao mercado interno e à exportação. Atualmente, aproximadamente 80% das análises são voltadas para o mercado interno, sendo que a partir deste ano-safra também estão previstas as coletas de produtos importados em recintos alfandegados (MAPA, 2013).

Assim, constituem-se como compromissos do PNCRC/Vegetal a investigação de todas as não conformidades identificadas e a ampliação contínua da relação de culturas monitoradas, do número de amostras coletadas e do número das substâncias analisadas, visando melhorar a representatividade do monitoramento na produção nacional (MAPA, 2013). É importante ressaltar que a cultura da cenoura não faz parte

do escopo do programa do MAPA, portanto a cenoura é mais um dos hortigranjeiros não monitorados.

Já o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) monitorado pela ANVISA, foi criado em 2001 como um projeto com o objetivo de estruturar um serviço para avaliar e promover a qualidade dos alimentos em relação ao uso de agrotóxicos e afins. Em 2003, o projeto transformou-se em Programa, através da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 119/03, e passou a ser desenvolvido anualmente no âmbito do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS).

O PARA tem por objetivo verificar se os alimentos comercializados no varejo apresentam níveis de resíduos de agrotóxicos dentro dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos pela ANVISA e publicados em monografia específica para cada agrotóxico. Permite, também, conferir se os agrotóxicos utilizados estão devidamente registrados no país e se foram aplicados somente nas culturas para as quais estão autorizados (PARA, 2013).

Os relatórios anuais do Programa têm constituído um dos principais indicadores da qualidade dos alimentos adquiridos no mercado varejista e consumidos pela população. O número de alimentos monitorados pelo programa só tende a crescer. Por exemplo, em 2010 foram monitorados 18 alimentos diferentes, já em 2013 esse número subiu para 24. A escolha das culturas a serem monitoradas conta com os dados de consumo obtidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), como também a disponibilidade destes alimentos nos supermercados das diferentes unidades da Federação e no uso intensivo de agrotóxicos nestas culturas (PARA, 2013).

O monitoramento de cunho Estadual existiu no período de 1999 a 2008. A Secretaria Estadual e Agricultura do Rio Grande do Sul como Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS) e outros órgãos de Porto Alegre, desenvolveu o Programa de Monitoramento de Hortigranjeiros do RS. O programa trabalhou na avaliação e fiscalização da qualidade higiênico-sanitária dos produtos *in natura* comercializados na Ceasa/RS, sobretudo da região metropolitana. A iniciativa possibilitou a análise de alimentos quanto à contaminação microbiológica e por resíduos de agrotóxicos (LAWISCH, 2010).

Em maio desse ano, 2015, técnicos da Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul deram início ao Programa de Monitoramento de Qualidade de Produtos

Hortigranjeiros. Realizaram a primeira coleta nas Centrais de Abastecimento do Estado (Ceasa/RS), onde são comercializados 35% dos hortigranjeiros consumidos no RS, provenientes de todo o Estado. Os hortigranjeiros estão sujeitos à contaminação por agentes físicos, químicos e biológicos, desde sua origem até o consumidor final. Esses alimentos estão entre os produtos agrícolas que sofrem os mais diferentes e intensos tratamentos com agrotóxicos e contaminação por organismos parasitas, microorganismos através da água de irrigação, pelo uso de fertilizantes orgânicos dispostos de forma incorreta ou pela própria água de lavagem (Governo do Estado do Rio Grande do Sul, 2015).

A iniciativa de implantar e cumprir o programa é do Ministério Público do Estado, que assinou um Termo de Compromisso de Ajustamento de Conduta, em outubro do ano passado, com a Ceasa/RS, Vigilâncias Sanitárias do Estado e do Município, Lacen e o Conselho Regional de Engenharia e Agronomia do RS- Crea/RS. Através do programa, será monitorada a presença de resíduos de agrotóxicos de uso não autorizado no Brasil e os autorizados, mas acima dos limites máximos estabelecidos ou cujo uso não é recomendado para a cultura (Governo do Estado do Rio Grande do Sul, 2015).

3.3 Determinação de agrotóxicos em alimentos

A determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos, envolve a preparação da amostra como parte vital do processo de análise desses contaminantes, sendo que, a extração dos analitos a partir de uma amostra e a limpeza subsequente do extrato, são de suma importância para isolar os resíduos de interesse e remover quaisquer interferentes provenientes da matriz que podem afetar o sistema de detecção (KINSELLA, 2009). Em resumo, todos estes procedimentos consistem em transferir os analitos da matriz para outra fase, empregando concomitantemente uma etapa de limpeza para remoção de interferentes (CABRERA *et al.*, 2012).

3.3.1 Método Multirresíduo QuEChERS

A determinação de múltiplos resíduos de pesticidas e/ou outros grupos de contaminantes polares e/ou termicamente instáveis com uma ampla gama de propriedades físico-químicas dentro de um único ensaio analítico, pode ser complicado para a obtenção de baixos limites de quantificação (LOQ), boa precisão, bem como a veracidade dos resultados relevantes para todos os analitos (HAJŠLOVÁ e ZROSTLIKOVA, 2003).

O método de preparação de amostra QuEChERS foi introduzido pela primeira vez por ANASTASSIADES *et al.* (2003), com o intuito de superar limitações práticas de extração multirresíduos já existentes. Este método tem muitas vantagens, tais como uma elevada recuperação em uma ampla gama de polaridade e de volatilidade de agrotóxicos; a utilização de menores quantidades de solvente orgânico e o uso de solventes não clorados.

O método QuEChERS foi projetado para amostras que possuem em sua composição mais de 75% de água (DIÉZ *et al.*, 2006) e pode ser caracterizado como uma sequência das seguintes etapas: Extração (a cada 10 g de amostra e adiciona-se 10 ml de acetonitrila com agitação intensa manual ou com auxílio de vórtex); Partição (adição de NaCl, MgSO₄ e sais tamponantes para separação das fases e ajuste do pH, além da remoção de água, também se faz uso de agitação intensa seguida de centrifugação); e limpeza do extrato (realizada geralmente por extração em fase sólida dispersiva, d-SPE, na qual uma alíquota da fase orgânica superior é retirada e misturada com MgSO₄ e um adsorvente (25 mg de PSA) para remover a água e co-extractivos indesejados) (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe, 2011).

A versão original deste método (Figura 7a) apresentou excelentes resultados para diferentes tipos de amostras. Porém, algumas aplicações mostraram que certos compostos apresentavam problemas de estabilidade e/ou recuperação de acordo com o pH da matriz. Desta forma, durante o período de otimização do método, percebeu-se que a utilização de tampões de pH (faixa de 4,8 a 5,0) promovia recuperações satisfatórias (>70%) para compostos dependentes do pH, independente da matriz utilizada (CABRERA *et al.*, 2012).

O método original foi modificado nos anos seguintes a sua publicação (2003) para ampliar o escopo de pesticidas e alimentos analisados pelo método. LEHOTAY

et al. (2005) desenvolveram o método “QuEChERS acetato” (Figura 7b), introduzindo o uso de tamponamento para melhorar as recuperações de analitos problemáticos e dependentes do pH (por exemplo, folpete, diclofluanida, clorotalonil e pimetrozina), no qual o efeito tamponante (pH 4,8) é promovido pela adição de acetato de sódio. Este método foi adotado em 2007 como método oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC). Segundo TUZIMSKI e REJCZAK (2015) a adição de ácido acético (HAc) juntamente com o solvente de extração pode ajudar a melhorar a recuperação de analitos problemáticos, mas também inibe a capacidade do adsorvente PSA de reter interferentes da matriz.

ANASTASSIADES *et al.* (2007) propuseram o método “QuEChERS citrato” (Figura 7c), o qual utiliza uma mistura de citrato de sódio diidratado e hidrogenocitrato sesquihidratado, responsáveis pelo efeito tamponante (pH 5,0-5,5). Esse método resultou na norma Européia EN 15662 publicado em 2008, levando o *Comité Européen de Normalisation* (CEN) a oficializar o método “QuEChERS citrato” como referência na União Européia.

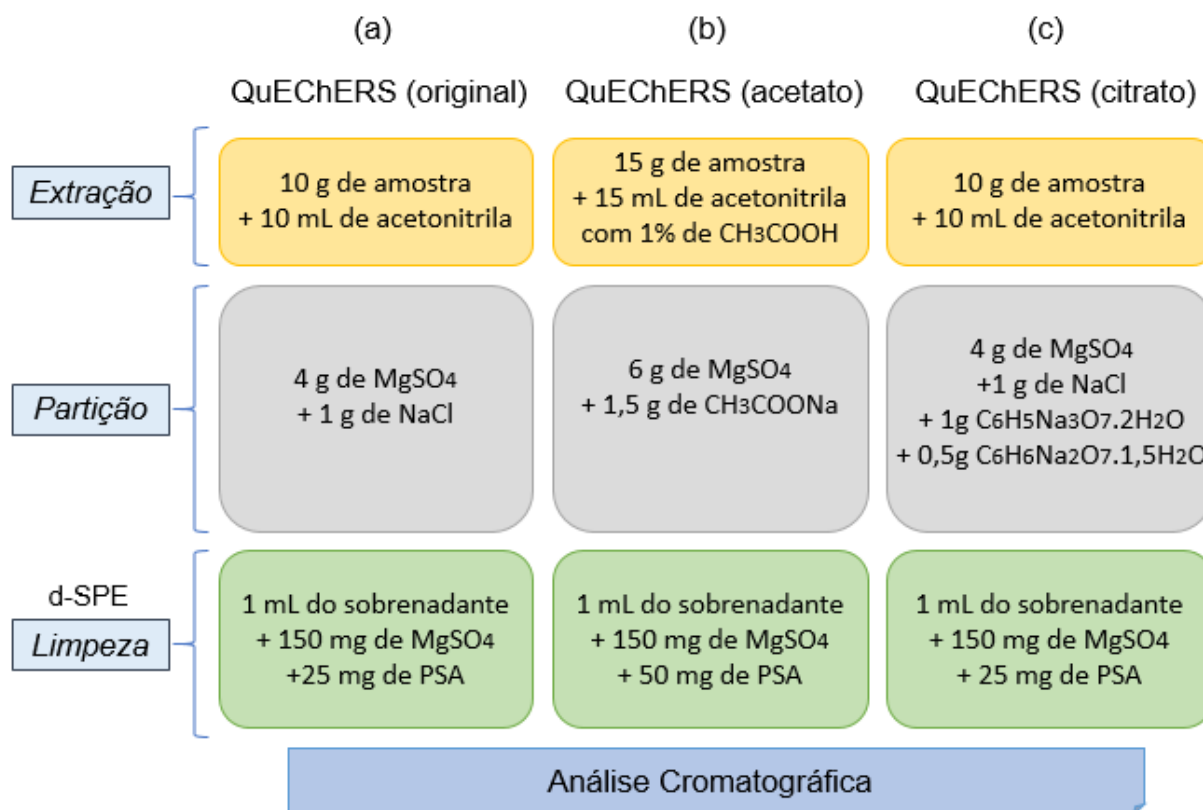


Figura 7: Representação das etapas das principais versões do método QuEChERS, sendo (a) original, (b) acetato e (c) citrato (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009).

LESUEUR *et al.* (2008) utilizaram o método QuEChERS citrato para a análise de 105 pesticidas em uva, limão, cebola e tomate, por GC/SQ-MS. A recuperação para 82% dos compostos variou em torno de 70-110%. O LOD e LOQ variaram de 0,4 - 48,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e de 1,2 - 161 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Limão e cebola mostraram recuperações baixas, mas são conhecidos por serem matrizes difíceis (acidez e alto teor de enxofre, respectivamente). O método foi reprodutível com o RSD inferior a 20% a 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e inferior a 15% a 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

GONZÁLEZ-CURBELO *et al.* (2011) obtiveram recuperação satisfatória (89-104%), valores de desvio padrão relativos menores que 9,1% e limites de detecção entre 0,002 e 0,064 mg kg^{-1} . O método utilizado foi o QuEChERS citrato que contou com a combinação de PSA e carbono grafitizado na etapa de limpeza. Esse método foi aplicado na determinação de oito pesticidas em 12 amostras de diferentes cultivares de bananeira das Ilhas Canárias, cujas folhas estão sendo usadas para

alimentar gados ou porcos. Resíduos de clorpirifós foram encontrados em dez dessas amostras. A confirmação da presença ou ausência de pesticidas foi realizada utilizando GC-MS/MS, enquanto a determinação foi feita por detecção de GC-NPD.

ZHENG *et al.* (2013) analisaram 10 resíduos de pesticidas em pepino, couve, repolho e tomate, utilizando GC-MS. Nanopartículas magnéticas (MNPs), GCB e PSA foram usados como adsorventes no método QuEChERS. Os limites de detecção do método proposto para os 10 pesticidas variaram de 0,39-8,6 ng g⁻¹. Boa linearidade (R valor ≥ 0.990) foi obtida em níveis de concentração de 10-200 ng g⁻¹, e o método aceitável e reprodutível foi encontrado com precisões intra e inter-dia, obtendo-se os desvios padrão relativos menores que 10,7% e 13,4%, respectivamente. As recuperações obtidas foram de 69,9-125,0% em diferentes concentrações, para amostras provenientes de produção convencional.

NGUYEN *et al.* (2008) aplicaram o método QuEChERS original com sucesso na análise de rotina de 107 pesticidas em repolho e rabanete comercial. A extração contou com 10 mL de acetonitrila acidificada com 0,5 % ácido acético, as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa no modo de monitoramento de íon seletivo (GC-MS-SIM), usando um íon quantificador e dois íons qualificadores. As recuperações para todos os pesticidas estudados foi de 80 a 115% com um desvio padrão relativo inferior a 15% no intervalo de concentração de 0,030-0,360 mg kg⁻¹.

ZHAO *et al.* (2012) com base na preparação de amostras QuEChERS modificado, fizeram uso de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) na d-SPE, a determinação por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa com monitoramento de íons selecionados (GC/MS-SIM) foi validado em 30 resíduos de pesticidas em vegetais e frutas. Verificou-se que a quantidade de MWCNTs influenciou o desempenho de limpeza e as recuperações. A quantidade ótima de MWCNTs foi de 10 mg, sendo adequado para a limpeza de todas as matrizes selecionadas, como um adsorvente alternativo e adequado em substituição a amina primária secundária (PSA). Essa avaliação foi feita primeiramente de forma qualitativa, pelas características visuais dos extratos obtidos, e posteriormente de forma quantitativa, através da avaliação dos cromatogramas. Esse método foi validado em repolho, espinafre, uva e laranja. A precisão foi avaliada através de experimentos de recuperação e de reprodutibilidade que foram realizadas para cada matriz em 5 repetições cada e em dois níveis de fortificação (0,02 e 0,20 mg kg⁻¹). As recuperações

dos 30 pesticidas ficaram na faixa de 71-110%, com desvio padrão relativo (RSD, $n = 5$) menor que 15%. Os efeitos da matriz foram observados através da comparação da inclinação da curva de calibração obtida na matriz com a do solvente. Boa linearidade foi obtida aos níveis de concentração de 0,02-0,5 mg L⁻¹. Os limites de quantificação (LOQ) e os limites de detecção (LOD) variaram entre 0,003-0,05 mg kg⁻¹ e 0,001 0,02 mg kg⁻¹ respectivamente, considerando a relação sinal-ruído (S/N) de 10 para o LOQ e de 3 para o LOD. O método foi aplicado com sucesso para análise de amostras reais.

COSTA *et al.* (2014) utilizaram QuEChERS original, citrato e acetato a fim de avaliar a eficácia da extração e o efeito da matriz de pesticidas a partir de amostras de pêssegos enlatados. As determinações foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). O método proposto foi validado, os limites de quantificação variaram entre 1 e 10 mg kg⁻¹ e todas as curvas analíticas demonstraram valores de r superiores a 0,99. Valores de recuperação variaram de 69% a 125% com RSD inferior a 20%. O efeito de matriz foi avaliado e mostrou enriquecimento de sinal para a maioria dos compostos. A robustez foi demonstrada usando pêssegos frescos, que forneceram valores de recuperação dentro dos limites aceitáveis. Verificou-se a aplicabilidade do método e resíduos de tebuconazol e dimetoato foram encontrados nas amostras. As avaliações iniciais foram realizadas com pêssego enlatado drenado, em seguida, o método foi aplicado a amostras de pêssego enlatado e pêssegos frescos para mostrar sua relevância.

3.3.2 Extração em Fase Sólida Dispersiva (d-SPE)

A d-SPE foi desenvolvida simultaneamente com o método QuEChERS por Anastassiades *et al.* (2003), tendo como objetivo a obtenção de um extrato final com menor quantidade de interferentes, aliada a um menor custo quando comparada com técnicas tradicionais. Além disso, é um processo extremamente rápido, simples e que oferece alta recuperação e reprodutibilidade (TUZIMSKI e REJCZAK, 2015).

A d-SPE está baseada em um procedimento muito simples para ser empregado na limpeza de extratos destinados à análise cromatográfica de resíduos e contaminantes em alimentos. Na proposta original, agita-se o extrato (1 mL) com

pequena quantidade de sorvente (25 mg). A agitação tem como objetivo a distribuição uniforme do sorvente e assim facilitar o processo de limpeza. O sorvente então é separado por centrifugação, sendo uma alíquota do extrato final retirada para análise. Desta maneira, o sorvente atua como um filtro químico, retendo os coextrativos da matriz (CABRERA *et al.*, 2012).

Quando comparada com a SPE tradicional, a d-SPE apresenta algumas vantagens como: o uso de uma menor quantidade de sorvente e solventes, refletindo em menor custo, além de não haver a necessidade de trabalhar no formato de cartucho. Assim, descartam-se as etapas prévias de pré-condicionamento, sendo necessário apenas um pequeno treinamento dos analistas (CABRERA *et al.*, 2012).

Ao contrário do formato em coluna, na d-SPE, todo o sorvente interage igualmente com a matriz. Além disso, outra vantagem desta técnica é a possibilidade de realizar a fácil combinação de diferentes tipos de sorventes de acordo com a necessidade do analista, do tipo de matriz e do equipamento que será utilizado na determinação dos analitos (CABRERA *et al.*, 2012).

Este método exige um tempo menor se comparado a SPE tradicional e, tem como vantagem adicional permitir a remoção simultânea da água residual e de um grande número de componentes da matriz, tais como ácidos orgânicos, pigmentos polares e açúcares (SOBHANZADEH *et al.*, 2009).

Segundo TUZIMSKI e REJCZAK (2015) a d-SPE não fornece o mesmo grau de limpeza como a SPE, no entanto, fornece uma boa recuperação e reprodutibilidade, juntamente com vantagens práticas e de custos.

As propriedades e as principais aplicações dos sorventes mais utilizados nesta técnica estão detalhadas a seguir.

O sorvente etilenodiamino-N-propil é uma amina primária e secundária (PSA) que atua como um trocador aniônico e pode interagir com outros compostos através de pontes de hidrogênio ou dipolo-dipolo. Possui forte interação com os compostos da matriz, sendo usado para remoção de vários coextrativos interferentes. A estrutura bidentada do PSA (Figura 8) tem um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário na sua estrutura. Como resultado, a retenção de ácidos graxos livres, açúcares e de outros compostos polares presentes na matriz é muito forte, podendo ocorrer a retenção de alguns analitos que interferem no resultado da análise. Por outro lado, não é tão eficiente na remoção de compostos apolares, tais

como gorduras. O tamanho de partícula do sorvente utilizado é, geralmente, de 40 µm (CABRERA *et al.*, 2012).

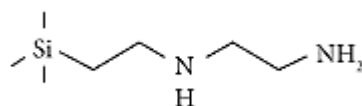


Figura 8: Estrutura da amina primária secundária (PSA).

O sorvente C18 é mais utilizado para matrizes com teor de gordura maior que 2%, pois remove com boa eficiência interferentes apolares, tais como substâncias graxas e lipídios. No entanto, o sorvente C18 tem sido utilizado em conjunto com PSA para diferentes tipos de matrizes e analitos. O C18 é bastante usado na determinação de compostos orgânicos em matrizes aquosas por SPE e tem um custo inferior ao do PSA. O tamanho de partícula do sorvente C18 mais utilizado é o de 40 µm, que também é o mais usado em SPE (CABRERA *et al.*, 2012).

A redução do teor de pigmentos nos extratos provenientes de amostras vegetais foi outro avanço efetuado na etapa de limpeza, obtido através da adição de uma pequena quantidade de carvão ativado ou carbono grafitizado. O carvão disponível comercialmente para fins cromatográficos, comumente chamado de carbono grafitizado (graphitized carbon black, GCB), possui uma grande área superficial e contém grupos altamente polares na superfície, com alto potencial para formação de pontes de hidrogênio. Em decorrência destas características, ocorre forte retenção de analitos planares que contenham um ou mais grupos ativos em sua estrutura, resultando em baixas recuperações para estes compostos. Entre os compostos planares que apresentam baixa recuperação quando GCB é empregado na etapa de d-SPE, pode-se destacar hexaclorobenzeno, terbufós e tiabendazol (CABRERA *et al.*, 2012).

Primeiramente o GCB foi aplicado à extração de analitos não polares, tais como inseticidas organoclorados e em seguida de analitos moderadamente polares, tais como triazinas e os ácidos fenóxi (HENNION, 2000).

A capacidade de adsorção do carvão ativado não está apenas relacionada com a área superficial e estrutura do poro, mas também com a natureza química dos adsorventes (grupos funcionais na superfície que conferem alta reatividade),

adsorvatos e pH das soluções. Outro fator que pode afetar a adsorção de modo significativo é a granulometria (FREITAS *et al.*, 2005).

