



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica
para determinação de resíduos de agrotóxicos em
hortaliças empregando cromatografia líquida com detector
de arranjo de diodos**

Emanuella Santos Sousa

SAPIENTIA AEDIFICAT

João Pessoa – PB – Brasil

Fevereiro/2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica
para determinação de resíduos de agrotóxicos em
hortaliças empregando cromatografia líquida com detector
de arranjo de diodos**

Emanuella Santos Sousa*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica

Orientador: **Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo**

*Bolsista: CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior



João Pessoa – PB – Brasil

Fevereiro-2016

S725d Sousa, Emanuella Santos.
Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para determinação de resíduos de agrotóxicos em hortaliças empregando cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos / Emanuella Santos Sousa.- João Pessoa, 2016.
100f. : il.
Orientador: Mário César Ugulino de Araújo
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN
1. Química analítica. 2. Hortaliças. 3. Pesticidas.
4. Cromatografia - fase líquida. 5. QuEChERS. 6. Validação.

UFPB/BC

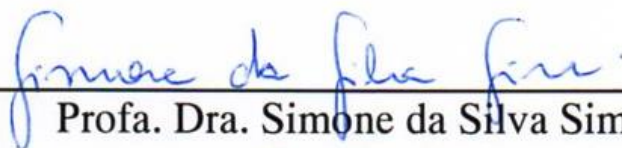
CDU: 543(043)

Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para determinação de resíduos de agrotóxicos em hortaliças empregando cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos.

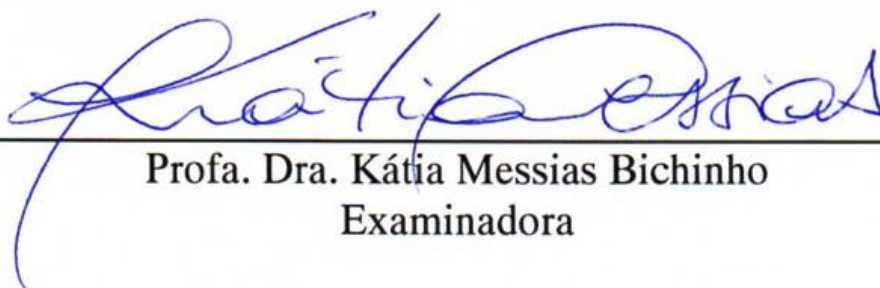
Dissertação de Mestrado apresentada pela aluna Emanuella Santos Sousa e aprovada pela banca examinadora em 29 de fevereiro de 2016.



Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo
Orientador/Presidente



Profa. Dra. Simone da Silva Simões
Examinadora



Profa. Dra. Kátia Messias Bichinho
Examinadora

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

AGRADECIMENTOS

Conhecimentos foram adquiridos e desafios foram superados, mas sozinha não teria sido possível conquistar essa vitória.

Agradeço primeiramente a DEUS, que sempre me guiou nessa trajetória para que eu nunca desistisse.

Aos meus PAIS, José Enoque e Ana Lúcia, que mesmo distantes acreditaram e cuidaram para que eu pudesse ter a esperança de seguir. Agradeço ao apoio, mesmo muito mais distante da minha querida e única irmã Izabella e sobrinho Bruno, exemplos de que não estamos sozinhos nessa caminhada e podemos conquistar o mundo.

Ao meu namorado Martinelly Rodrigues, pelo carinho, companheirismo, paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria dessa vida, assim como a sua família, por sempre me receberem bem, e me fazer sentir parte dela.

Ao meu orientador Mário César Ugulino, pela oportunidade, palavras de apoio e o compartilhamento do seu conhecimento para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos meus amigos do LAQA, Amanda, Mayara, Anabel, Adriano, David, Wellington, Flaviana, Edilene, Valber, Adenilton, Welma, Renato e Maria Ivanda, pelas alegrias e tristezas compartilhadas. Com vocês as pausas para o almoço trouxeram muitas risadas. Assim como aos demais, que mesmo sem muito contato, tornaram a convivência prazerosa.

Ao meu amigo Neto, em especial, pelo ensinamento e paciência, por toda ajuda na construção desse trabalho, sem você seria difícil.

Aos meus tios Meire e Emanuel e primas, Patrícia, Renata e Silvana, que estiveram presentes na minha caminhada aqui em João Pessoa, dando apoio e assistência familiar.