PINHO e QUEIROZ (2009) testaram diferentes adsorventes para determinar resíduos de agrotóxicos em tomates, com posterior análise utilizando cromatografia gasosa equipada com um detector por captura de elétrons (DCE). Os adsorventes testados foram florissil, octadecil (C-18), octil (C-8) e sílica gel. Dentre esses, o florissil proporcionou maiores porcentagens de recuperação dos piretróides (> 80%) e extratos com *clean up* adequado para análise cromatográfica. Os piretróides interagem fracamente com a superfície do florissil devido às suas características hidrofóbicas.

3.3.3 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)

A cromatografia gasosa (GC) é uma das técnicas de análise mais utilizadas para a determinação de pesticidas multiclasse em vegetais em uma única corrida (FRENICH *et al.*, 2009). Ela pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (CHIARADIA *et al.*, 2008).

A sensibilidade é a principal vantagem da espectrometria de massas, o que permite a obtenção de espectros de massas dos compostos no nível de rastreamento (baixa quantidade de amostra e/ou baixa concentração) (VÉKEY, 2001). Além disso, oferece simultaneamente a confirmação e a quantificação de vários pesticidas (PRZYBYLSKI e HOMMET, 2008).

Os métodos de ionização mais empregados em GC-MS são a ionização por impacto de elétrons (“electron ionization” - EI) e a ionização química (“chemical ionization” - QI). Na EI o analito de interesse, em fase gasosa, é bombardeado com elétrons de alta energia (geralmente 70 eV). As moléculas do analito absorvem esta energia desencadeando vários processos, dentre os quais o mais simples é aquele

em que o analito é ionizado pela remoção de um único elétron ($M^{+•}$) (CHIARADIA *et al.*, 2008; VÉKEY, 2001).

3.3.4 Avanços dos Métodos para a Determinação de Agrotóxicos em Alimentos de Origem Vegetal

Muitos dos métodos publicados (GELSOMINO *et al.*, 1997; LACASSIE *et al.*, 1998; ŠTAJNBAHER e ZUPANČIČ-KRALJ, 2003) para a determinação de pesticidas em alimentos de origem vegetal, são mais complicados e exigem um tempo maior para a extração. Além disso, são dispendiosos, consomem um grande volume de solvente, gerando conseqüentemente muito gastos com reagentes e materiais, gerando também mais resíduos.

A Tabela 4 apresenta um resumo dos artigos publicados referente a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal desde os anos 90.

Tabela 4: Métodos para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal

MATRIZ	COMPOSTOS	EXTRAÇÃO		LIMPEZA		Análise	Faixas de Recuperação % e (RSD %)	Referência
		Técnica	Solvente (s)	Técnica	Sorventes/ Sais			
Vegetais	26 compostos das classes: organofosforado, piretróide, organoclorado, triazina e etc	Partição líquido-líquido	Acetona e diclorometano	GPC	-	GC-MS	80 a 100 (2 a 4)	JOHNSON <i>et al.</i> (1997)
Cenoura, melão e tomate	19 compostos das classes: piretróide, organohalogenado, organonitrogenado e organofosforado, incluindo: clorotalonil, pendimetalina, tebuconazol, deltametrina e trifluralina	Partição líquido-líquido 100 g amostra + 200 mL de acetona e filtrou-se sob vácuo → Partição Líquido-Líquido com 550 mL 9,09% (v/v) de solução NaCl e 2 x 100 mL de diclorometano → a fase orgânica passou através de um filtro contendo Na ₂ SO ₄ anidro	Acetona e diclorometano	GPC A fase orgânica foi concentrada e ajustada para 3 mL com fase móvel de coluna de permeação em gel posteriormente eluída com acetato de etila e ciclo-hexano 1:1 (v/v) → fração purificada foi concentrada e ajustada para 1 mL com acetona-n-hexano 1:1 (v/v)	-	GC-MS e GC-ECD	70 a 108 (<15)	GELSOMINO <i>et al.</i> (1997)
Maçãs e pêras	9 compostos, incluindo: deltametrina e captan	-	Diclorometano-acetona-hexano	-	-	GC-MS	55a 98 (<19)	LACASSIE <i>et al.</i> (1998)

MATRIZ	COMPOSTOS	EXTRAÇÃO		LIMPEZA		Análise	Faixas de Recuperação % e (RSD %)	Referência
		Técnica	Solvente (s)	Técnica	Sorventes/ Sais			
12 amostras entre frutas e vegetais, incluindo feijão verde, maçã e laranja	90 compostos, incluindo: captan , carbofuran , trifluralina , difenoconazol , tebuconazol e deltametrina	SPE	Acetona, acetato de etila e metanol	DEA	MgSO4 anidro	GC-MS	> 80 (< 10)	ŠTAJNBAHER e ZUPANČIČ-KRALJ (2003)
		Coluna de vidro carregada com 400 mg de PS-DVB lavadas com 6 mL de acetato de etila e condicionada pela passagem de 6 mL de metanol e 8 mL de água deionizada → as colunas de extração foram equipadas com reservatórios de PP de 70 mL contendo o extrato da amostra, adicionando água deionizada até o topo → após 30 min os produtos passaram pela etapa de limpeza → Os eluatos foram evaporados para menos de 1 mL sob fluxo de N2 → adicionou-se duas porções de 2 mL de acetona e evaporou até obter baixo volume, após cada adição → O extrato foi concentrado para cerca de 350 µL por uma corrente suave de azoto (N2) → 50 µL de padrão interno foram adicionados ao frasco e 2 µL foram injetadas		Uma camada (cerca de 1 cm) de sulfato de magnésio anidro foi adicionado a uma coluna de DEA para remover vestígios de água a partir do eluato → A coluna foi então lavada com 6 mL de acetato de etila → As colunas foram colocadas em série numa tubagem de vácuo de SPE e foram, em seguida, eluidas com 2 mL de acetato de etila com 1% de trietilamina e três alíquotas de 2 ml de acetato de etila-acetona 90:10 para um tubo de 15 mL sob fluxo de gravidade apenas				

MATRIZ	COMPOSTOS	EXTRAÇÃO		LIMPEZA		Análise	Faixas de Recuperação % e (RSD %)	Referência
		Técnica	Solvente (s)	Técnica	Sorventes/ Sais			
Repolho e rabanete	107 compostos, incluindo: captan , deltametrina , pendimetalina , trifluralina , difenoconazol e tebuconazol	QuEChERS original	10 mL Acetontrila	d-SPE	150 mg MgSO ₄ e 25 mg PSA	GC-MS	80 a 115 (<15)	NGUYEN <i>et al.</i> (2008)
Cenoura	14 compostos, incluindo: procimidona trifluralina , tricloρφom, captan , clorotalonil , deltametrina , dicloran, fention,	PLE / MSPD	Acetato de etila, diclorometano e acetona	-	Florisil, XAD-4, XAD-7 e C18 / sulfato de sódio anidro	GC-MS	70 a 133 (6 a 20)	ABAD, <i>et al.</i> (2010)
Tomate, abóbora, pepino, berinjela, pimentão, alface, cenoura e repolho	23 compostos das classes: inseticida, fungicida, herbicida, acaricida, rotenticida e nematocida, incluindo: carbofuran	10 g amostra extraída com 20 mL de acetona (300 rpm por 5 min) → o sobrenadante foi transferido para cilindro graduado de 25 mL		SPE Acetato de etila/ metanol (1:1, v/v)	Cartucho C ₁₈	GC-MS	81 a 115 (2-12)	OSMAN <i>et al.</i> (2011)

MATRIZ	COMPOSTOS	EXTRAÇÃO		LIMPEZA		Análise	Faixas de Recuperação % e (RSD %)	Referência
		Técnica	Solvente (s)	Técnica	Sorventes/ Sais			
Tomate, pimentão, alface, pepino, berinjela, abobrinha, melão, melancia e maçã	121 compostos, incluindo: clorotalonil, trifluralina, difenoconazol, deltametrina, azoxitrobina e tebuconazol	QuEChERS Citrato	10 mL Acetonitrila	d-SPE	150 mg MgSO₄ e 25 mg PSA	GC-MS/MS	85 a 115 (<20)	CAMINHO <i>et al.</i> (2011)
Cenoura	14 organoclorados	QuEChERS Citrato	Acetonitrila	d-SPE	PSA, C18 e CGB/ MgSO₄	GC-ECD	66 a 111 (2 - 15)	CORREIA-SÁ <i>et al.</i> (2013)
Berinjela, tomate, repolho, couve-flor, batata, pepino, cenoura e cebola	19 compostos das classes: piretróide, organofosforado, organoclorado e carbamato, incluindo: carbofuran e deltametrina	Evaporador rotativo sob vácuo	Acetato de etilo, hexano e acetona (3:1:1)	Cromatografia em coluna	Florisil	GC-MS	79 a 106 (2,34 - 15,4)	CHOWDHURY <i>et al.</i> (2013)

MATRIZ	COMPOSTOS	EXTRAÇÃO		LIMPEZA		Análise	Faixas de Recuperação % e (RSD %)	Referência
		Técnica	Solvente (s)	Técnica	Sorventes/ Sais			
Tomate	46 compostos, incluindo: clorotalonil, carbofuran, deltametrina, tebuconazol e piraclostrobina. Trifenilfosfato como padrão interno	QuEChERS	10 mL Acetonitrila	d-SPE	150 mg MgSO₄, 25 mg PSA e 25 mg ODS	GC-MS	80 a 110 (<20)	RESTREPO <i>et al.</i> (2014)
Maça, tomate, pepino e repolho	14 compostos, incluindo clorotalonil	SPME	Água Milli-Q com 10% de NaCl	-	-	GC-MS	73 a 118 (1,5 - 14)	ABDULRA'UF e TAN (2015)
20 tipos de vegetais, entre eles: cebolinha, alface chinesa, pepino, tomate espinafre, pimentão, berinjela e cenoura	21 compostos das classes: piretróide e organofosforado	Evaporador Rotatório	Acetonitrila	SPE acetona/diclorometano (1:1, v/v)	Cartuchos Envi-CARB e NH ₂ -LC	GC-MS	73,7 a 123,8 (2,4 - 8,6)	QUI <i>et al.</i> (2015)

- O que está em negrito se assemelha com este estudo.

3.4 Validação de métodos cromatográficos de análise

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. 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 e transferência (RIBANI *et al.*, 2004).

3.4.1 Seleção do padrão interno

Um dos principais objetivos dos métodos multirresíduo é o aumento da eficiência no laboratório e a redução das fontes de erros, minimizando a incerteza do resultado final. A propagação dos erros nas etapas do método QuEChERS é monitorada através da utilização do padrão interno trifenilfosfato (TPP, do inglês triphenyl phosphate), que apresenta as vantagens de fornecer altos percentuais de recuperação (> 98%) na fase orgânica, não interagir com o sorvente PSA utilizado na etapa de *clean-up*, além de ser um excelente padrão interno para Cromatografia Gasosa (PRESTES *et al.*, 2009).

3.4.2 Seletividade

A seletividade corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis de interferirem na determinação, tais como isômeros, isóbaros, impurezas, entre outros (LANÇAS, 2004). A verificação da seletividade do procedimento analítico pode ser realizada de duas formas, a primeira é a partir da comparação entre os sinais (resposta instrumental) advindos do processamento da matriz, do extrato/digerido da matriz fortificada e do analito puro em solvente (MAPA, 2011; RIBANI *et al.*, 2004). A segunda é comparar a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada

com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

Algumas técnicas instrumentais, como espectrometria de massas acoplada à cromatografia, podem ser altamente seletivas, garantindo uma identificação inequívoca do analito (MAPA, 2011).

3.4.3 Efeito Matriz na Cromatografia Gasosa

O efeito matriz é um fenômeno comumente encontrado na análise por cromatografia gasosa (GC) de pesticidas em alimentos (HAJSLOVÁ, 1998; KWON, 2012; KRUIVE, 2008; POOLE, 2007). Sítios ativos no sistema GC, principalmente no sistema de injeção, que adsorvem e/ou induzem a degradação térmica de alguns analitos, são a principal fonte do efeito matriz. Em uma solução padrão de pesticidas em solvente, os sítios mais ativos estão disponíveis para os pesticidas, os quais reduzem a percentagem de moléculas injetadas que eventualmente será detectada, do que quando a solução injetada contém também componentes de matriz que atuam para bloquear os locais ativos, como pode ser visto na Figura 9. Assim, a eficácia da injeção para os analitos, é maior na presença de componentes da matriz do que em soluções no solvente (SCHENCK, 2000; DE SOUSA 2012), isso porque a eficiência na transferência de analito através do sistema GC até o detector é maior e conduz a um aumento significativo da resposta cromatográfica.

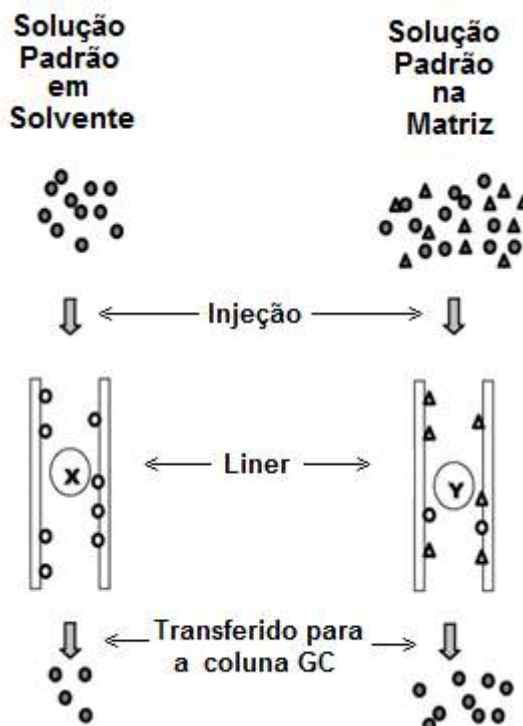


Figura 9: Ilustração simplificada do efeito matriz no sistema de injeção do GC, sendo que X, Y- número de sítios ativos livres para adsorção no injetor; ● moléculas da substância a analisar na amostra injetada; ○ porção das moléculas de analito adsorvido no injetor; ▲ moléculas de componentes da matriz presente na amostra injetada; △ porção de componentes da matriz adsorvido no injetor. Adaptado de HAJŠLOVÁ e ZROSTLIKOVA (2003).

Na Figura 9, pode-se observar inicialmente que as moléculas da matriz são retidas nos locais ativos das paredes do injetor, que conduz a um aumento no número de moléculas de analito atingindo a coluna, assim como a resposta analítica.

3.4.4 Curva analítica e linearidade

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 (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2011; ANVISA, 2003).

A relação matemática entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a concentração ou massa da espécie de interesse a ser quantificada deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica (RIBANI, 2004).

A curva analítica deve ser construída a partir da análise de, no mínimo, 6 a 8 concentrações conhecidas do analito (padrões) adicionadas na mesma matriz para qual o método foi desenvolvido e será aplicado, conhecido como método de superposição de matriz (CASSIANO *et al.*, 2009). Já o MAPA (2011) orienta para que haja no mínimo 5 níveis de concentração, assim como o INMETRO (2011) também recomenda, sendo que esse último afirma ainda que o número de replicatas em cada nível de concentração deve ser o mais próximo possível daquele empregado na rotina do laboratório.

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

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b \quad \text{Equação 1}$$

onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y, quando x = 0.

Além dos coeficientes de regressão a e b, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004).

A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2011) um valor acima de 0,90. Já os valores do coeficiente de determinação (r^2) são tidos como satisfatórios a partir de 0,98 (CHASIN *et al.*, 1998).

3.4.5 Limite de detecção e Limite de quantificação

Na prática o limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) é determinado como a menor concentração do analito que pode ser diferenciada do ruído do sistema com segurança. Um procedimento comum é aceitar como LOD a concentração ou massa do analito que produz um sinal três vezes maior do que o ruído do sistema ($LOD = 3 s/n$) ou três vezes maior que o desvio padrão do ruído, medido empregando-se um branco em vez do sinal do equipamento (LANÇAS, 2004). Outra forma aceita de se determinar o LOD é através do método visual utilizando parâmetros de detecção no método de integração através do instrumento (RIBANI *et al.*, 2004), sendo possível distinguir, com base na integração dos picos, o ruído e o sinal da menor concentração detectável.

Os mesmos critérios para o LOD podem ser adotados para o LOQ (LOQ, do inglês *limit of quantification*), utilizando a relação 10:1, ou seja, corresponde a concentração do analito que produz uma relação sinal ruído maior que 10 ($LOQ = 10 s/n$), também pode ser calculado utilizando o método visual e, ainda através da relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta(s) (RIBANI *et al.*, 2004).

O limite de quantificação na prática é estabelecido através da análise de amostras branco adicionadas do analito, em concentrações decrescentes, até se obter níveis que sejam quantificados com valores aceitos de precisão e exatidão (CASSIANO *et al.*, 2009). Segundo o INMETRO (2011) para a análise em nível de traços, é recomendado adotar o LOQ como a concentração mais baixa da curva analítica.

3.4.6 Exatidão (recuperação)

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI, 2004; LANÇAS, 2004).

Um dos processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método é através dos ensaios de recuperação e são expressos em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz, em um determinado número de ensaios (RIBANI, 2004).

Segundo LANÇAS (2004) a recuperação é uma medida de eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz na qual se encontra presente.

3.4.7 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (MAPA, 2011).

Segundo LANÇAS (2004) a precisão mede nossa capacidade de repetir (em condições experimentais muito próximas) ou reproduzir (em condições experimentais menos próximas) um resultado analítico.

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO 2011). Ela envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intra-ensaio ou intra-corrída (ANVISA, 2003) e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD). Não se deve confundir repetibilidade com precisão instrumental a qual é medida pelas injeções repetitivas, seqüenciais da mesma amostra, seguida pela média dos valores da área do pico ou altura do pico e determinação da estimativa do desvio padrão relativo de todas as injeções (RIBANI *et al.*, 2004).

Para a repetibilidade, o INMETRO (2011) recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão e, o MAPA (2011) que seja feita em no

mínimo três níveis de concentração com pelo menos seis réplicas independentes. A precisão pode simplesmente melhorar com o aumento do número de replicatas.

Já a precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias e é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada.

O objetivo da avaliação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados. O número de ensaios necessários para se avaliar a precisão intermediária segue a mesma recomendação para o cálculo de repetibilidade descrita acima (INMETRO, 2011). A precisão intermediária pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

3.4.8 Robustez

De acordo com o INMETRO (2011), a robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado.

As alterações realizadas em um método que produzam resultados dentro de limites aceitáveis devem ser incorporadas ao procedimento analítico, o qual é, então, considerado robusto em relação àquele fator (LANÇAS, 2004).

Por exemplo, se há variabilidade no preparo da amostra e as alterações das condições de análise produzirem resultados dentro dos limites aceitáveis de exatidão e precisão, o método pode ser considerado robusto e tal variação pode ser incorporado ao procedimento. Por outro lado, constatando-se susceptibilidade do método a tal variação, esta deverá ser adequadamente controlada, ou precauções deverão ser incluídas no procedimento (CASSIANO *et al.*, 2009).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O procedimento experimental constituiu no desenvolvimento e validação de um método para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de cenoura empregando QuEChERS com posterior quantificação em GC-MS. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Resíduos e Contaminantes (LARCO) da Universidade Federal de Rio Grande, campus SAP (Santo Antônio da Patrulha).

4.1 Instrumentação

A instrumentação utilizada no desenvolvimento deste trabalho está descrita a seguir:

- Sistema GC-MS equipado com:
 - Cromatógrafo a gás Perkin Elmer modelo Clarus 680;
 - Amostrador automático Turbo Mass versão 5.4.2
 - Coluna Elite- 5MS com 30 m x 0,25 mm de d.i. e 0,25 µm de espessura de filme;
 - Detector de massas quadrupolo 600 T, operando no modo SIR (Perkin Elmer, Brasil);
 - Sistema de aquisição de dados através do software Turbo Mass version 54.2.1617;
- Agitador Vórtex – Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- Agitador Vórtex –Warmnest Modelo VX-28 (IonLab, Brasil);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct Q3® (Millipore, França).
- Balança analítica de precisão AUY- 220 (Shimadzu, Japão);
- Centrifuga refrigerada NT 825 (Novatécnica, Brasil);
- Centrifuga digital microprocessada refrigerada CT-5000 R (Cientec, Brasil);
- Ultra-som Soniclean (Sanders, Brasil);
- Freezer – Frezeer horizontal (Consul, Brasil);
- Freezer – Frezeer vertical (Electrolux, Brasil).