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização desse sonho, o qual realizei através de muito esforço, renúncias e dedicação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XIV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT	XVII
1.INTRODUÇÃO	19
1.1 Caracterização do problema	19
1.2. Objetivos.....	21
1.2.1. Objetivo geral.....	21
1.2.2 Objetivo específico.....	21
2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	23
2.1. Agrotóxicos	23
2.1.1. Classificação química	24
2.1.1.1. Carbendazim- (metil benzimidazol -2- ilcarbamato).....	25
2.1.1.2 Carbaril- (1-naftil etilcarbamato).....	26
2.1.1.3 Carbofuran- (2,3 - dihidro - 2,2 - dimetilbenzofuran - 7 ilmetilcarbamato.....	26
2.1.1.4 Flutriafol- ((RS) -2,4'-difluoro- α -(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil) benzidril álcool).....	27
2.1.1.5 Fuberidazol- (2- (2- furil) benzimidazol).....	27
2.1.1.6 Tiabendazol- (2- (tiazol- 4- il) benzimidazol).....	28
2.1.2 Riscos à saúde no uso de agrotóxicos.....	29
2.2 Alimentos.....	30
2.3 Métodos cromatográficos.....	31
2.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	32
2.3.2 Detectores em cromatografia líquida.....	33
2.3.3 Preparo da amostra.....	34
2.3.3.1 Extração líquido-líquido com dispersão em fase sólida (QuEChERS).....	35
2.4 Calibração univariada.....	37

2.5 Parâmetros de desempenho analítico.....	40
2.5.1 Seletividade.....	40
2.5.2 Linearidade.....	41
2.5.3 Limite de detecção.....	42
2.5.4 Limite de quantificação.....	42
2.5.5 Precisão.....	42
2.5.5.1 Repetibilidade.....	43
2.5.5.2 Precisão intermediária.....	43
2.5.6 Exatidão.....	43
2.5.7 Efeito matriz.....	44
3. METODOLOGIA	47
3.1. Reagentes e soluções.....	47
3.2. Amostra de calibração.....	47
3.3. Otimização do processo de extração	48
3.4. Preparo das amostras	49
3.5. Análise cromatográfica.....	51
3.6 Validação dos métodos analíticos.....	53
3.6.1 Seletividade.....	53
3.6.2 Linearidade.....	53
3.6.3 Limite de detecção e limite de quantificação.....	53
3.6.4 Precisão.....	53
3.6.5 Exatidão.....	54
3.6.6 Efeito matriz.....	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
4.1. Otimização das condições cromatográficas	56
4.2 Otimização do processo de extração.....	59
4.3 Validação dos métodos analíticos.....	63
4.3.1 Seletividade.....	63
4.3.2 Linearidade.....	63
4.3.3 Limite de detecção e limite de quantificação.....	69

4.3.4 Precisão.....	69
4.3.5 Exatidão.....	72
4.3.6 Efeito matriz.....	74
4.4 Aplicação do método desenvolvido nas amostras.....	76
4.4.1 Efeito matriz nas amostras.....	76
4.4.1.1 Carbendazim.....	76
4.4.1.2 Tiabendazol.....	77
4.4.1.3. Fuberidazol.....	79
4.4.1.4 Carbofuran.....	80
4.4.1.5 Carbaril.....	81
4.4.1.6 1- Naftol.....	82
4.4.1.7 Flutriafol.....	83
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
5.1. Conclusões.....	88
5.2 Propostas futuras.....	89
REFERÊNCIAS.....	91
APÊNDICE A.....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fórmula estrutural do carbendazim. Adaptado de [9,10].....	26
Figura 2- Representação da hidólise do carbaril à 1-naftol. Adaptado de [33].....	26
Figura 3- Fórmula estrutural do carbofuran. Adaptado de [9,10].....	27
Figura 4- Fórmula estrutural do flutriafol. Adaptado de [9,10].....	27
Figura 5- Fórmula estrutural do fuberidazol. Adaptado de [32].....	28
Figura 6- Fórmula estrutural do tiabendazol. Adaptado de [9,32].....	28
Figura 7- Nível de contaminação das amostras analisadas no Brasil em 2010 a 2012. Adaptado de [9,10]. Dados obtidos do PARA em 2010 (1), 2011 (2) e 2012 (3).....	31
Figura 8- Fluxograma com a representação das principais técnicas cromatográficas. Adaptado de [41]	32
Figura 9- Representação da microextração líquido-líquido dispersiva. 1- Solução aquosa contendo o analito. 2.- Adição dos solventes extrator e dispersor e posterior homogeneização para a transferência do analito. 3- Centrifugação da solução para a sedimentação da fase de interesse. 4- Retirada da fase sedimentada. Adaptada de [47,49].....	35
Figura 10- Representação das etapas das técnicas de extrações iniciais e as realizadas pela AOAC e União Europeia. Adaptado de [54-57].....	37
Figura 11- Esquema simplificado do procedimento para o preparo das amostras.....	50
Figura 12- a) Sistema produzido para a secagem das amostras com N ₂ . b) Filtro seringa antes e depois da filtração.....	51
Figura 13- a) Cromatógrafo a líquido de alta eficiência; b) Compartimento da coluna; c) Compartimento da bomba quaternária.....	52
Figura 14- Vazões estudadas para otimização da corrida cromatográfica. Em (—), vazão de 1,0 mL min ⁻¹ , em (—), 1,2 mL min ⁻¹ , em (—), 1,5 mL min ⁻¹	56
Figura 15- Cromatograma registrado em 220 nm (—) mostrando a presença do interferente. Em (—), o cromatograma registrado em 300 nm e em (—), o cromatograma registrado em 306 nm.....	57
Figura 16- : Espectro normalizado do interferente (—), Tiabendazol (—) e Fuberidazol (—).....	58