4.2 Materiais, adsorventes, solventes e reagentes utilizados

- Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct Q3® (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- Hexano P.A. (Neon, Brasil);
- Acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- Sorvente Bondesil C18 com tamanho de partículas de 40 µm (Agilent, EUA);
- Sorvente Amina Primária e Secundária (PSA) com tamanho de partículas de 40 µm (Agilent, EUA);
- Carvão Ativado em pó 90% de granulometria 4 micras (Alphatec, Brasil);
- Carvão Ativado granulado 1-2 mm (Synth, Brasil);
- Florisil (60-100 mesh) ativado a 675°C com diâmetro médio de partícula 140-250 µm (J.T. Baker, EUA);
- Sulfato de magnésio anidro P.A. (J.T. Baker, Japão);
- Cloreto de sódio P.A. (J.T. Baker, EUA);
- Gás de arraste: Hélio 99,9997% de pureza (White Martins, Brasil);
- Detergente Extran® neutro (Merck, Brasil);
- Filtros de PTFE de 25 mm e porosidade de 0,22 µm (Analítica, Brasil);
- Filtros com membrana PTFE modificada para filtração de solventes orgânicos e aquosos de 13 mm e porosidade de 0,45 µm (Merck, Brasil);
- Frascos de vidro (vial), capacidade de 1,5 mL (SUN SRI, EUA);
- Frascos de vidro âmbar com tampa contendo batoque de PTFE, com capacidade de 10 mL;
- Tubos de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 50 e 15 mL (Tecno Plastic, Suíça);
- Septas em PTFE de 8 mm para tampas de vial (SUN SRI, EUA);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (BRAND, Alemanha; Labmate, Polônia e PZ HTL S.A., Polônia);
- Vidraria comum de laboratório (balão volumétrico, béquer, bastão de vidro, espátula...);
- Mixer 400 Watt (Philips Walita®, Brasil);
- Liquidificador 600 Watt (Philips Walita®, Brasil);

- Padrões sólidos dos agrotóxicos estudados: Trifluralina 99,29% e Deltametrina 98% (Dr. Ehrenstorfer), Carbofuran 99,9%, Clorotalonil 99,3%, Pendimetalina 98,8%, Captan 99,6%, Tebuconazol 99,5%, Piraclostrobina 99,9%, Difenconazol 97,2% e Azoxistrobina 99,4% (Sigma Aldrich).

4.3 Processamento da amostra

As amostras de cenoura utilizadas como “branco”, isto é, isentas de agrotóxicos, foram utilizadas no desenvolvimento e validação do método. Essas amostras são produzidas sem o uso de agrotóxico, portanto orgânicas. As amostras foram obtidas de uma pequena plantação realizada por alunos e professores do curso Técnico em Agropecuária da Escola Estadual de Ensino Médio Idelfonso Simões Lopes, localizada na cidade de Osório, Rio Grande do Sul. A amostragem foi realizada mais de uma vez, sendo que a cultivar plantada nessa área é do grupo Brasília.

Em análises posteriores, as cenouras foram adquiridas de um agricultor com produção agroecológica, localizado no interior da mesma cidade. Também foi preciso realizar a amostragem mais de uma vez, porém a cultivar proveniente dessa área é do grupo Kuroda.

Aproximadamente 2 Kg de amostra de cada plantação, após a colheita foram primeiramente lavadas abundantemente com água da torneira e levemente raspadas para retirada das sujidades maiores. Posteriormente, foram picadas e levadas ao triturador juntamente com água destilada na proporção de 1:0,5 (100 g de cenoura para 50 ml de água) para completa homogeneização da amostra (Figuras 10a, 10b e 10c). Em seguida foram armazenadas em potes de vidros até o momento da sua utilização. O armazenamento das amostras foi feito em freezers com temperatura de -18°C.

Segundo a CEASA (2013) nunca se deve descascar uma cenoura, pois a parte mais nutritiva está justamente perto da superfície, basta lavá-la adequadamente e raspá-la. Ao analisar a indicação que a CEASA passa aos consumidores, podemos perceber que ao mesmo tempo em que a superfície da cenoura é a parte que traz mais benefícios, ela é também a parte que traz maior risco de contaminação por resíduos de agrotóxicos, que traz inúmeras consequências à saúde humana. Por essa

razão, as amostras de cenouras avaliadas nesse estudo, foram previamente raspadas e lavadas abundantemente com água, assim se assemelhando no modo como é consumida.

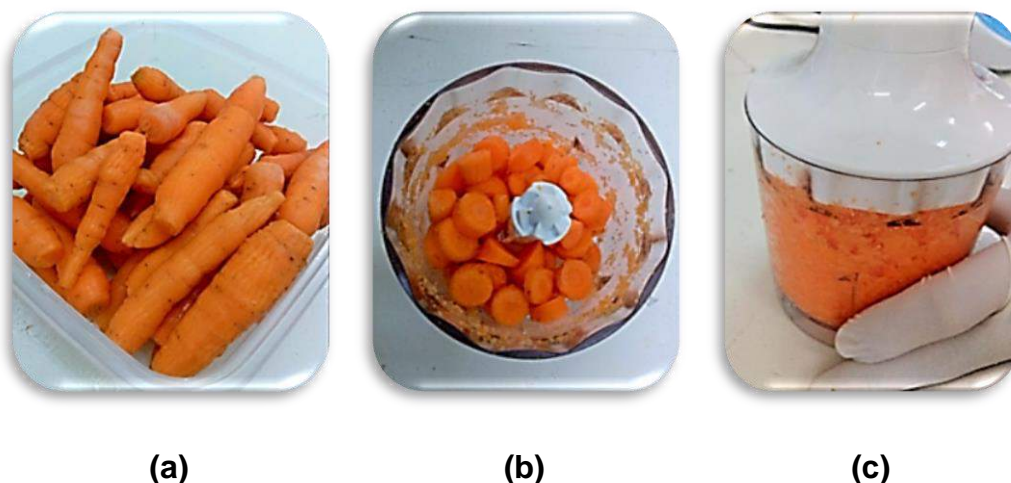


Figura 10: Pré-preparo da amostra com as seguintes etapas concluídas (a) lavagem e raspagem, (b) cenouras já picadas e (c) homogeneizadas.

4.4 Uso do padrão interno

Neste trabalho foi utilizado como padrão interno o composto trifenilfosfato. Uma solução analítica estoque individual foi preparada na concentração de 2000 mg L^{-1} . Através de diluição, foi preparada 10 mL de uma solução na concentração de 10 mg L^{-1} . 10 μL dessa solução foi utilizada na construção das curvas analíticas e 7 μL nos ensaios de recuperação realizados através das fortificações, obtendo-se em ambas utilizações a concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ para o padrão interno trifenilfosfato.

4.5 Preparo das soluções analíticas

Preparou-se individualmente 10 mL da solução “estoque” de 1000 mg L^{-1} de cada pesticida em solvente orgânico, sendo que os solventes mais utilizados de acordo com a melhor solubilidade de cada composto foram: acetonitrila, hexano e

metanol, todos grau HPLC. Tendo em vista as variações da pureza, esta foi levada em consideração no cálculo para pesagem e preparada solução estoque de 1000 mg L⁻¹.

Com a solução de 1000 mg L⁻¹ de cada composto, preparou-se as misturas dos agrotóxicos em acetonitrila na concentração de 10 mg L⁻¹. Para isso, transferiu-se 100 µL de cada solução “estoque” para balão volumétrico de 10 mL já contendo um pequeno volume do solvente, em seguida procedeu-se a adição dos dez compostos ao balão, o volume foi completado com acetonitrila até o menisco e levado a banho de ultrassom por 2 minutos para completa homogeneização.

A partir da mistura de 10 mg L⁻¹ realizou-se as fortificações das amostras e também, preparou-se uma mistura de 1 mg L⁻¹ de todas as soluções para que se pudesse fazer as curvas de calibração na matriz e no solvente.

Todas as soluções analíticas preparadas, foram armazenadas em frasco de vidro âmbar (tampa contendo batoque de PTFE) com capacidade de 10 mL e estocadas a temperatura de -18 °C. Antes de serem utilizadas, as soluções eram deixadas sobre a bancada até atingirem a temperatura ambiente e posteriormente colocadas em banho de ultrassom, por cerca de 1 minuto, para certificação de que os analitos estavam completamente homogeneizados na solução.

4.6 Desenvolvimento das condições do sistema cromatográfico GC-MS e identificação dos compostos

O desenvolvimento das condições cromatográficas e do espectrômetro de massas foi realizada da seguinte forma: injetou-se 1 µL de soluções individuais de cada agrotóxico na concentração de 1 mg L⁻¹, seguido da seleção dos parâmetros: modo de ionização da fonte (EI), energia de colisão para fragmentar o íon de interesse, temperatura da fonte, interface, injetor e forno, vazão do gás de arraste, modo Splitless e análise de triagem no modo *full scan*.

Após as sucessivas injeções pode-se obter a identificação dos íons pertencentes a cada analito bem como o tempo de retenção de cada agrotóxico. Então uma solução de todos os compostos, na concentração de 1 mg L⁻¹ foi injetada no modo de monitoramento SIR (monitoramento seletivo de íons) a fim de avaliar

informações dos íons selecionados, para encontrar a melhor condição de detecção para cada composto.

Com os parâmetros acima já estabelecidos, o íon de maior intensidade foi utilizado na quantificação e outros dois íons de transição mais intensa como de qualificação, sendo que todos os íons selecionados foram confirmados através de consulta na literatura e biblioteca do equipamento Nist MS search 2.0.

Após, injetou-se novamente 1 μL de uma mistura de 1 mg L^{-1} de todos os analitos destinados a detecção por GC-MS para se verificar a separação cromatográfica dos mesmos, podendo assim obter a divisão da análise em segmentos (faixas de tempo), a partir dos respectivos tempos de retenção de cada analito selecionado no estudo. Ajustes finais na voltagem do eletromultiplicador e no dwell time foram realizados a fim de promover uma maior sensibilidade e detecção de cada analito e o tempo total da corrida foi assim definido.

4.7 Desenvolvimento do método QuEChERS para análise de agrotóxicos em cenoura

Foram realizados primeiramente três experimentos de extração baseados nos QuEChERS oficiais (original, citrato e acetato), a fim de avaliar qual método fornecia melhores valores de recuperação. Para isso, fortificações foram realizadas obtendo-se a concentração de 0,25 mg L^{-1} dos agrotóxicos no extrato final. As recuperações foram calculadas em função da concentração do padrão adicionado na matriz, que foram injetados em triplicata. O procedimento de extração foi realizado uma vez.

Após avaliação dos resultados de recuperação dos QuEChERS oficiais, iniciou-se testes para a etapa de *clean-up* com o uso de diferentes adsorventes e em diferentes combinações e proporções, a fim de obter a melhor recuperação dos compostos em estudo nas amostras de cenoura.

4.7.1 Otimização da etapa de limpeza utilizando a d-SPE

Para otimizar a etapa de *clean up* dispersivo, foram realizados vários testes preliminares com diferentes adsorventes disponíveis no laboratório, tais como: florisil, PSA, C18, carvão ativado em pó e granulado. Os que apresentaram melhores resultados sem que ocorressem perdas dos analitos foram selecionados para dar continuidade aos testes: PSA, florisil e carvão ativado em pó.

4.7.1.1 Teste nº 1: limpeza com proporções iguais de PSA e Florisil

Foram realizados três procedimentos de extração nos quais se utilizou proporções iguais de PSA e florisil como adsorventes. As quantidades testadas foram 50 mg de PSA e 50 mg de florisil, 35 mg de PSA e 35 mg de florisil e 25 mg de PSA e 25 mg de florisil. As fortificações foram realizadas obtendo-se a concentração de 0,25 mg L⁻¹ dos agrotóxicos no extrato final. As recuperações foram calculadas em função da concentração do padrão adicionado na matriz, que foram injetados em triplicata. O procedimento de extração foi realizado uma vez.

Inicialmente foram pesados 10 g de amostra branco de cenoura em tubos de polipropileno com capacidade para 50 mL, logo após efetuou-se a fortificação adicionando-se 250 µL de uma solução analítica de 10 mg L⁻¹ contendo todos os agrotóxicos em estudo. Os tubos foram deixados em repouso durante aproximadamente 30 minutos para a interação dos compostos com a matriz. Decorridos esse tempo após a fortificação, adicionou-se 10 mL de acetonitrila e os tubos foram agitados em vórtex por um minuto. Em seguida, acrescentou-se 1 e 4 g, respectivamente, de cloreto de sódio e sulfato de magnésio anidro e a agitação durante um minuto em vórtex foi repetida. Logo após, os tubos foram levados para centrifugação durante cinco minutos a uma velocidade de 5000 rpm.

Posteriormente realizou-se a etapa de limpeza, para isso 1 mL do extrato foi retirado e transferido diretamente para um tubo de polipropileno com capacidade de 15 mL já contendo 150 mg de sulfato de magnésio anidro e as quantidades dos adsorventes testados como descritos no esquema da Figura 11. Os tubos foram agitados em vórtex por um minuto e centrifugados durante cinco minutos a uma velocidade de 5000 rpm. Um volume de 700 µL de extrato foi retirado de cada tubo e transferido diretamente para vial com capacidade de 1,5 mL. Em seguida adicionou-

se 7 μL de uma solução de 10 mg L^{-1} de TFF, obtendo-se a concentração de 0,1 mg L^{-1} para o padrão interno. Logo após o vial foi agitado manualmente com o intuito de homogeneizar e, em seguida levado para análise no GC-MS.

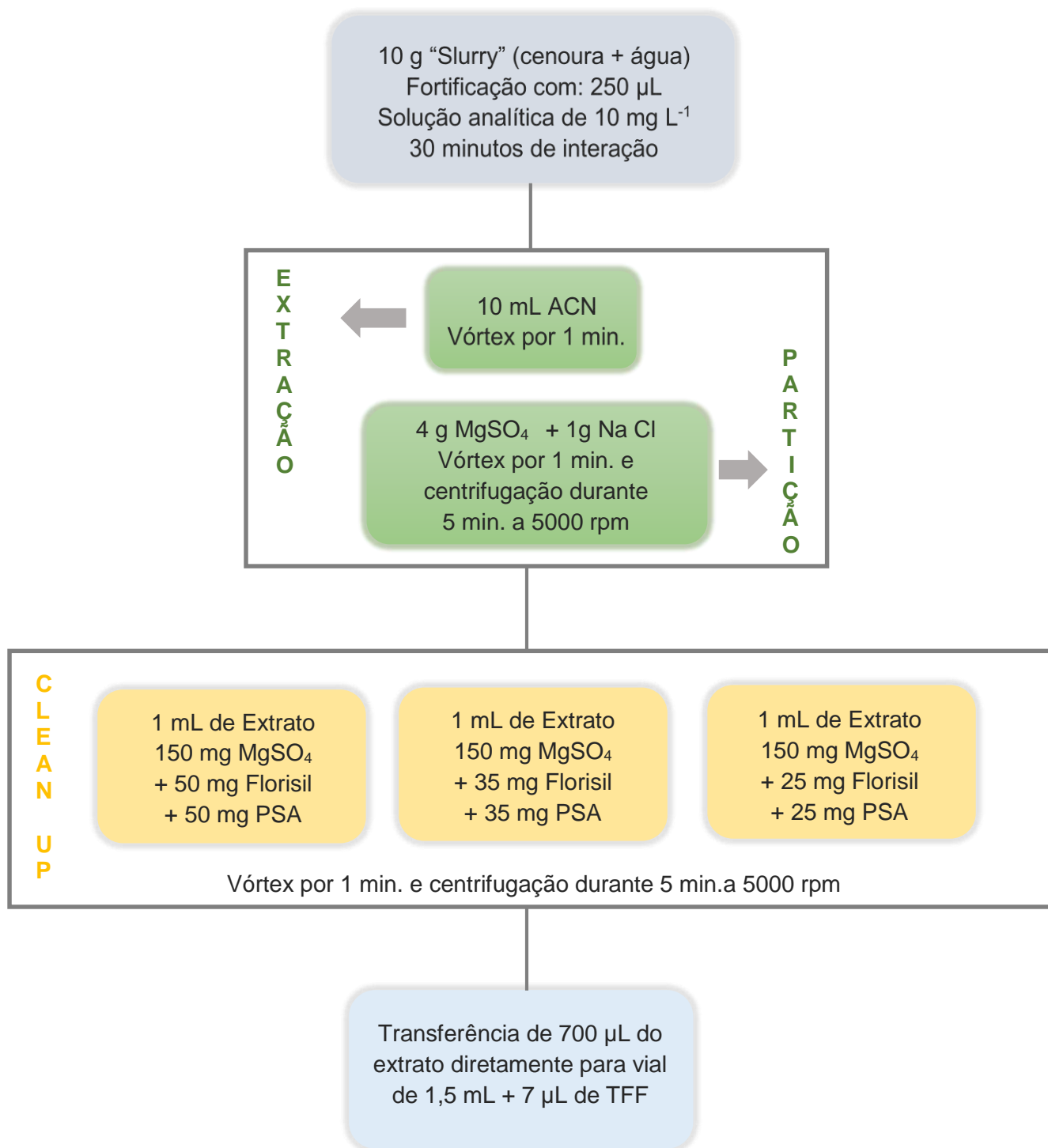


Figura 11: Esquema representativo das etapas realizadas no teste nº1 que faz uso de proporções iguais dos adsorventes PSA e Florisil no processo de limpeza.

4.7.1.2 Teste nº 2: limpeza com diferentes proporções de PSA e Florisil

Foram realizados dois procedimentos de extração nos quais as quantidades testadas foram 35 mg de PSA e 25 mg de florisil, 35 mg de florisil e 25 mg de PSA. O procedimento de extração foi realizado em triplicata e se encontra descrito no item 4.7.1.1, e a Figura 12 resume os procedimentos realizados.

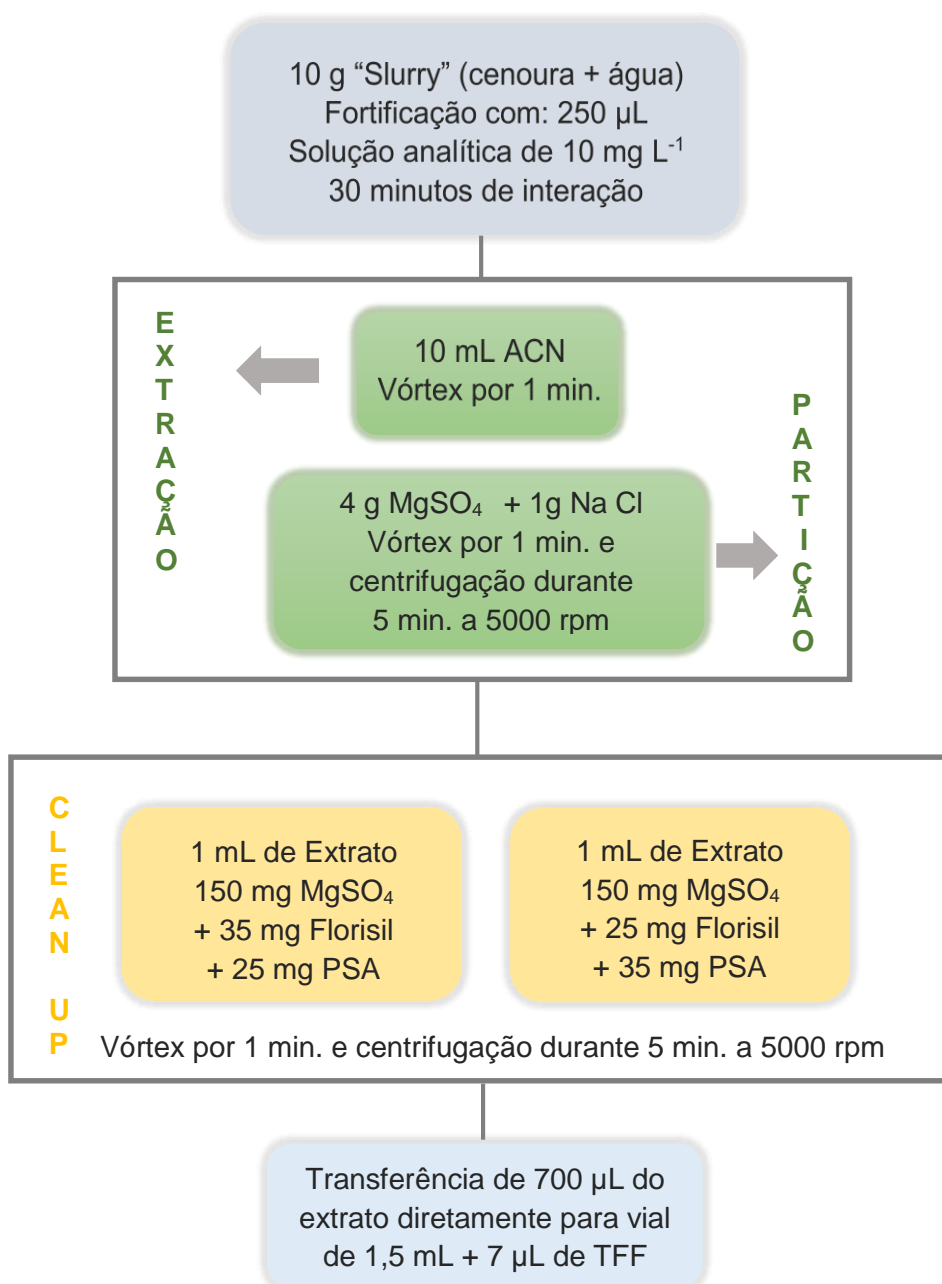


Figura 12: Esquema representativo das etapas realizadas no teste nº2 que faz uso de proporções diferentes dos adsorventes PSA e Florisil no processo de limpeza.

4.7.1.3 Teste nº 3: limpeza com diferentes proporções de Carvão Ativado em pó

Foram realizados quatro procedimentos de extração nos quais as quantidades testadas foram 2, 5 e 10 mg de carvão ativado em pó. Um teste alternativo contou com a adição de 50 μL de Hexano na etapa de *clean up* juntamente com 5 mg de carvão. O procedimento de extração foi realizado em triplicata e se encontra descrito no item 4.7.1.1, e a Figura 13 resume os procedimentos realizados.

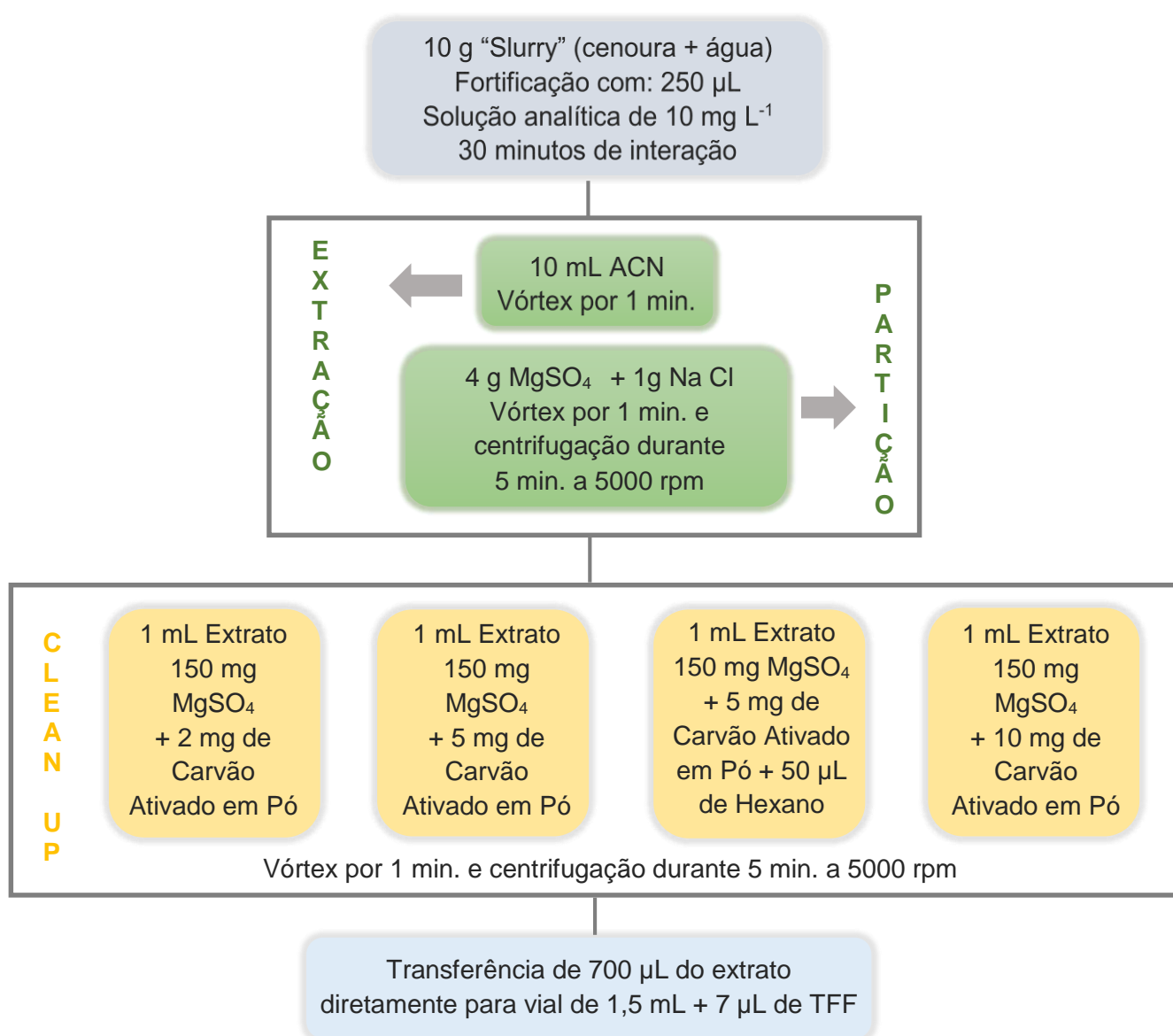


Figura 13: Esquema representativo das etapas realizadas no teste nº3 que faz uso de proporções diferentes de carvão ativado em pó no processo de limpeza.

4.8 Procedimento final desenvolvido

O procedimento final desenvolvido está descrito a seguir e foi usado durante todo o processo de validação do método.

Primeiramente pesou-se 10 g da amostra “branco”, previamente processada, em tubos de polipropileno com tampa rosqueada com capacidade de 50 mL.

Em seguida realizou-se as fortificações nos níveis de 45, 90, 180 e 450 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para isso adicionou-se às amostras os volumes de 30, 60, 120 e 300 μL respectivamente, provenientes da solução de 10 mg L^{-1} dos agrotóxicos. Foi adotado um tempo de interação entre matriz e a solução dos padrões de agrotóxicos de meia hora.

Após adicionou-se 10 mL de acetonitrila e a amostra foi agitada em vórtex durante 1 minuto. Em seguida adicionaram-se os sais nas seguintes quantidades: 4 g de sulfato de magnésio anidro e 1 g de cloreto de sódio. Agitou-se novamente em vórtex por mais 1 minuto. Após realizou-se a etapa de centrifugação a 5000 rpm durante 5 minutos. Em seguida, o extrato foi submetido a etapa de limpeza, para isso retirou-se uma alíquota de 1 mL desse extrato e transferiu-se para um tubo de polipropileno de capacidade de 15 mL, contendo 150 mg de sulfato de magnésio anidro, 25 mg de PSA e 35 mg de florisil, sendo novamente agitados durante 1 minuto em vórtex e após centrifugado a 5000 rpm durante 5 minutos. Logo após, retirou-se uma alíquota de 700 μL do extrato obtido e transferiu-se para um vial juntamente com 7 μL de padrão interno proveniente de uma solução de 10 mg L^{-1} , obtendo-se a concentração de 0,1 mg L^{-1} para o padrão interno. Logo após, o vial foi agitado manualmente com o intuito de homogeneizar e, em seguida o vial foi levado para análise no GC-MS.

4.9 Validação do método proposto

Após definição das melhores condições cromatográficas de separação dos compostos e a otimização do método empregando QuEChERS, realizou-se a validação do método para os seguintes parâmetros: seletividade, efeito matriz, curva analítica e linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão (recuperação), precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e robustez.

4.9.1 Seletividade

A seletividade do método desenvolvido foi avaliada comparando-se a matriz isenta das substâncias de interesse e a matriz adicionada com os padrões dos agrotóxicos a uma concentração de 0,8 mg L⁻¹, para analisar se ocorria a eluição dos interferentes da matriz no mesmo tempo de retenção dos agrotóxicos.

4.9.2 Efeito matriz

A avaliação do efeito matriz foi analisada de duas formas distintas, a primeira foi através da comparação e análise visual de curvas analíticas construídas em solvente puro (acetonitrila) e no extrato branco da matriz. As concentrações das curvas foram: 0,02; 0,03; 0,06; 0,12; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg L⁻¹.

A segunda foi através de cálculo do efeito matriz (%EM) realizado conforme equação 2, segundo KRUIVE *et al.*, (2008), para isso, foi injetado no sistema cromatográfico a solução padrão com a mistura dos agrotóxicos na concentração de 0,8 mg L⁻¹, preparado no extrato da matriz e em acetonitrila.

$$\% \text{ EM} = \frac{\text{área padrão na matriz}}{\text{área padrão em acetonitrila}} \times 100$$

Equação 2

4.9.3 Curva analítica e linearidade

A curva analítica construída a partir do método de padronização interna com superposição da matriz foi obtida a partir das soluções preparadas conforme descrito no item 4.5 em oito níveis de concentração, em duas replicatas de cada nível e injetadas em duplicata, em concentrações variando entre 0,02 a 0,8 mg L⁻¹. A partir das áreas obtidas foram calculadas as médias das áreas, o desvio padrão, o coeficiente de determinação (r^2) e correlação (r), podendo-se determinar também a faixa linear para cada composto analisado por GC-MS. As curvas analíticas foram obtidas através do programa Microsoft Excel®.

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

Os limites de detecção e quantificação do instrumento foram obtidos através da relação sinal/ruído como apresentados no item 3.4.5, a partir da solução dos padrões no extrato branco da matriz, com concentrações variando entre 0,02 a 0,8 mg L⁻¹.

O LOD e o LOQ do método foram adotados como o menor nível de fortificação no qual tenha sido demonstrado que o critério para exatidão e precisão foi atingido, ou seja, que apresentou recuperações entre 70 e 120%, com RSD < 20% (SANCO, 2013).

4.9.5 Exatidão (recuperação)

Para avaliar a exatidão do método foram realizados ensaios de recuperação em quatro níveis de fortificação para cada analito, já que a eficiência do método pode variar em função da quantidade da substância adicionada. Os níveis avaliados foram: 45, 90, 180 e 450 µg Kg⁻¹. Esses valores foram escolhidos com base no LOQ e nos LMRs individuais dos compostos, sendo o LOQ o primeiro nível e os demais níveis

para a grande maioria abaixo do LMR. Para cada nível de fortificação foram feitas sete réplicas genuínas (n=7), totalizando 28 análises em três dias diferentes.

Os ensaios de recuperação das amostras fortificadas foram realizados a partir da utilização de amostras branco de cenoura, ou seja, amostra sem a presença dos compostos a serem determinados.

4.9.6 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

A precisão do método foi avaliada através da estimativa do desvio padrão (RSD) ou coeficiente de variação (CV) da repetibilidade e da precisão intermediária.

A primeira foi avaliada através da repetibilidade dos procedimentos realizados nos ensaios de recuperação descritos no item 4.8.5, injetando-se uma vez cada uma das sete replicatas verdadeiras de cada nível fortificado. Para a precisão intermediária do método, avaliou-se as respostas das fortificações no nível de 180 µg kg⁻¹ de sete replicatas verdadeiras, que foram injetadas uma vez cada e em diferentes dias. O cálculo da precisão intermediária e da repetibilidade do método foram realizadas de acordo com a equação 3.

$$\text{RSD (\%)} \text{ ou } \text{CV (\%)} = \frac{S}{X_m} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

onde:

S= estimativa do desvio padrão absoluto = $[\sum(x_i - x_m)^2 / n-1]^{1/2}$;

X_i= valores individuais;

X_m= média das medidas em replicatas (n=7);

n= número de medidas.

Os valores experimentais obtidos para o cálculo do RSD foram submetidos ao teste de Grubbs. Segundo CHUI e BARROS (2009), o teste de Grubbs verifica preliminarmente a existência de um valor anômalo em cada extremidade do conjunto.

O valor mais alto e o valor mais baixo do conjunto de resultados foram comparados com o valor médio do conjunto dividido pelo desvio padrão (s) do conjunto.

4.9.7 Robustez

Durante todo o período de experimentação, diferentes amostras de cenoura foram adquiridas, com diferentes características, e que acarretou em diferentes pré-preparo da amostra, sendo necessário adicionar água para conseguir homogeneizar a mesma, isso porque o procedimento era realizado em liquidificador caseiro. Ao final do período de experimentação adquirimos um mixer e a amostra pode ser homogeneizada sem a adição de água.

Para certificação de que os resultados eram independentes da quantidade de água adicionada, foi realizado o método de extração para três diferentes pré-preparo da amostra oriundas de diferentes plantações, totalizando duas diferentes amostras, conforme a procedência descrita no item 4.3.

Uma porção da primeira amostra foi preparada sem a adição de água usando o mixer, enquanto que outra porção dessa mesma amostra foi preparada usando o liquidificador, sendo necessário 50 mL de água a cada 100 g de cenoura para total homogeneização. A segunda amostra foi necessária a adição de 80 mL de água a cada 100 g de cenoura para completa homogeneização.

A extração foi realizada em três replicatas independentes conforme item 4.7.1.2 com o *clean up* de 35 mg de florisil e 25 mg de PSA e injetadas uma vez cada. As recuperações foram realizadas através de comparação com padrão na matriz que foram injetados em triplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Condições do sistema cromatográfico GC-MS e identificação dos compostos

As condições instrumentais empregadas para as análises realizadas por GC-MS foram:

Para o Cromatógrafo Gasoso:

- Temperatura do injetor: 250°C;
- Programação da válvula do split do injetor: válvula inicialmente fechada com vazão de 4 mL min⁻¹, após 1 min 30 s abre na razão 1:50, após 1 min 55 s a vazão é ajustada a 1 mL min⁻¹;
- Programação de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 90 °C por um minuto, com incremento de temperatura de 15 °C min⁻¹ até 300 °C mantida por cinco minutos;
- Volume de injeção de 1 µL;
- Vazão do gás de arraste (hélio) constante em 1,0 mL min⁻¹ na coluna;
- Tempo total de corrida de 20 min.

Para o Espectrômetro de Massas, modo EI positivo:

- Temperatura do *transfer line*: 250 °C;
- Temperatura da fonte de ionização: 250 °C;
- Modo de aquisição SIR;
- 70 eV de energia para o impacto dos elétrons;
- Solvente Delay: 0 – 7 min;
- Multiplier: 450 V.

Os íons de cada agrotóxico selecionado para a análise por GC-MS no modo EI de ionização e modo SIR de aquisição, estão listados na Tabela 5, com seus tempos de retenção, segmentos da análise e janelas de tempos.

Tabela 5: Compostos analisados por GC-MS no modo de ionização EI positivo por aquisição no modo SIR, íons monitorados, tempo de retenção (t_r), segmento e janela de tempo.

Composto	Íons Monitorados	t_r (min)	Segmento	Janela de Tempo (min)
Trifluralina	306/264/290	8,52	1	8 – 10,5
Carbofuran	164/122/131	9,11	1	8 – 10,5
Clorotalonil	266/264/268	9,62	1	8 – 10,5
Pendimetalina	252/162/253	11,18	2	11 – 14
Captan	79/149/117	11,46	2	11 – 14
Tebuconazol	125/250/127	13,22	2	11 – 14
Trifenilfosfato	326/325/215	13,24	2	11 – 14
Piraclostrobina	132/164/111	16,18	3	16 – 18
Difenoconazol	265/323/325	16,50/16,56	3	16 – 18
Deltametrina	181/253/255	16,76	3	16 – 18
Azoxistrobina	344/388/345	16,90	3	16 – 18

As Figuras 14, 15 e 16 apresentam o cromatograma total (a) e individual (b), (c), (d) e (e) dos íons monitorados para cada agrotóxico por segmento, obtido após a injeção da mistura dos padrões de agrotóxicos a uma concentração de $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ no extrato branco da matriz.

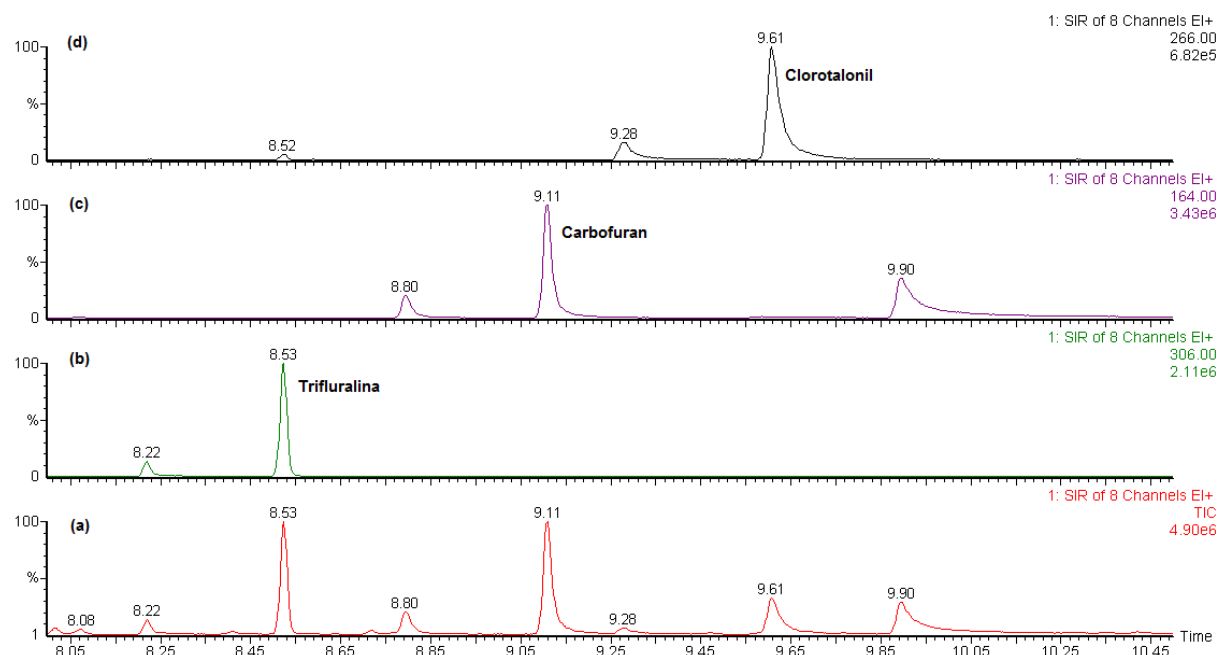


Figura 14: Cromatograma dos íons monitorados no segmento 1, sendo que (a) cromatograma total, (b), (c) e (d) cromatogramas individuais para os íons monitorados 306 (trifluralina), 164 (carbofuran) e 266 (clorotalonil), respectivamente.

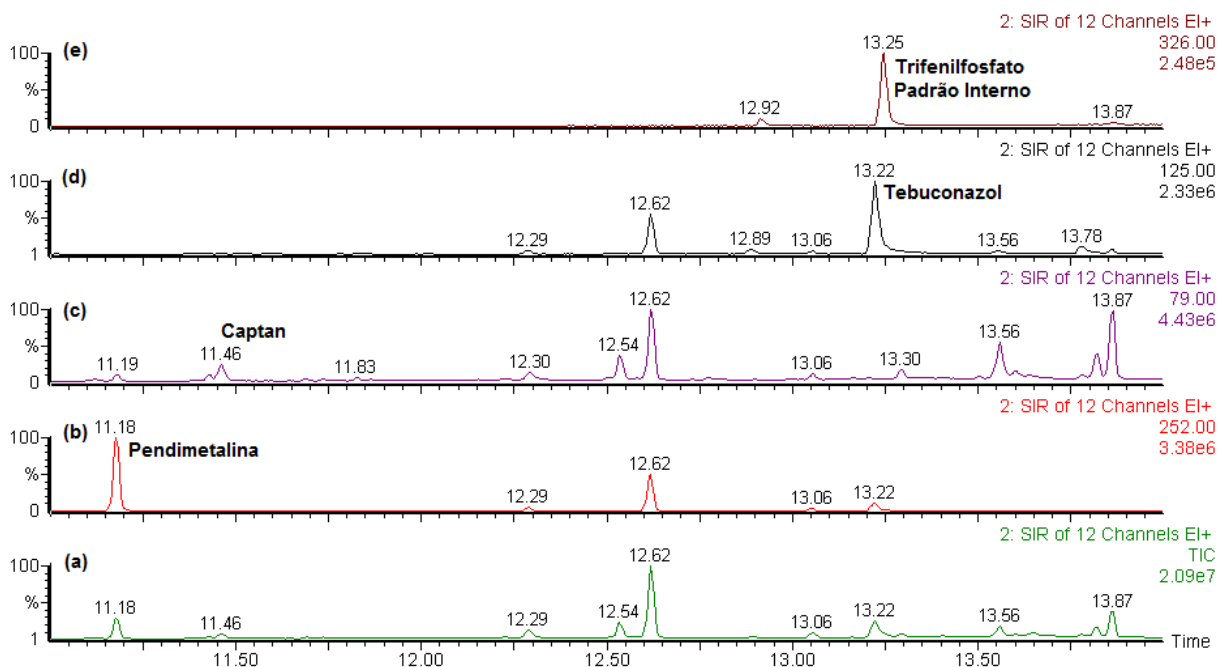


Figura 15: Cromatograma dos íons monitorados no segmento 2, sendo que (a) cromatograma total, (b), (c), (d) e (e) cromatogramas individuais para os íons monitorados 252 (pendimetalina), 79 (captan), 125 (tebuconazol) e 326 (trifenilfosfato), respectivamente.