Figura 17- a) Teste de extração. Da esquerda para direita, teste com acetonitrila, metanol e a mistura de acetonitrila/metanol (1:1). b) Extração com DLLME. Da esquerda para direita, extração acetonitrila/CH₂Cl₂, metanol/CH₂Cl₂, e por último, acetona/CH₂Cl₂.....60

Figura 18- Cromatograma de: a) Mistura dos padrões de agrotóxicos. b) Amostra de cenoura fortificada no nível quatro (—) e em (—) amostra de cenoura sem fortificação.....62

Figura 19- Espectros dos padrões em estudo com os comprimentos de onda selecionados. Carbendazim (—), Tiabendazol (—), Fuberidazol (—), Carbofuran (—), Carbaril (—), 1-Naftol (—) e Flutriafol (—). As linhas pontilhadas (----) representam os espectros das fortificações na amostra de cenoura.....63

Figura 20- Curvas analítica obtidas para os sete agrotóxicos.....64

Figura 21- Cromatogramas em comprimentos de 200 nm (—), e 210nm (—).....66

Figura 22- Sobreposição dos cromatogramas que representam as quatro concentrações escolhidas para o teste de precisão e exatidão.....72

Figura 23- Regressões obtidas para o efeito matriz. Em (—) estão as retas para os padrões em solventes, e em colorido, as retas após extração. carbendazim (—), tiabendazol (—), fuberidazol (—), carbofuran (—), carbaril (—), 1-naftol (—) e flutriafol (—)..... 75

Figura 24- Regressões obtidas para o carbendazim nas culturas de alface (—), couve (—), cenoura (—), tomate (—), beterraba (—) e pimentão (—) e em (—) estão os padrões que foram apenas extraídos.....77

Figura 25- Regressões obtidas para o tiabendazol nas culturas de alface (—), couve (—), cenoura (—), tomate (—), beterraba (—) e pimentão (—), em (—) estão os padrões que foram apenas extraídos.....78

Figura 26- Regressões obtidas para o fuberidazol nas culturas de alface (—), couve (—), cenoura (—), tomate (—), beterraba (—) e pimentão (—), em (—) estão os padrões que foram apenas extraídos.....79

Figura 27- Regressões obtidas para o carbofuran nas culturas de alface (—), couve (—), cenoura (—), tomate (—), beterraba (—) e pimentão (—), em (—) estão os padrões que foram apenas extraídos.....80

Figura 28- Regressões obtidas para as culturas de alface (—), couve (—), cenoura (—), beterraba (—), tomate (—) e pimentão (—), em (—) estão os padrões extraídos do carbaril.....82

Figura 29- Regressões obtidas para o teste efeito matriz nas amostras de alface (—), couve (—), cenoura (—), beterraba (—), tomate (—) e pimentão (—). Em (—), estão os padrões nos três níveis de fortificação de 1-naftol.....83

Figura 30- Regressões obtidas para o teste efeito matriz nas amostras de alface (—), couve (—), cenoura (—), beterraba (—), tomate (—) e pimentão (—). Em (—) estão os padrões nos três níveis de fortificação do flutriafol.....84