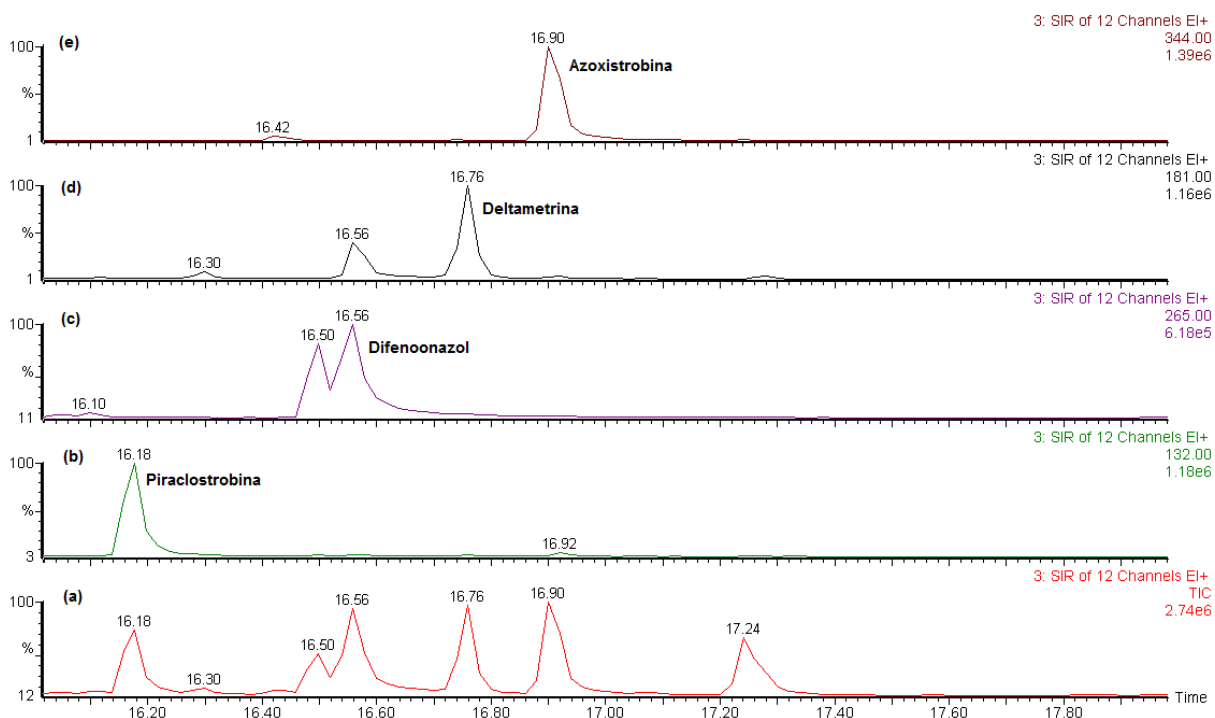


Figura 16: Cromatograma dos íons monitorados no segmento 3, sendo que (a) cromatograma total, (b), (c), (d) e (e) cromatogramas individuais para os íons monitorados 132 (piraclostrobina), 265 (difenonazol), 181 (deltametrina) e 344 (azoxistrobina), respectivamente.

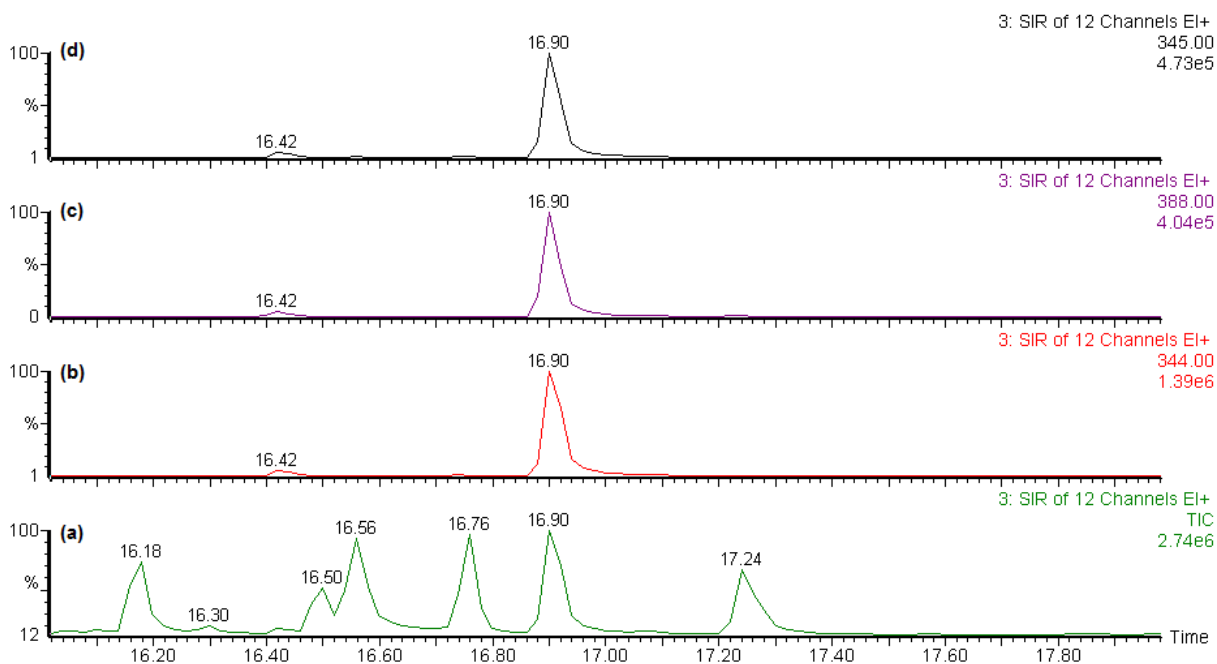


Figura 17: Cromatograma da Azoxistrobina: (a) cromatograma total segmento 3, (b) íon quantificador (344), (c) íon qualificador (388) e (d) íon qualificador (345).

5.2 Avaliação do uso do padrão interno

O padrão interno trifenilfosfato foi escolhido pelo fato de ter sido utilizado no método QuEChERS desenvolvido por ANASTASSIADES *et al.*, (2003), e seu comportamento nas análises por GC ser considerado estável.

Para demonstrar a eficiência do padrão interno trifenilfosfato neste estudo, foram comparados os valores de recuperação e RSD obtidos com e sem o seu uso, a partir do *clean up* com 35 mg de florisil e 25 mg de PSA, visto que essa condição fora selecionada para a validação. As fortificações foram realizadas obtendo-se a concentração de 0,25 mg L⁻¹ dos agrotóxicos no extrato final e o procedimento realizado está descrito no item 4.7.1.2. As Figuras 18 e 19 mostram gráficos com esses valores detalhadamente.

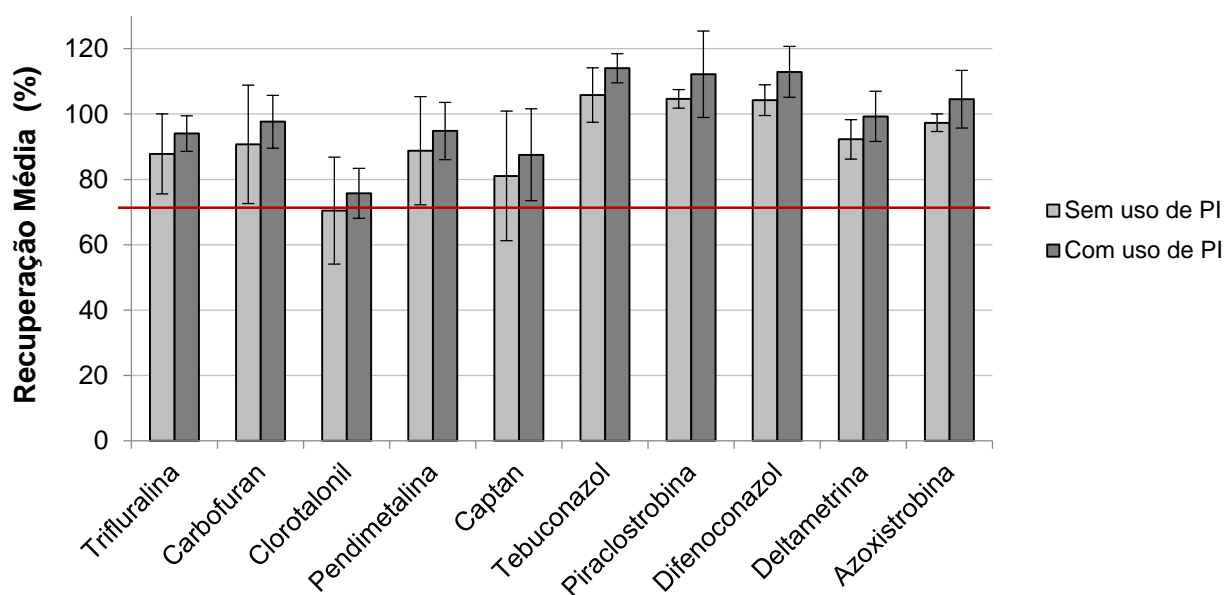


Figura 18: Eficiência do uso de padrão interno trifenilfosfato a partir das recuperações médias obtidas com e sem o seu uso, a linha vermelha representa o limite de 70% e as barras de erro o RSD%, n=3.

Analisando-se individualmente cada composto, decidiu-se manter o uso do padrão interno, pois os valores de recuperação obtidos foram maiores para todos os compostos, estando em torno dos 100%.

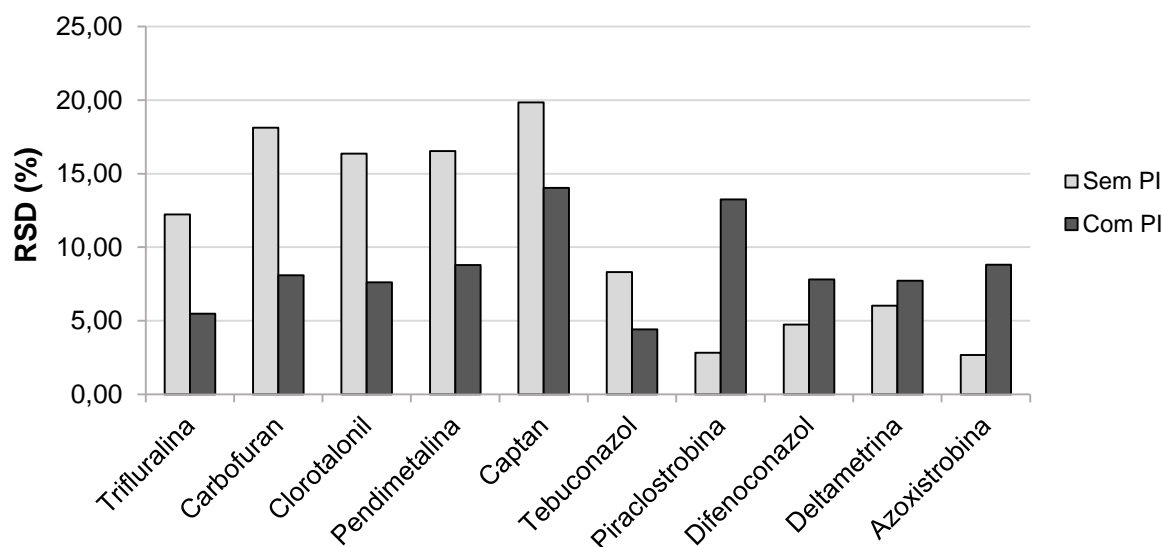


Figura 19: Valores de RSD% com uso e sem uso de padrão interno para o *clean up* com 35 mg de florisil e 25 mg de PSA, n=3.

No geral, o uso do padrão interno trifenilfosfato produz um aumento na precisão, pois são obtidos valores de RSD abaixo de 10%. Para os compostos captan e piraclostrobina os valores foram entre 10 e 15 %. Além disso as soluções poderiam ser injetadas em dias diferentes sem problemas, pois o padrão interno corrigiu variações nas respostas. Isso pode ser observado no momento da construção das curvas analíticas, as quais foram injetadas em duplicata e em dias diferentes. Isso representa uma enorme vantagem para o trabalho no laboratório, pois não foi preciso construir as curvas analíticas todos os dias, economizando tempo e recursos.

5.3 Desenvolvimento do método QuEChERS para análise de agrotóxicos em cenoura

A partir de testes preliminares partindo-se dos QuEChERS oficiais (original, citrato e acetato) foi possível avaliar a eficiência dessas metodologias na extração de agrotóxicos em cenoura. A Figura 20 apresenta os resultados obtidos com os

procedimentos de extração baseados no método QuEChERS original, citrato e acetato.

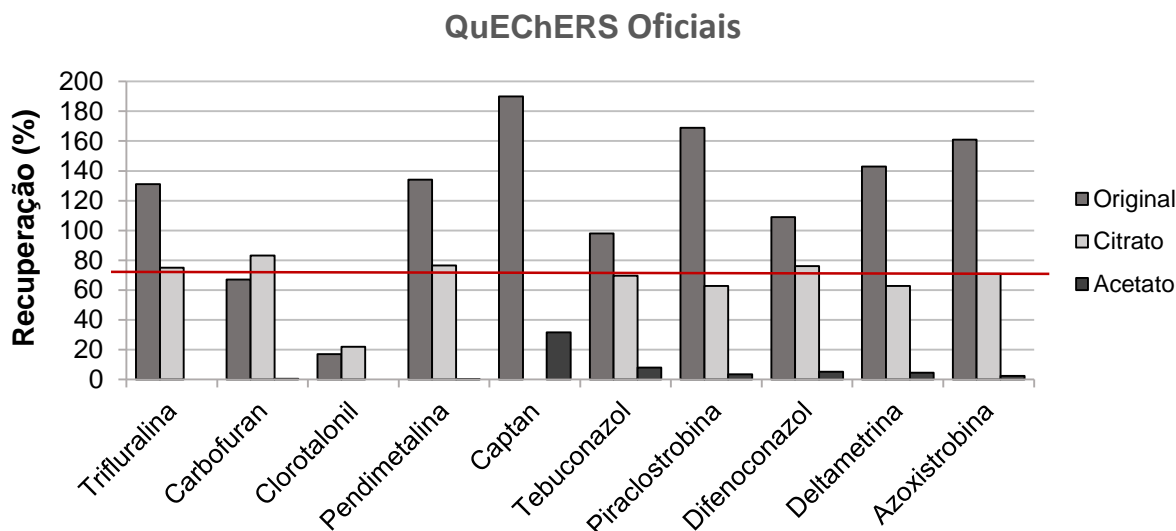


Figura 20: Recuperações obtidas em cada método de extração QuEChERS (original, citrato e acetato), a linha vermelha representa o limite de 70%, n=1.

Pode-se constatar que nenhuma metodologia ofereceu recuperações satisfatórias para todos os compostos na matriz cenoura. No QuEChERS original apenas tebuconazol e difenoconazol, ambos triazóis, foram recuperados dentro do limite de 70 a 120%, enquanto os restantes dos compostos ficaram ou acima de 120% ou abaixo de 70% como pode ser visto na Figura 20.

Já o método de extração QuEChERS citrato demonstrou que os compostos foram recuperados dentro do limite de 70 a 120%. Porém, valores baixos, variando de 70 a 76% foram encontrados para trifluralina e pendimetalina, pertencentes a classe das dinitroanilinas, tebuconazol e difenoconazol, ambos triazóis, e azoxistrobina. O carbofuran foi recuperado com um valor mais alto, com 83%.

O método QuEChERS acetato, no entanto, não mostrou resultados satisfatórios, uma vez que, nenhum dos compostos avaliados apresentou recuperações entre 70 e 120%.

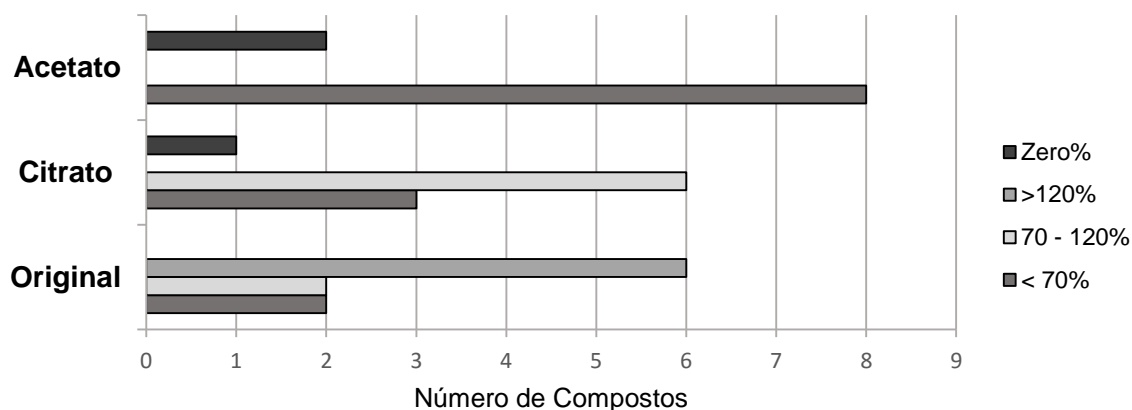


Figura 21: Eficiência do método QuEChERS original, citrato e acetato para a extração de agrotóxicos em cenoura.

Após avaliação desses resultados preliminares foram realizados mais testes a partir do método de extração QuEChERS original. Esse método foi escolhido considerando que entre os QuEChERS oficiais esse é o mais prático, utiliza menos solvente se comparado com o método a base de acetato e consome menos reagente em comparação com os sais utilizados no método citrato.

5.3.1 Teste nº 1: limpeza com proporções iguais de PSA e Florisil

Um dos testes preliminares que deram resultados satisfatórios foi o que contou com o uso de PSA e florisil em conjunto como adsorventes na etapa de *clean up*. Esse teste que se encontra descrito no item 4.7.1.1 utiliza proporções iguais desses adsorventes nas concentrações de 50 mg de PSA e 50 mg de florisil, 35 mg de PSA e 35 mg de florisil e 25 mg de PSA e 25 mg de florisil.

A Figura 22 apresenta o gráfico com os resultados das recuperações, sendo que a linha corresponde ao limite de 70%. Acima dele e abaixo de 120% são considerados resultados satisfatórios de recuperação (SANCO, 2013).

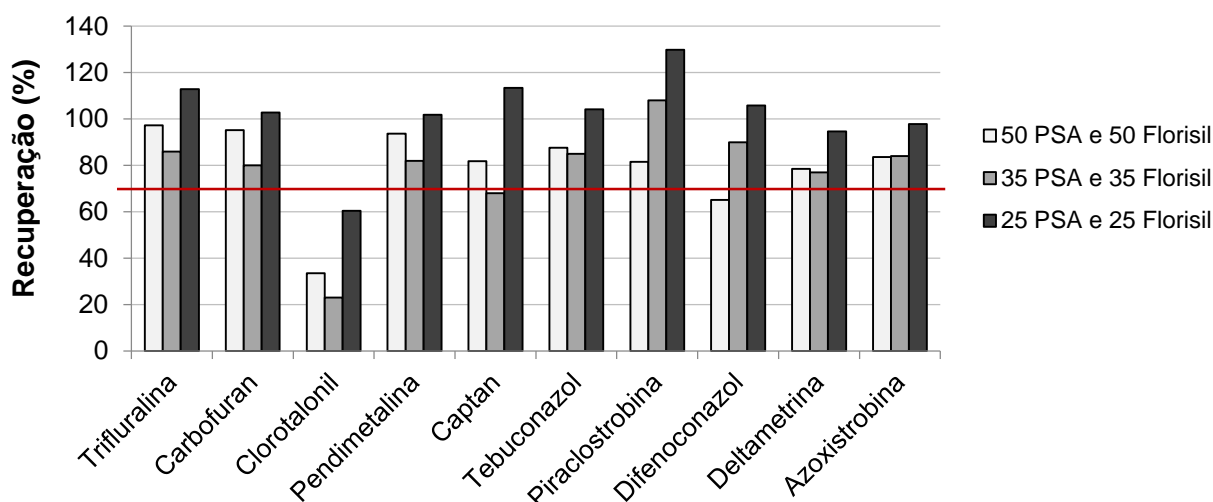


Figura 22: Recuperações obtidas para o teste nº 1 que faz uso de proporções iguais dos adsorventes PSA e Florisil, a linha vermelha representa o limite de 70%, n=1.

A partir desse primeiro teste pode-se avaliar qual proporção dos adsorventes proporcionou melhores resultados em termos de recuperação. Constatou-se que o uso de maior concentração desses adsorventes em conjunto proporcionou uma limpeza mais eficiente, constatada através da análise visual dos extratos obtidos, como também dos cromatogramas. Porém os analitos foram removidos consideravelmente. Já a concentração intermediária proporcionou recuperações em torno de 80%. Com o uso de concentração mais baixa as recuperações ficaram em torno de 100%.

É oportuno destacar que o clorotalonil não respondeu bem a nenhuma proposta de *clean up*, porém com o uso de quantidade mais baixa dos adsorventes sua recuperação foi melhor. Já o difenoconazol não alcançou uma boa recuperação quando se fez uso de maior quantidade de PSA e florisil. Isso pode ser devido a adsorção tanto dos interferentes como também dos compostos de interesse. Além disso, uma maior quantidade de adsorventes gera maiores custos e quantidades de resíduos finais.

Analisando todas essas considerações, o teste que fez uso de maior quantidade de PSA e florisil em conjunto foi descartada.

5.3.2 Teste nº 2: limpeza com diferentes proporções de PSA e Florisil

Com a avaliação dos resultados do teste nº 1, a decisão foi avaliar o uso de proporções diferentes dos adsorventes PSA e florisil, usando para isso as concentrações que forneceram os melhores resultados, ou seja, 25 e 35 mg. A Figura 23 representa os resultados das recuperações obtidas para esse teste que se encontra descrito no item 4.7.1.2.

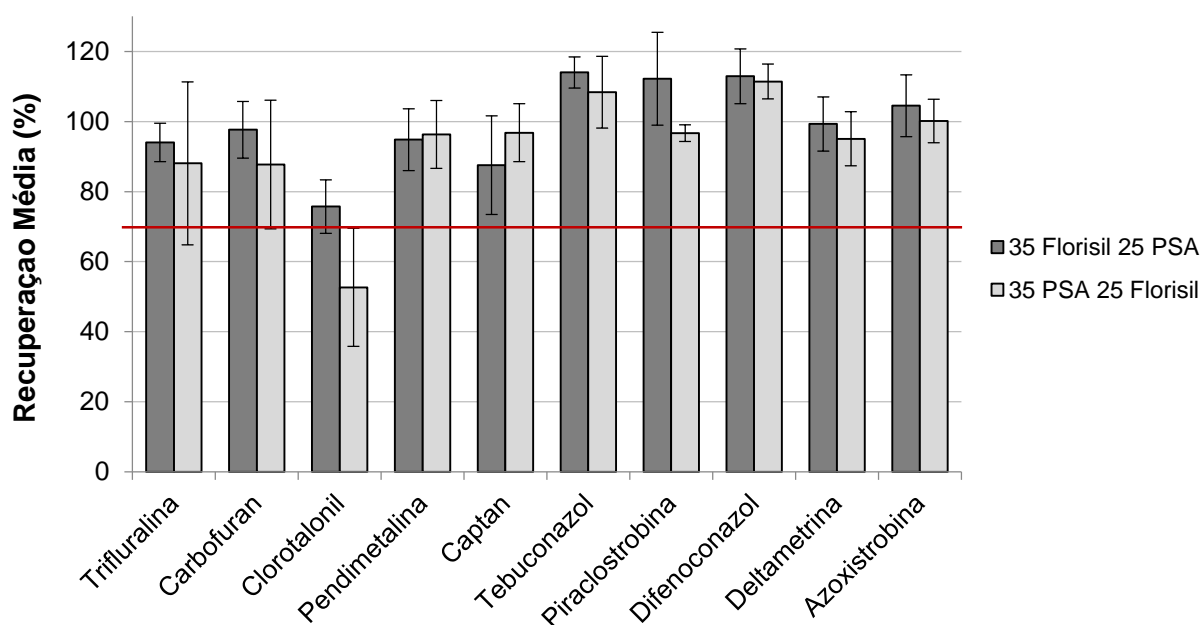


Figura 23: Recuperações médias obtidas para o teste nº 2 que faz uso de proporções diferentes dos adsorventes PSA e Florisil. A linha vermelha representa o limite de 70% e as barras de erro o RSD%, n=3.

Analisando os resultados, pode-se constatar que dos dez compostos, oito apresentaram valores de recuperações maiores e aceitáveis com o uso de maior proporção de florisil, sendo que, o clorotalonil só foi satisfatório nessa condição.

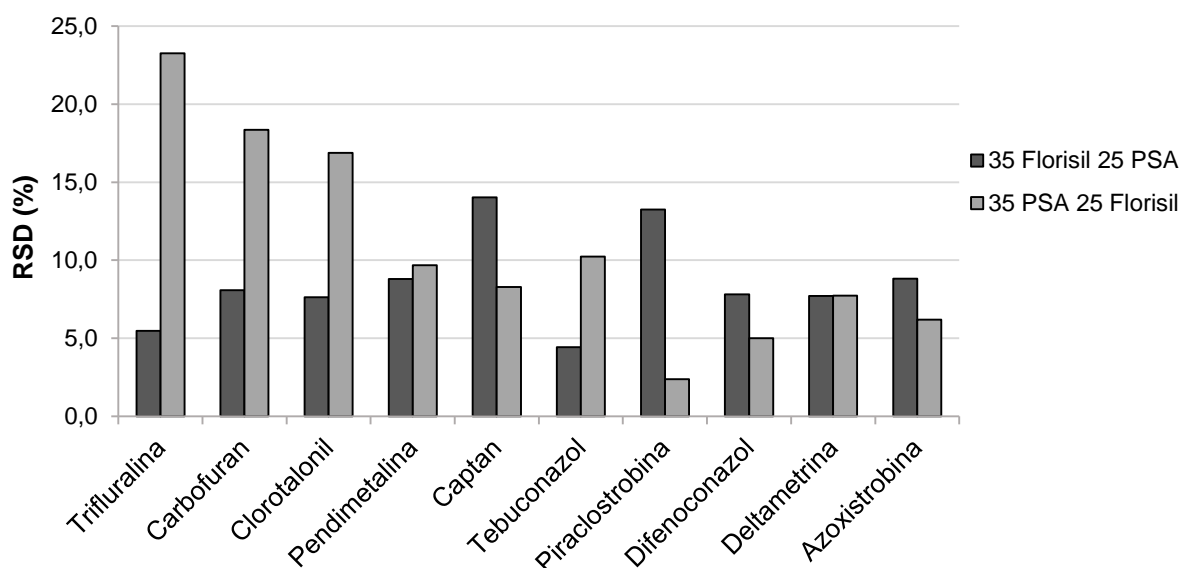


Figura 24: RSD % do teste nº 2 que faz uso de proporções diferentes dos adsorventes PSA e Florisil, n=3.

Contudo, avaliando os valores de RSD (Figura 24), pode-se constatar também que pendimetalina e deltametrina não apresentaram diferenças consideráveis entre as duas condições, já trifluralina, carbofuran, clorotalonil e tebuconazol apresentaram RSD consideravelmente alto e recuperações médias mais baixas quando se fez uso de maior concentração de PSA, porém captan respondeu melhor a essa concentração.

Como os valores de RSD do teste que fez uso de 35 mg de florisil e 25 mg de PSA forneceu valores inferiores a 20% e, grande parte deles menores que os obtidos para o *clean up* de 35 mg de PSA e 25 mg de florisil, esta condição foi selecionada para dar continuidade aos estudos.

5.3.3 Teste nº 3: limpeza com diferentes proporções de Carvão Ativado em pó

A fim de obter um extrato final quase isento da cor alaranjada característica da cenoura, devido ao betacaroteno, foi proposto um último teste, que contou com diferentes proporções de carvão ativado em pó. As concentrações testadas foram de

2, 5 e 10 mg, sendo que a concentração intermediária (5 mg) foi submetida a um *clean up* alternativo com a adição de 50 μ L de Hexano, a fim de facilitar a dessorção do carvão. A Figura 25 apresenta um gráfico com os resultados das recuperações obtidas.

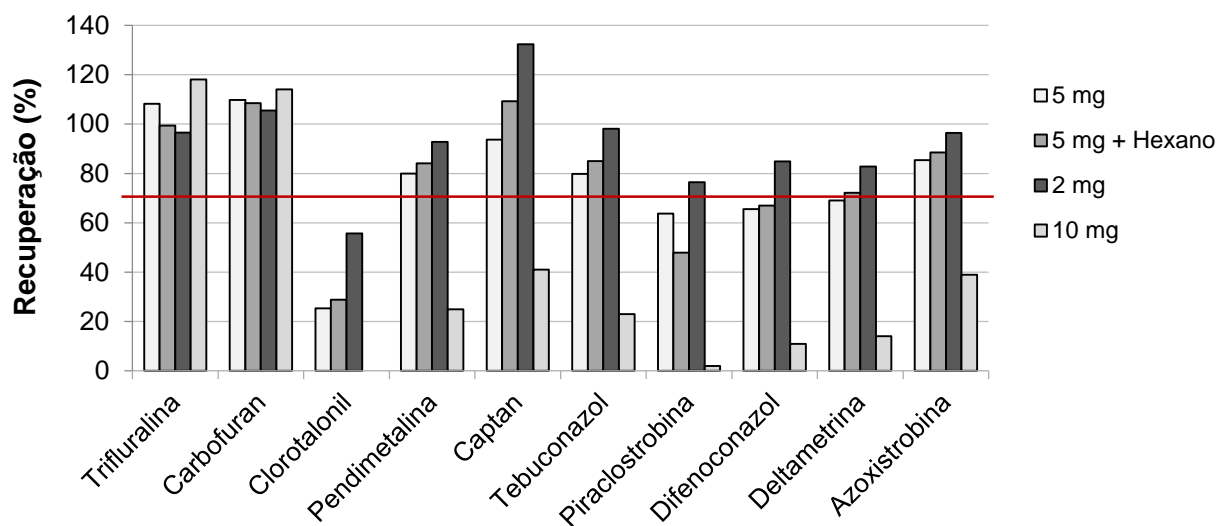


Figura 25: Recuperações obtidas para o teste nº 3 que faz uso de Carvão Ativado em Pó, a linha vermelha representa o limite de 70%, n=1.

Das quatro propostas testadas, a que obteve melhores resultados em termos de recuperação foi a que utilizou concentração menor de carvão (2 mg), uma vez que dos dez compostos, oito apresentaram recuperações dentro da faixa de 70 a 120 %. Os resultados utilizando maior quantidade de carvão (10 mg) apresentou recuperações muito baixas, por provavelmente adsorver os compostos de interesse. Porém, avaliando-se qualitativamente mostrou-se satisfatório para a remoção dos interferentes, como pode ser observado na cor obtida dos extratos (Figura 26).

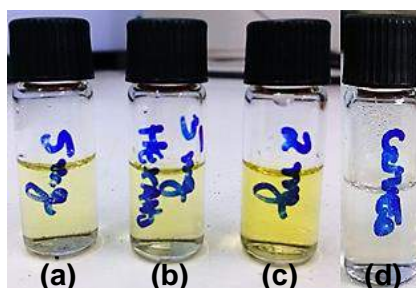


Figura 26: Eficiência do Carvão Ativado em Pó frente a remoção da cor, utilizando-se diferentes quantidades de carvão: (a) 5 mg, (b) 5 mg mais 50 μ L de Hexano, (c) 2 mg e (d) 10 mg.

Pode-se observar as cores dos extratos obtidos após a etapa de limpeza e, constatar que, quanto maior a quantidade de carvão ativado em pó usado, maior também será a remoção da cor presente na matriz. Outra observação relevante, foi que a adição da alíquota de hexano (50 µL) à concentração de 5 mg de carvão na etapa de limpeza não obteve uma ação satisfatória, pois não evitou a retenção dos compostos de interesse pelo carvão.

5.3.4 Comparação entre os melhores resultados para a etapa de limpeza

A fim de certificar a escolha dos adsorventes mais eficientes para a etapa de limpeza, foi comparado os valores de recuperações obtidos para o melhor *clean up* do teste nº 2 e nº 3, descritos nos itens 5.3.2 e 5.3.3 respectivamente, como mostra a Tabela 6.

Tabela 6: Comparação entre os melhores resultados para a etapa de limpeza.

COMPOSTOS	Recuperação %	
	35 Florisil 25 PSA	2 mg Carvão Ativado em Pó
Trifluralina	94	97
Carbofuran	98	105
Clorotalonil	76	56
Pendimetalina	95	93
Captan	88	132
Tebuconazol	114	98
Piraclostrobina	112	76
Difenoconazol	113	85
Deltametrina	99	83
Azoxistrobina	105	96

O *clean up* que faz uso de 35 mg de florisil e 25 mg de PSA foi escolhido para ser utilizado no procedimento de extração durante a validação do método, pois todos os compostos foram recuperados dentro da faixa recomendada pelas agências reguladoras Nacionais (ANVISA, 2003; INMETRO 2011) e Internacionais (SANCO, 2013).

Caso os compostos clorotalonil e captan não fizessem parte do escopo, o *clean up* de 2 mg de carvão poderia ser utilizado.

Vale salientar que em termos de remoção da cor, ambos foram semelhantes.

5.4 Validação do método proposto

5.4.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da comparação dos sinais obtidos nos cromatogramas de amostras branco de cenoura com extratos fortificados do branco da matriz, que quando injetados não apresentaram coeluição de interferentes no mesmo tempo de retenção dos compostos de interesse (Figura 27), ou seja, os sinais obtidos foram gerados apenas pelos agrotóxicos, assegurando, portanto, a seletividade do método.

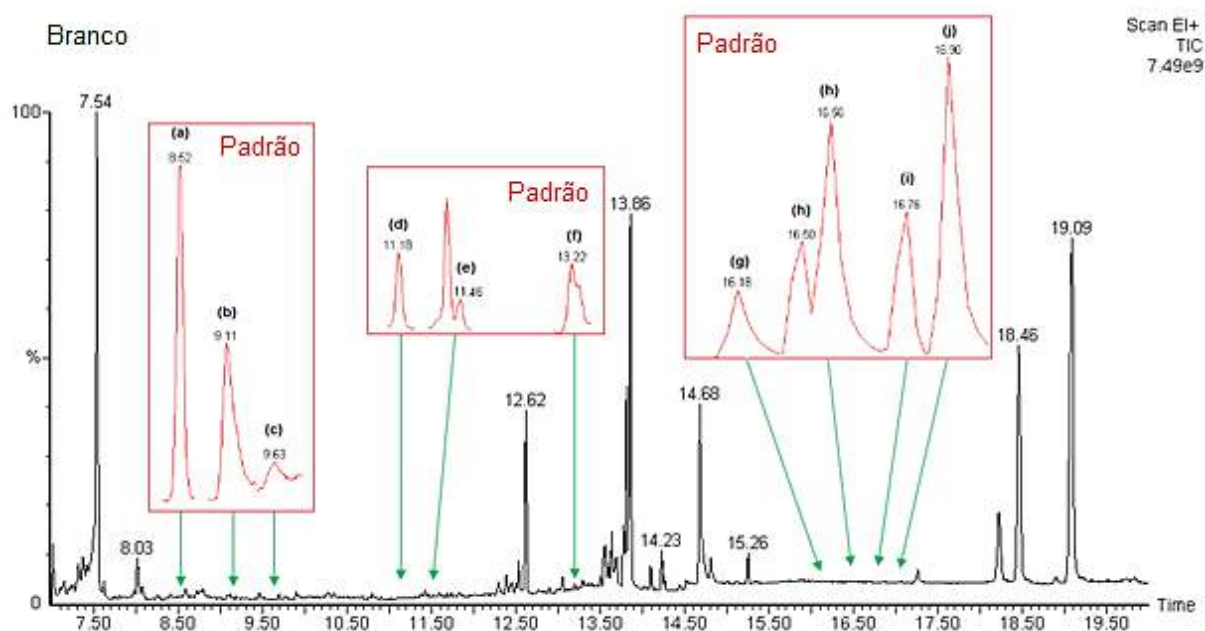
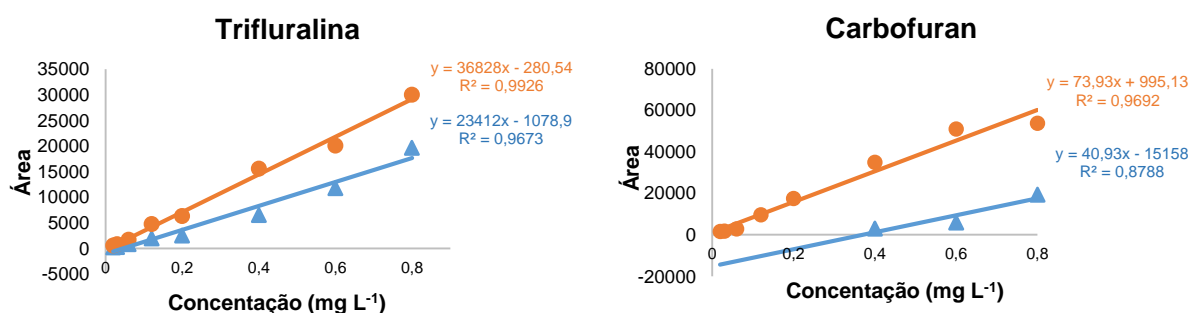


Figura 27: Comparação do cromatograma obtido para a amostra branco de cenoura, com o extrato do branco da matriz fortificado com solução padrão representado nos quadros, sendo (a) trifluralina, (b) carbofuran, (c) clorotalonil, (d) pendimetalina, (e) captan, (f) tebuconazol, (g) piraclostrobina, (h,i) difenoconazol, (i) deltametrina e (j) azoxistrobina.

5.4.2 Efeito matriz

O efeito matriz foi analisado a partir de duas abordagens, a primeira com inspeção visual de curvas construídas no solvente e na matriz (Figura 28), e a segunda com cálculo do percentual do efeito matriz (Tabela 7), partindo das médias das áreas obtidas com sinais gerados após injeção no sistema cromatográfico da solução padrão diluída em solvente e da solução padrão diluída no extrato branco da matriz. As duas abordagens não fizeram uso de padrão interno, pois não se pretendeu avaliar a correção que é feita por ele, ou seja, que os resultados sejam corrigidos.

O efeito da matriz pode ser observado no momento da construção das curvas analíticas, pois a curva em solvente puro (acetonitrila) foi obtida apenas para cinco compostos dos dez em estudo, isso porque o sinal foi muito pequeno ou inexistente para concentrações mais baixas. Porém, com as mesmas concentrações foi possível construir a curva no extrato da matriz. Isso pode ser devido aos fenômenos de adsorção dos agrotóxicos no sistema de injeção do cromatógrafo gasoso, pois quando os extratos foram analisados, os interferentes foram preferencialmente retidos, o que conseqüentemente favoreceu maior quantidade de analitos chegando ao detector (RAHMAN *et al.*, 2013).



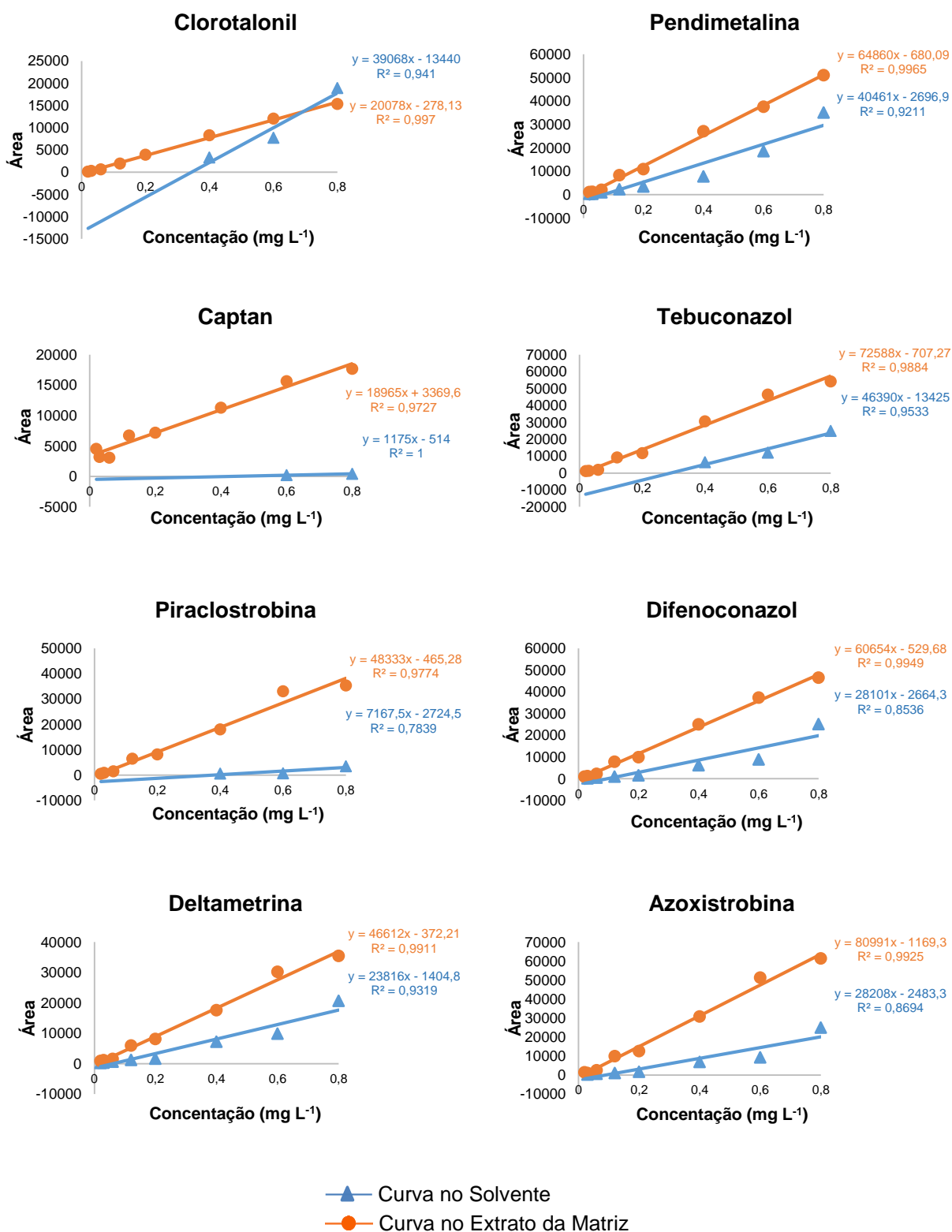


Figura 28: Avaliação do Efeito Matriz a partir da análise visual das curvas obtidas no solvente e no extrato da matriz sem o uso de padrão interno trifenílfosfato.

Na Figura 28 foi possível analisar a perda de linearidade através do coeficiente de determinação (r^2) e, perda de sensibilidade através da inclinação das curvas analíticas construídas no solvente.

Tabela 7: Efeito matriz percentual dos compostos a partir da solução padrão na concentração de $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ preparada em acetonitrila e no extrato branco da matriz.

Compostos	Efeito Matriz (%)
Trifluralina	153
Carbofuran	278
Clorotalonil	81
Pendimetalina	146
Captan	4148
Tebuconazol	218
Piraclostrobina	1027
Difenoconazol	185
Deltametrina	171
Azoxistrobina	245

Analisando os valores obtidos pode-se perceber o acentuado efeito gerado pela matriz. Observando a Figura 09 que explica claramente o comportamento do efeito matriz no sistema cromatográfico, constatou-se que a matriz cenoura apresenta um efeito protetor, não sendo necessário recorrer ao uso de protetores de analitos.

KRUIVE *et al.*, (2008) assegura que nenhum efeito matriz é observado quando o percentual for igual a 100%. Valores superiores a 100% indicam aumento de ionização, e valores inferiores a 100% indicam supressão da ionização.

Dos dez compostos analisados, nove apresentaram enriquecimento da ionização, observado pelos resultados maiores que 100%. Somente o clorotalonil apresentou supressão da ionização, observado pelo valor abaixo de 100%. Pode-se constatar com esses resultados que a matriz em estudo exerce um efeito positivo significativo em 90% dos compostos analisados.

As curvas passaram a ser construídas somente na matriz, com a finalidade de compensar esse efeito.

5.4.3 Curva analítica e linearidade

As curvas analíticas foram preparadas em duplicata e injetadas também em duplicata (n=4). Levando em consideração que a matriz escolhida para o estudo exerce um efeito matriz significativo para a maioria dos compostos, as curvas foram preparadas a partir do extrato branco obtido com o método proposto.

Através das curvas construídas, foram obtidas as equações de reta, a faixa linear e os coeficientes de determinação (r^2) e correlação (r), mostrados na Tabela 8.

Tabela 8: Equação da reta, coeficiente de determinação e faixa linear para cada agrotóxico em estudo, a partir de curvas construídas no extrato branco da matriz.

Agrotóxico	Equação da reta	r^2	r	Faixa Linear (mg L ⁻¹)
Trifluralina	$y = 0,0082x - 0,1398$	0,995	0,997	0,03 a 0,6
Carbofuran	$y = 0,0077x - 0,1491$	0,996	0,998	0,02 a 0,8
Clorotalonil	$y = 0,0048x - 0,2046$	0,981	0,990	0,03 a 0,6
Pendimetalina	$y = 0,0141x - 0,2724$	0,997	0,998	0,02 a 0,8
Captan	$y = 0,0038x + 0,6715$	0,977	0,988	0,03 a 0,8
Tebuconazol	$y = 0,0148x - 0,2051$	0,998	0,999	0,02 a 0,8
Piraclostrobina	$y = 0,0099x - 0,1675$	0,996	0,998	0,02 a 0,8
Difenoconazol	$y = 0,0099x + 0,0339$	0,994	0,997	0,02 a 0,8
Deltametrina	$y = 0,0088x - 0,0446$	0,999	0,999	0,02 a 0,8
Azoxistrobina	$y = 0,0149x - 0,1102$	0,999	0,999	0,02 a 0,8

O método pode ser considerado linear de acordo com o INMETRO (2011), já que todos os coeficientes de correlação (r) obtidos foram maiores que 0,90. Porém a ANVISA (2003) e o SANCO (2013) recomendam que o coeficiente de correlação (r) seja superior a 0,99. Neste caso, apenas o captan não atenderia ao critério de linearidade.

5.4.4 Limites de detecção e de quantificação

A partir das soluções analíticas de concentração 0,02; 0,03; 0,06; 0,12; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg L⁻¹, preparadas no extrato branco da matriz, estabeleceu-se os limites de detecção e quantificação instrumental e para o método, através da avaliação das razões sinal/ruído, sendo considerado o valor de s/n 10 como LOQ e s/n 3 de LOD.

A concentração referente ao LOD instrumental para todos os compostos foi de 6 µg L⁻¹, obtidos através da relação sinal/ruído. Já o LOQ foi de 20 µg L⁻¹, sendo que, essa concentração foi adotada como o primeiro ponto da curva de calibração.

Para o LOD e LOQ do método, foi considerado para cada analito a concentração mais baixa que atingiu o critério de exatidão e precisão adotado neste estudo. Os limites de detecção e quantificação de cada agrotóxico está relacionado na Tabela 9.

Tabela 9: Limites de detecção e quantificação do método, que atingiram os critérios de precisão e exatidão.

Agrotóxico	LOD µg Kg ⁻¹	LOQ µg Kg ⁻¹
	Método	
Trifluralina	45	90
Carbofuran	15	45
Clorotalonil	90	180
Pendimetalina	45	90
Captan	45	90
Tebuconazol	45	90
Piraclostrobina	45	90
Difenoconazol	15	45
Deltametrina	15	45
Azoxistrobina	15	45

Os limites de quantificação do método empregando QuEChERS alcançam valores menores que os limites máximos de resíduos estabelecidos pela legislação brasileira (ANVISA) para os compostos autorizados para a cenoura, com exceção da trifluralina, pois seu LOQ (0,09 mg Kg⁻¹) apresenta concentração maior que o LMR

(0,05 mg Kg⁻¹) vigente. Porém seu LOD é abaixo do LMR, permitindo ser detectado com segurança.

5.4.5 Exatidão (recuperação)

Os ensaios de recuperação foram realizados com no mínimo três níveis de fortificação para avaliação da exatidão do método.

As recomendações das agências regulamentadoras brasileiras, como INMETRO (2011), MAPA (2011) e ANVISA (2007) preconizam a faixa percentual de recuperação aceita para métodos multirresíduos de agrotóxicos como sendo de 70 a 120 %, com RSD% inferior a 20%. Essas recomendações foram seguidas neste estudo e foram considerados adequados para a determinação dos agrotóxicos em amostras de cenoura.

As recuperações médias foram calculadas utilizando-se as curvas analíticas obtidas através do método de padronização interna com superposição de matriz, para extratos preparados de acordo com o método de extração otimizado.

Os ensaios de recuperação foram realizados de acordo com o item 4.8 e os resultados das recuperações médias percentuais e os valores de RSD% da repetibilidade nos níveis de fortificação 45, 90, 180 e 450 µg Kg⁻¹ estão apresentadas na Tabela 10.

É importante destacar que foram realizadas sete replicatas verdadeiras com uma injeção por extrato, ou seja, sete extrações por amostra, o que representa a análise de rotina.

Tabela 10: Média dos percentuais de recuperação e RSD% da repetibilidade, obtidos a partir dos ensaios de recuperação nos níveis de fortificação 45, 90, 180 e 450 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para cada agrotóxico.

Agrotóxico	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)							
	45		90		180		450	
	Rec Média (%)	RSD%	Rec Média (%)	RSD%	Rec Média (%)	RSD%	Rec Média (%)	RSD%
Trifluralina	-	-	106	9,5	99	8,6	96	14,00
Carbofuran	104	16,2	90	16,0	73	12,4	-	-
Clorotalonil*	-	-	-	-	39	82,2	29	32,5
Pendimetalina	-	-	109	7,1	99	6,0	93	10,5
Captan**	-	-	85	14,7	63	7,1	53	10,5
Tebuconazol	-	-	105	5,6	86	4,9	88	12,7
Piraclostrobina	-	-	117	15,0	72	15,9	87	16,6
Difenoconazol	83	11,7	97	13,1	95	14,1	104	16,0
Deltametrina	99	10,1	94	8,6	73	7,9	82	13,2
Azoxistrobina	100	10,7	105	10,6	92	9,3	104	13,9

- foram detectados, porém não atenderam aos parâmetros estipulados no estudo.

* Apresentou sinal muito pequeno, não sendo possível quantificá-lo nessas concentrações.

** O resultado não é reproduzível devido a instabilidade do composto, RSD% alto, curva analítica com pontos dispersos e baixa linearidade.

Dos dez compostos estudados, somente dois apresentaram desacordo com os parâmetros estipulados para o percentual de recuperação e/ou o valor do RSD%. Esses compostos foram clorotalonil e captan.

O clorotalonil não respondeu bem a nenhum nível de fortificação selecionado, apresentando um sinal muito pequeno e quase inexistente, ocasionando um altíssimo RSD%. Segundo COLLINS (2006), a cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons é especialmente sensível a moléculas que contém halogênios, como por exemplo, o clorotalonil, a explicação para isso está relacionada à estrutura química desse pesticida.

Já o captan apresentou um sinal bem superior, porém a curva analítica obtida apresentou um coeficiente de determinação (r^2) baixo. Segundo CHASIN *et al.* (1998), isso demonstra perda de sensibilidade e linearidade. Segundo PRESTES *et al.* (2009) uma das causas das dificuldades encontradas na análise de captan é devido a este se dissociar em íons de razão massa/carga (m/z) baixa.

Estes compostos são conhecidos devido à sua dificuldade de quantificação e as causas dos problemas encontrados na análise são diversas e difíceis de serem controlados. Quando resultados não satisfatórios são obtidos para esses compostos, é difícil indicar a causa de sua degradação, uma vez que pode ser proveniente do processamento da amostra, extração, *clean up*, dos sistemas de injeção, separação e/ou detecção (PRESTES *et al.*, 2009).

Portanto, os pesticidas clorotalonil e captan fortificados nos níveis estudados, extraídos pelo método QuEChERS otimizado neste trabalho e analisados de acordo com o item 5.4, não foram quantificados de acordo com os procedimentos estabelecidos neste trabalho para análise na cenoura.

5.4.6 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

A precisão do método foi avaliada em função da repetibilidade e da precisão intermediária, obtidas pelo RSD das recuperações, sendo que os resultados foram avaliados pelo teste de Grubbs, a fim de verificar os outliers, conforme apresenta a Tabela 11. Apenas difenoconazol e azoxistrobina apresentaram outliers. Pode-se constatar com esse teste, que a réplica 7 do difenoconazol representou um outlier, visto que, utilizando essa réplica no cálculo de RSD, o valor obtido é de 26,7%. Enquanto que, sem essa réplica, o valor baixa para 11,7%, melhorando consideravelmente a precisão. Já a azoxistrobina, apresentou um outlier na primeira replicata. Considerando a replicata no cálculo, o RSD ficou em 26,7%, no entanto, desconsiderando ela no cálculo, o RSD cai para 10,7%. Ambos os compostos obedeceram às normas das agências regulamentadoras, na qual recomendam um RSD menor que 20%.

Tabela 11: Compostos que apresentaram outlier com a avaliação pelo teste de Grubbs.

Composto	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Réplica 4		Réplica 5		Réplica 6		Réplica 7		Com outlier		Com outlier		Com outlier	
	Área	Área/TFF	Área	Área/TFF	Área	Área/TFF	Área	Área/TFF	Área	Área/TFF	Área	Área/TFF	Área	Área/TFF	Média c/PI	Média c/PI	S	S	RSD %	RSD %
Difenoconazol	2084	0,33	1832	0,26	1473	0,27	1656	0,26	1449	0,25	1817	0,32	2756	0,49	0,310	0,281	0,083	0,033	26,7	11,7
Azoxistrobina	3697	0,58	2582	0,37	1901	0,35	2209	0,34	1567	0,27	1804	0,32	2033	0,36	0,369	0,334	0,099	0,036	26,7	10,7
TFF	6369	1	6979	1	5479	1	6432	1	5767	1	5724	1	5681	1		1		0		0

- O número em destaque foi considerado um outlier, segundo o teste de Grubbs.

Os valores de RSD% para os estudos de repetibilidade ficaram na faixa de 4,9 a 16,6%. Esses resultados podem ser visualizados com mais detalhes na Tabela 10 juntamente com os resultados de recuperação.

Já a precisão intermediária foi realizada em diferentes dias em relação ao estudo de repetibilidade e avaliada em um nível de fortificação. Os resultados da recuperação média e o RSD% da precisão intermediária podem ser visualizados na Tabela 12 a seguir.

Tabela 12: Média dos percentuais de recuperação e RSD% da precisão intermediária, obtidos a partir de ensaio de recuperação no nível de fortificação 180 µg Kg⁻¹ para cada agrotóxico.

Agrotóxico	Rec Média (%)	RSD%
Trifluralina	105	7,7
Carbofuran	100	12,9
Clorotalonil*	78	43,3
Pendimetalina	97	9,9
Captan**	387	15,2
Tebuconazol	92	8,8
Piraclostrobina	95	20,0
Difenoconazol	91	15,7
Deltametrina	86	11,8
Azoxistrobina	90	12,0

- foram detectados, porém não atenderam aos parâmetros estipulados no estudo.

* Apresentou sinal muito pequeno, não sendo possível quantificá-lo nessas concentrações.

** O resultado não é reproduzível devido a instabilidade do composto, RSD% alto, curva analítica com pontos dispersos e baixa linearidade.

Os valores obtidos para o estudo da repetibilidade e precisão intermediária dos agrotóxicos determinados em cenoura foram menores que 20% para quase todos os compostos avaliados, com exceção da piraclostrobina que apresentou esse valor.

Assim como já mencionado anteriormente no item 5.5.5 os compostos clorotalonil e captan apresentaram desacordo com os parâmetros estipulados para o percentual de recuperação e/ou o valor do RSD%.

5.4.7 Robustez

A robustez do método foi estimada variando-se diferentes processamentos das amostras de cenoura, pois as mesmas eram adquiridas de diferentes plantações e de diferentes cultivares ao longo de todo o período de experimentação. Para esse estudo as cultivares analisadas foram as do grupo Nantes e do grupo Kuroda.

As diferentes características das cenouras adquiridas, geraram diferentes proporções de amostra e água toda vez que um novo lote de cenouras era processado para as análises.

O aspecto final obtido para a amostra processada com água para homogeneização, foi diferente das amostras sem água, pois não ficou uma pasta e pode ser observado na Figura 29.

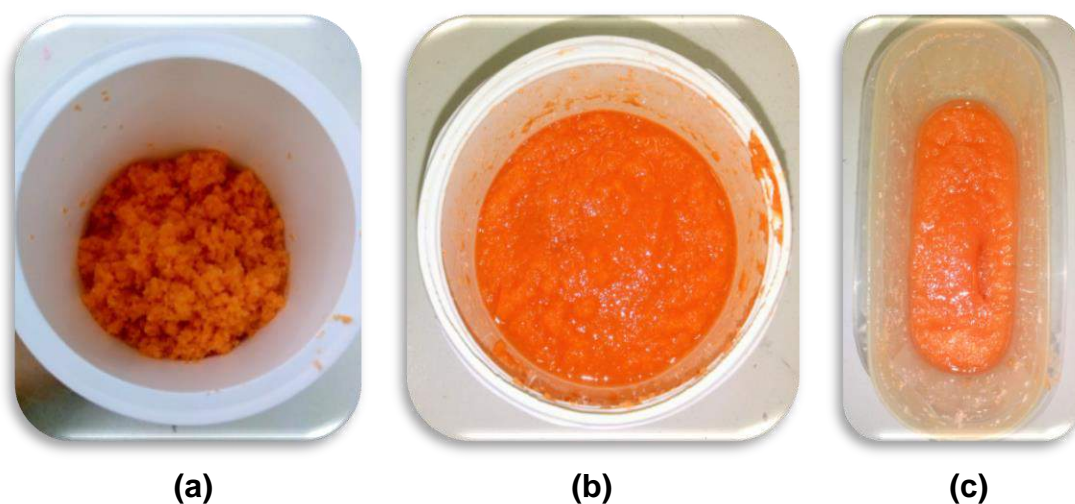


Figura 29: Comparação dos diferentes processamentos das amostras nas diferentes proporções de água testadas: (a) sem o uso de água, (b) 50 mL de água a cada 100 g de cenoura e (c) 80 mL de água a cada 100 g de cenoura.

Com base nisso, foi preparado três diferentes proporções de amostra e água, para comparar as recuperações médias (Figura 30) obtidas conforme o método descrito no item 4.7.1.2, com o *clean up* de 35 mg de florisil e 25 mg de PSA.

O clorotalonil foi desconsiderado nesse estudo, pois já provou não ser adequada a sua quantificação com o método proposto.

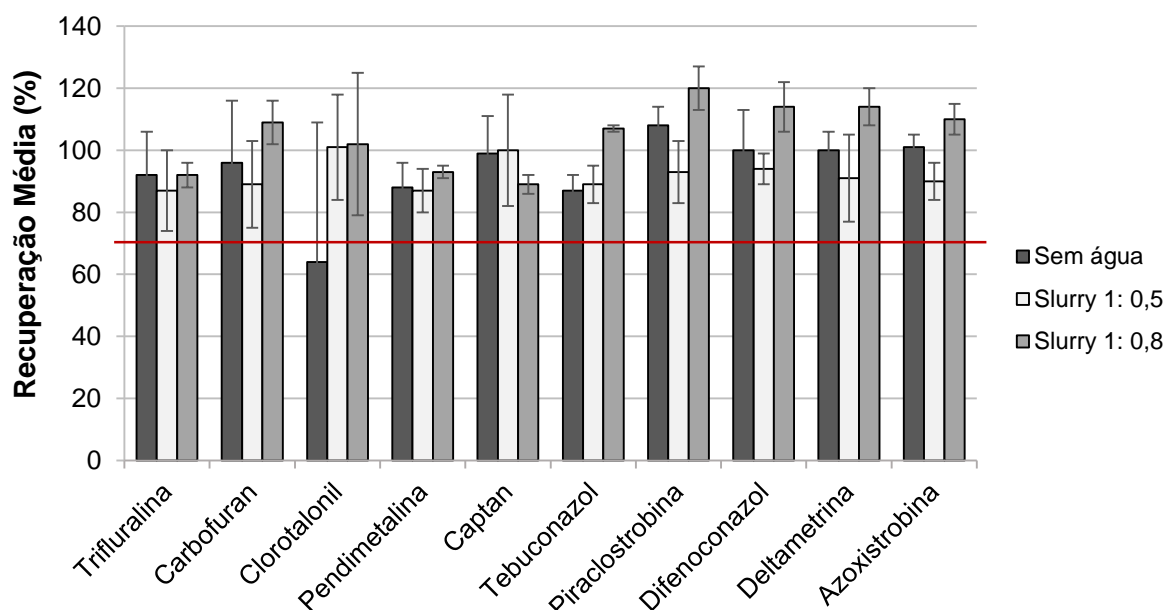


Figura 30: Recuperações médias obtidas para a robustez do método, avaliando as diferentes proporções de água e amostra empregadas, a linha vermelha representa o limite de 70% e as barras de erro o RSD%, n=3.

Analisando a Figura 30 e 31 pode-se observar que todos os compostos apresentaram recuperações médias dentro do limite recomendado de 70 a 120%, bem como RSD menor que 20%. Assegurando, portanto, que as diferentes cultivares, os diferentes equipamentos utilizados e as diferentes proporções de água no processamento das amostras, não interferem nos valores dos resultados de recuperações médias obtidas.

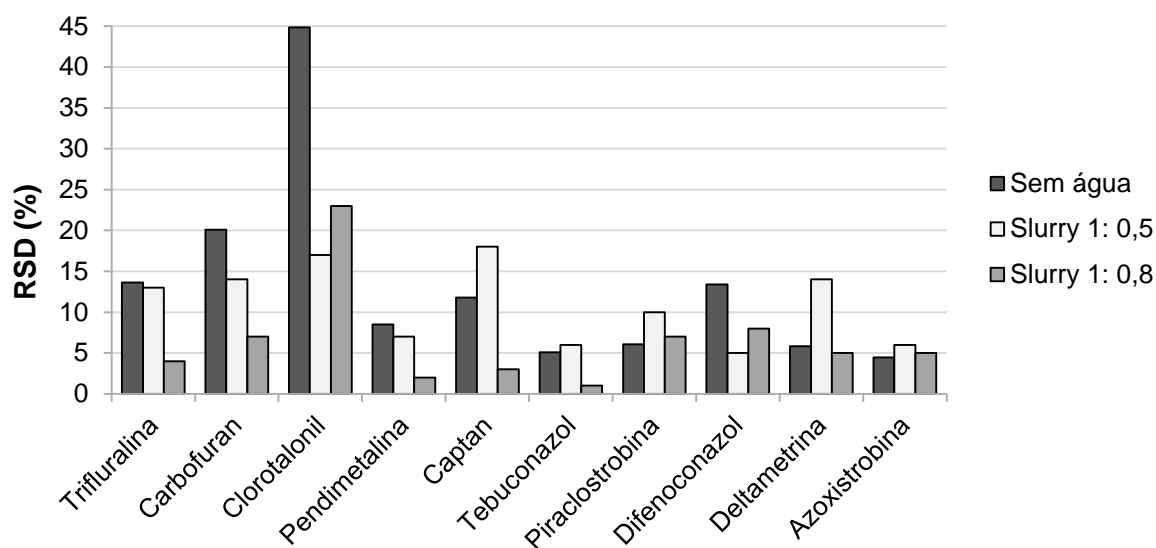


Figura 31: RSD% para o estudo da robustez considerando diferentes proporções de água e cenoura (slurry), n=3.

A partir da análise dos resultados pode-se concluir que a proporção de água no momento da homogeneização na preparação da amostra, deve, portanto, levar em consideração a total homogeneização da mesma. O instrumento a ser utilizado para triturar a amostra pode ser desde o mais simples, como um liquidificador, até aos mais sofisticados como um mixer ou ultra-turrax, ou seja, aquele que estiver disponível no laboratório. Além disso, é importante destacar, que as cultivares não interferem nos resultados, visto que, foi utilizado amostras de diferentes cultivares. Pode-se então, assegurar a robustez do método.

6. CONCLUSÕES

Um método simples empregando QuEChERS foi desenvolvido e validado com êxito para a determinação de resíduos de 10 agrotóxicos (trifluralina, carbofuran, clorotalonil, pendimetalina, captan, tebuconazol, piraclostrobina, difenoconazol, deltametrina e azoxistrobina), de 7 classes diferentes (estrobilurina, dicarboximida, metilcarbamato de benzofuranila, isoftalonitrila, piretróide, triazol e dinitroanilina), abrangendo 5 tipos de aplicações diferentes (fungicidas, inseticidas, nematicida, formicida e herbicida) em amostras de cenoura.

O uso de diferentes adsorventes foi importante para encontrar a condição ótima. Pode-se constatar que, o carvão ativado em pó é um excelente adsorvente, pois remove com excelência os interferentes da matriz, porém se mostrou inadequado na recuperação dos compostos, considerando que esses eram adsorvidos pelo carvão. PSA e florisil demonstraram serem os adsorventes mais indicados para uso na matriz cenoura, pois removeram os interferentes e não os compostos, fornecendo valores de recuperações dentro dos limites aceitáveis e recomendados pelas agências regulamentadoras, como ANVISA, INMETRO e SANCO.

A cenoura se mostrou uma matriz complexa, requerendo o preparo de soluções analíticas em extratos de cenoura isento dos analitos para compensar o efeito matriz.

O método validado apresentou resultados de recuperação na faixa de 72 a 117%, com RDS variando de 4,9 a 16,6%, sendo que, a execução dos procedimentos atendeu a um critério rígido, pois foram realizadas sete replicatas verdadeiras com uma injeção por extrato, ou seja, sete extrações por amostra, representando fielmente a análise de rotina, possível então, de ser reproduzido.

Os valores de LOD e LOQ foram menores que os limites máximos de resíduos vigentes e definidos pela legislação brasileira (ANVISA) para os agrotóxicos autorizados em cenoura, portanto, são considerados adequados e passíveis de serem monitorados.

O método também demonstrou ser robusto frente a variações, como o uso de diferentes equipamentos na preparação da amostra, como o uso de diferentes cultivares, que apresentam diferentes características.

Os compostos captan e clorotalonil não atenderam aos parâmetros estipulados nesse estudo. O clorotalonil apresentou sinal muito pequeno, não sendo possível quantificá-lo. Já o captan não foi reprodutível devido a sua instabilidade, apresentando RSD% alto, curva analítica com pontos dispersos e baixa linearidade.

Pode-se atestar que este trabalho representa um alto grau de relevância social, devido a sua importância e abrangência dentro de uma constante preocupação ambiental, que é a contaminação dos alimentos pelo uso indiscriminado de agrotóxicos.

O método validado nesse estudo, está disponível para análise de monitoramento da presença de agrotóxicos em amostras de cenoura comerciais. Também esta disponível para estudos de registros de produtores orgânicos que queiram certificar a sua produção como orgânica, requerendo o seu próprio método ao invés de utilizar os métodos oficiais. Por essa razão, ele pode ser um futuro aliado no monitoramento de agrotóxicos em cenoura, auxiliando o Estado do Rio Grande do Sul a assegurar um alimento saudável e de forma confiável a seus consumidores.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Aplicar o método em amostras provenientes de produção convencional, com o objetivo de averiguar a presença de agrotóxicos, como também disponibilizá-lo para agricultores que queiram analisar amostras de cenouras, a fim de comprovar a inexistência de agrotóxicos.

8. REFERÊNCIAS

ABAD, F. C.; WINCK, P. R.; SILVA, J. M. D.; CARAMÃO, E. B.; ZINI, C. A. Multiresidue determination of pesticides in carrots using pressurized liquid extraction and gas chromatography with mass spectrometry detector. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 3, p. 461-468, 2010.

ABDULRA'UF, L. B.; TAN, G. H. Chemometric approach to the optimization of HS-SPME/GC-MS for the determination of multiclass pesticide residues in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 177, p. 267–273, 2015.

ANASTASSIADES, M.; TASDELEN, B.; SCHERBAUM, E.; STAJNBAHER, D. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. *Pesticide chemistry: crop protection, public health, environmental safety*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2007.

ANASTASSIADES, M; *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC international**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. 2003. Diário Oficial da União de 02 de junho de 2003. Brasília (Brasil).

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Sistema de informações sobre agrotóxicos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>>. Acessado em abril de 2015.

AOAC International. Official method 2007.01: pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulphate. **AOAC International**; 2007.

CABRERA, L. D. C., MARTINS, M. L., PRIMEL, E. G., PRESTES, O. D., ADAIME, M. B., & ZANELLA, R. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 227-240, 2012.

CAMINO-SÁNCHEZ, F. J., ZAFRA-GÓMEZ, A., RUIZ-GARCÍA, J., BERMÚDEZ-PEINADO, R., BALLESTEROS, O., NAVALON, A., & VÍLCHEZ, J. L. UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 accredited method for the determination of 121 pesticide residues in fruits and vegetables by gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 3, p. 427-440, 2011.

CARNEIRO, F. F. *et al.* Dossiê ABRASCO –Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. **ABRASCO**, 1ª Parte. 98p. Rio de Janeiro, abril de 2012.

CASSIANO, N. M., *et al.* Chromatographic methods validation for analysis of small molecules in biological matrices. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

Ceasa Campinas SP. Disponível em: <<http://www.ceasacampinas.com.br/novo/inicio.asp>>. Acessado em setembro 2013.

CHASIN, A. A. D. M.; NASCIMENTO, E. D. S.; RIBEIRONETO, L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. D.; ANDRAUS, M. H.; SALVADORI, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G. D.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 1998.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química nova**, V. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHOWDHURY, M. A. Z.; *et al.* Detection of the residues of nineteen pesticides in fresh vegetable samples using gas chromatography–mass spectrometry. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 457-465, 2013.

CHRISTENSEN, L. P.; KIRSTEN, B. Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: occurrence, bioactivity and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, V. 41, n. 3, p. 683–693, 7 June 2006.

CHUI, Q. S. H.; BARROS, C. B.; SILVA, T. D. PARÂMETROS E RESULTADOS DE PROGRAMA INTERLABORATORIAL-COMO USÁ-LOS. **Química Nova**, v. 32, n.8, p. 2209-2213, 2009.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora Unicamp, p. 453, 2006.

CORREIA-SÁ, L.; FERNANDES, V. C.; CALHAU, C.; DOMINGUES, V. F.; DELERUE-MATOS, C. Optimization of QuEChERS procedure coupled to GC-ECD for organochlorine pesticide determination in carrot samples. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 2, p. 587-597, 2013.

COSTA, F. P.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in canned and fresh peach. **Food chemistry**, v. 165, p. 587-593, 2014.

DA SILVEIRA, A. A. B.; OKADA, K.; DE CAMPOS, G. M. β -caroteno e astaxantina - características e importância: uma revisão. **Revista Eletrônica Interdisciplinar de Saúde e Educação - RISE ANO I**, v. 1, n. 1 | Jabotão dos Guararapes - PE | 2014.

DE ARAÚJO, P. M. Estudo da desidratação osmótica da cenoura (*Daucus carota* L.) em fatias. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, p.136, 2010.

DE MATTOS, A. L. L.; MARTINS, B. I. Salas. Consumo de fibras alimentares em população adulta. **Rev Saúde Pública**, v. 34, n. 1 p. 50-55, 2000.

DE SOUSA, F. A.; *et al.* Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA. **Food Chemistry**, v. 135, n. 1, p. 179-185, 2012.

DIEZ, C.; TRAAG, W. A.; ZOMMER, P.; MARINERO, P.; ATIENZA, J. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1131, n. 1, p. 11-23, 2006.

Empresa de Pesquisa Agropecuária – Embrapa - Disponível em: < <http://www.cnph.embrapa.br/> >. Acessado em setembro 2013.

European Committee for Standardization. CEN, CEN/TC 275 15662:2008: foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/ partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method. European Union; 2008.

FARIÑA, L. S. C.; RODRIGUES, I. M. M. A.; HENRIQUES, M. H. F.; SARAIVA, R. J. L.; Otimização do rendimento do sumo da cenoura durante o processo produtivo. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. p. 64-81, 2007.

FREITAS, A. F.; MENDES, M. F.; COELHO, G. L. Estudo termodinâmico da adsorção de ácidos carboxílicos em carvão ativado. **Revista Universidade Rural: Série Ciências Exatas e da Terra, Seropédica**, RJ: EDUR, v. 24, n. 1-2, p. 28-42, 2005.

GALLAGHER, M. L. Vitaminas. Krause, alimentos, nutrição & dietoterapia, v. 11, p.72-114, 2005.

GELSOMINO, A.; Petrovicová, B.; Tiburtini, M.; Magnani, E.; Felici, M. Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables by gel permeation chromatography followed by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. **Journal of chromatography a**, v. 782, n. 1, p. 105-122, 1997.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RAVELO-PÉREZ, L. M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á. Insecticides extraction from banana leaves using a modified QuEChERS method. **Food chemistry**, v. 125. n.3, p. 1083-1090. (2011).

Governo do Estado do Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://cultivares.com.br/noticias/index.php?c=2022>>. Acessado em maio 2015.

GUIMARÃES, J. A.; FILHO, M. M.; MOURA, A.P.; CARVALHO, A.D.F. **Reconhecimento e manejo das principais pragas da cenoura** - Comunicado Técnico 82 - ISSN 1414.9850. Outubro, 2012 - Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/paginas/serie_documentos/publicacoes2012/cot_82.pdf>. Acessado em setembro 2013.

HAIŠLOVÁ, J., *et al.* Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 800, n. 2, p. 283-295, 1998.

HAJŠLOVÁ, Jana; ZROSTLIKOVA, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1, p. 181-197, 2003.

HENNION, M. C. Graphitized carbons for solid-phase extraction. **Journal of chromatography A**, v. 885, n. 1, p. 73-95, 2000.

HERCEGOVÁ, A.; DÖMÖTÖROVÁ, M.; MATISOVÁ, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **Journal of chromatography A**, v. 1153, n. 1, p. 54-73, 2007.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, **DOQ-CGCRE-008**, ver.4, 2011.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. D. A.; QUEIROZ, S. C. D. N. D. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global-Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

JOHNSON, Paul D.; RIMMER, Duncan A.; BROWN, Richard H. Adaptation and application of a multi-residue method for the determination of a range of pesticides, including phenoxy acid herbicides in vegetation, used on high-resolution gel permeation chromatographic clean-up and gas chromatographic analysis with mass-selective detection. **Journal of chromatography a**, v. 765, n. 1, p. 3-11, 1997.

KINSELLA, B., *et al.* Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 46: p 7977-8015, 2009.

KMELLÁR, B., FODOR, P., PAREJA, L., FERRER, C., MARTÍNEZ-UROZ, M. A., VALVERDE, A., & FERNANDEZ-ALBA, A. R. Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1215, n. 1, p. 37-50, 2008.

KRUVE, A., *et al.* Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, p. 58-66, 2008.

LACASSIE, E.; Dreyfuss, M. F.; Daguët, J. L.; Vignaud, M.; Marquet, P.; Lachâtre, G. Multiresidue determination of pesticides in apples and pears by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 805, n. 1, p. 319-326, 1998.

LANÇAS, F. M. Validação de métodos cromatográficos de análise. 6ª ed., São Carlos, Editora RiMa, 62p. 2004.

LAWISCH, C. – Diário Regional, julho de 2010. Disponível em: <http://www.diarioregionalrs.com.br/noticias/6822/Geral/Estudo_aponta_para_possivel_contaminacao_em_alimentos_in_natura>. Acessado em maio 2015.

LEHOTAY, S. J.; MAŠTOVSKÁ, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 615-629, 2005.

LESUEUR, C., KNITTL, P., GARTNER, M., MENTLER, A., & FUERHACKER, M. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. **Food Control**, v. 19, n.9, p. 906-914, 2008.

LOPES, C. A.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; CHARCHAR, J. M. 2008. Doenças. In: Cenoura. Sistemas de produção, 5. Embrapa Hortaliças. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acessado em setembro de 2013.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) Manual de garantia da qualidade analítica – resíduos e contaminantes em alimentos. Brasília, 1ª Ed., 2011.

MAPA- plano nacional de controle de resíduos e contaminantes em produtos de origem vegetal. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acessado em setembro 2013.

MARGNI, M., *et al.* Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 93, n.1, p. 379-392, 2002.

National Nutrient Database for Standard Reference – **USDA**. Disponível em: <<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>>. Acessado em setembro 2013.

NGUYEN, T. D., YU, J. E., LEE, D. M., & LEE, G. H. A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry. **Food chemistry**, v. 110, n.1, p. 207-213, 2008.

OSMAN, K. A., *et al.* Estimated daily intake of pesticide residues exposure by vegetables grown in greenhouses in Al-Qassim region, Saudi Arabia. **Food Control**, v. 22, n.6, p. 947-953, 2011.

PAYÁ, P., *et al.* Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 389, n.6, p. 1697-1714, 2007.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. É veneno ou é remédio: agrotóxicos, saúde e ambiente. **FIOCRUZ**, p. 21-41, 2003.

PINHO, G. P., NEVES, A. A., & QUEIROZ, M. E. L. Analysis of pesticide residue in tomato using matrix solid-phase dispersion (MSPD) and gas chromatography. **Química Nova**, v. 32, n.1, p. 92-98, 2009.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 51-64, 2011.

PRESTES, O. D., *et al.* QuEChERS—Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n.6, p. 1620-1634, 2009.

Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) - Relatório de atividades de 2011 e 2012. Brasília, 29 de outubro de 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>>. Acessado em dezembro 2014.

PRZYBYLSKI, C.; HOMMET, F. Avaliação de alguns parâmetros que afetam a análise de pesticidas problemático em cromatografia gasosa-ion-trap espectrometria de massa. **Journal of Chromatography A**, v. 1201, n.1, p. 78-90, 2008.

Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe. Disponível em: <<http://www.quechers.com>. 2011>. Acessado em maio 2015.

QIN, G., *et al.* Pesticide residues determination in China vegetables in 2010-2013 applying gas chromatography with mass spectrometry. **Food Research International**, v., p. 161-167, 2015.

RAHMAN, M. M., EL-ATY, A. A., & SHIM, J. H. Matrix enhancement effect: A blessing or a curse for gas chromatography?—A review. **Analytica chimica acta**, v. 801, p. 14-21, 2013.

RIBANI, M., *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; DELLAVECHIA, P. T.; BITENCOURT, C. Resistência de hortaliças a doenças: alternativas ao uso de agrotóxico. Brasília, DF: EMBRAPA-CNPQ, 1984. Trabalho apresentado no 2º Encontro Brasileiro de Agricultura Alternativa, Rio de Janeiro, 1984.

RESTREPO, A. R.; Ortiz, A. F. G.; Ossa, D. E. H.; Mesa, G. A. P. QuEChERS GC-MS validation and monitoring of pesticide residues in different foods in the tomato classification group. **Food chemistry**, v. 158, p. 153-161, 2014.

SANCO, Commission of the European Communities (2003). Document n° SANCO/12571/2013. Guidance documento on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, 42p, 2013.

SOBHANZADEH, E.; BAKAR, N. K. A.; ABAS, M. R.; NEMATI, K. Sample Preparation Methods for Pesticides Analysis in Food Matrices and Environmental Samples by Chromatography-Based Techniques: A Review. **Journal of Fundamental Sciences**, v. 5, n.2, p. 106-128, 2009.

ŠTAJNBAHER, D.; ZUPANČIČ-KRALJ, L. Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, n.1, p. 185-198, 2003.

The European Commission. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels/index_en.htm>. Acessado em setembro de 2013.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J. Doenças da cenoura: queima das folhas por alternária e cercóspora. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal. **Revista Cultivar** - dez. 2005/jan. 2006 N° 12.

TUZIMSKI, T.; REJCZAK, T. Application of HPLC-DAD after SPE/QuEChERS with ZrO₂-based sorbent in d-SPE clean-up step for pesticide analysis in edible oils. **Food Chemistry**, v. 190, p. 71-79, 2015.

US - Environmental Protection Agency (EPA). Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/food/viewtols.htm>>. Acessado em setembro de 2013.

USP- Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Disponível em: <<http://www.intranet.fcf.usp.br/tabela/index.asp>>. Acessado em agosto de 2015.

VÉKEY, Károly. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, n. 2: p. 227-236, 2001.

VIEIRA, J. V; PESSOA HBSV. 2008. Cultivares. In: Cenoura. Sistemas de produção, 5. Embrapa Hortaliças. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acessado em setembro de 2013.

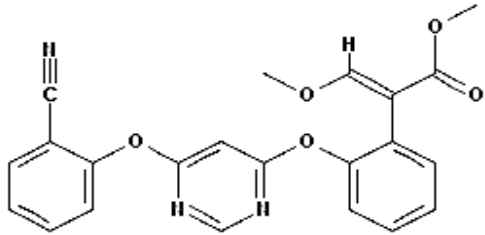
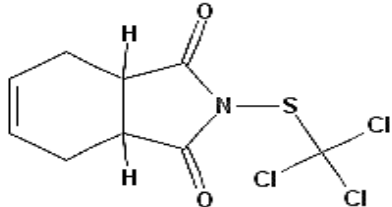
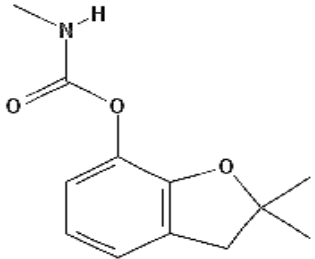
VILELA, N. J.; BORGES, I. O. Embrapa Hortaliças – Circular Técnica 59: Retrospectiva e situação atual da cenoura no Brasil, Brasília, DF, Junho, 2008. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/paginas/serie_documentos/publicacoes/2008/ct_59.pdf>. Acessado em agosto 2013.

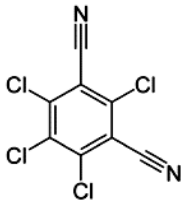
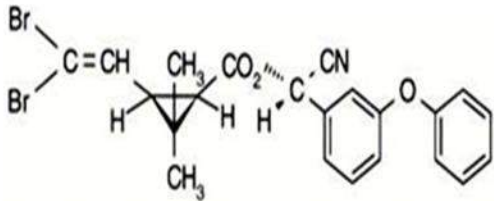
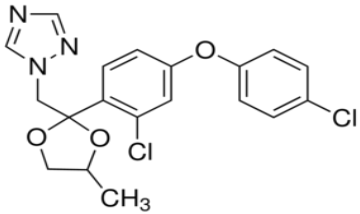
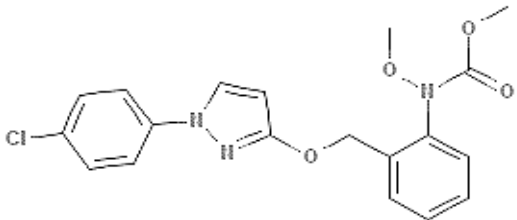
ZHAO, P., WANG, L., ZHOU, L., ZHANG, F., KANG, S., & PAN, C. Multi-walled carbon nanotubes as alternative reversed-dispersive solid phase extraction materials in pesticide multi-residue analysis with QuEChERS method. **Journal of Chromatography A**, v. 1225, p. 17-25, 2012.

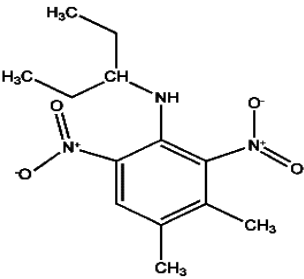
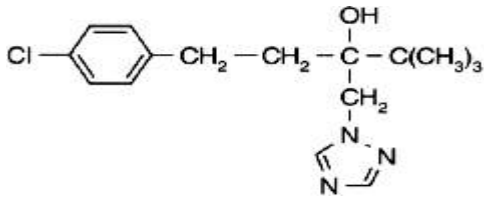
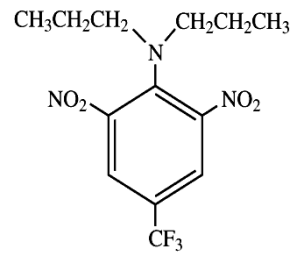
ZHENG, H. B., ZHAO, Q., MO, J. Z., HUANG, Y. Q., LUO, Y. B., YU, Q. W., & FENG, Y. Q. Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method with magnetic graphitized carbon black and primary secondary amine as adsorbent and its application in pesticide residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1300, p. 127-133, 2013.

9. ANEXOS

Anexo A: Identificação e propriedades físico-químicas dos agrotóxicos selecionados para o estudo.

ANALITO	ESTRUTURA	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g mol ⁻¹)	P.E. (°C)	Densidade (g mL ⁻¹)	Log Kow 20°C	Log Koc	Solubilidade em água 20°C (mg L ⁻¹)	Solubilidade em Acetonitrila	Nº CAS
Azoxistrobina		C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	403,40	360	1,33	2,50	2,77	6,7	340 g L ⁻¹	131860-33-8
Captan		C ₉ H ₈ Cl ₃ NO ₂ S	300,61	DAF	1,74	2,80	2,30	5,2	-	133-06-2
Carbofuran		C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221,26	254	1,18	2,32	-	322	140 g Kg ⁻¹	1563-66-2

ANALITO	ESTRUTURA	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g mol ⁻¹)	P.E. (°C)	Densidade (g mL ⁻¹)	Log Kow 20°C	Log Koc	Solubilidade em água 20°C (mg L ⁻¹)	Solubilidade em Acetonitrila	Nº CAS
Clorotalonil		C ₈ Cl ₄ N ₂	265,91	350	1,80	3,05	2,92	0,81	-	1897-45-6
Deltametrina		C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	505,20	DAF	0,55	4,60	7,01	0,0002	-	52918-63-5
Difenoconazol		C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	406,26	101	1,37	4,36	-	15	-	119446-68-3
Piraclostrobina		C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	387,80	DAF	1,28	3,99	3,96	1.9	-	175013-18-0

ANALITO	ESTRUTURA	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g mol ⁻¹)	P.E. (°C)	Densidade (g mL ⁻¹)	Log Kow 20°C	Log Koc	Solubilidade em água 20°C (mg L ⁻¹)	Solubilidade em Acetonitrila	Nº CAS
Pendimetalina		C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	281,31	330	1,17	5,20	4,24	0,33	-	40487-42-1
Tebuconazol		C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	307,82	DAF	1,25	3,70	-	36	-	107534-96-3
Trifluralina		C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄	335,28	DAF	1,36	5,27	4,19	0,221	> 1000 g L ⁻¹	1582-09-08

(-) Não apresentou registro

(DAF) Decompõe-se antes de Ferver