Figura A1- Cromatograma registrado de 0 à 6,3 minutos (280 nm); 6,3 à 11,6 minutos (300 nm) e 11,6 à 24 minutos (210 nm) das amostras de: a) alface, b) beterraba e c) couve, sem fortificação (—) e com fortificação no nível máximo (—).....99

Figura A2- Cromatograma registrado de 0 à 6,3 minutos (280 nm); 6,3 à 11,6 minutos (300 nm) e 11,6 à 24 minutos (210 nm) das amostras de: a) pimentão, b) tomate, sem fortificação (—) e com fortificação no nível máximo (—).....100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classe dos agrotóxicos em estudo de acordo com a natureza da praga controlada e toxicidade. Adaptada de ANVISA [9, 30,31].	24
Tabela 2- Grupos químicos das três principais classes agrotóxicos. Adaptada de [4,9,30].	25
Tabela 3- Limites máximos de resíduos permitidos para o PARA e o <i>Codex</i> . Adaptada de [10, 32].	29
Tabela 4- Equações para ANOVA. Adaptado de [60].	39
Tabela 5- Concentrações de trabalho definidas para CBZ (carbendazim), TBZ (tiabendazol), FBZ (fuberidazol), CBR (carbaril), CBO (carbofuran), NFT (1-naftol) e FLT (flutriafol).	48
Tabela 6: Níveis de fortificação utilizados para os processos de recuperação e efeito matriz.	50
Tabela 7: Condições do gradiente utilizadas durante as análises cromatográficas.	52
Tabela 8: Desempenho cromatográfico obtido após a otimização da corrida cromatográfica para padrões extraídos com as seguintes concentrações: CBZ, TBZ e FBZ (2,5 mg L ⁻¹), CBO (5,0mg L ⁻¹), CBR (2,0 mg L ⁻¹), NFT (3,0 mg L ⁻¹) e FLT (8,0 mg L ⁻¹).	59
Tabela 9: Resultado da recuperação (porcentagem) de cada analito, por método de extração estudado.	60
Tabela 10: Equações das retas obtidas para cada modelo, desvio padrão, teste T com 20 graus de liberdade e o teste P para o coeficiente linear.	65
Tabela 11: Resultados da ANOVA para CBZ, TBZ, FBZ, CBR, CBO, NFT e FLT. Em vermelho, entre parênteses, estão os graus de liberdade.	68
Tabela 12: Limites de detecção e quantificação obtidos para os agrotóxicos.	69
Tabela 13: Resultados obtidos para a precisão da metodologia através do coeficiente de variação (CV) em porcentagem avaliada pela média das sete repetições nas quatro semanas de estudo.	70
Tabela 14: Valores de precisão encontrados a partir do teste t de Student obtido para as quatro semanas, assim como a precisão interdia.	71
Tabela 15: Resultados obtidos para as médias das recuperações, para os ensaios de exatidão nos quatro níveis de concentração e as médias dos níveis.	73

Tabela 16: Teste t pareado para análise do efeito matriz proveniente do processo de extração.....	74
Tabela 17: Análise estatística para o efeito matriz do carbendazim, concentração encontrada para o analito nas diferentes culturas e recuperação média.....	76
Tabela 18: Análise estatística para o efeito matriz do tiabendazol, concentração encontrada para o analito nas diferentes culturas e a recuperação média.....	78
Tabela 19: Análise estatística para o efeito matriz para o fuberidazol, concentração encontrada para o analito nas diferentes culturas e recuperação média.....	79
Tabela 20: Análise estatística para o efeito matriz para o Carbofuran, concentração encontrada para o analito nas diferentes culturas e recuperação média.....	80
Tabela 21: Valores do teste t e F para o analito carbaril, recuperação média e concentração encontrada em cada amostra	81
Tabela 22: Valores do teste t e F para o analito 1-Naftol, recuperação média e concentração encontrada em cada amostra	83
Tabela 23: Valores do teste t e F para o analito Flutriafol, recuperação média e concentração encontrada em cada amostra	84
Tabela 24: Resumo das concentrações (mg kg^{-1}) encontradas a partir da metodologia desenvolvida e os limites estabelecidos para os órgãos normalizadores como o PARA e Codex.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA – Análise de variância (do inglês, *Analysys of variance*)
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AOAC- Association of Official Analytical Chemists
- ASTM- Society for Testing and Materials
- C18- Octadecil (do inglês, *Octadecyl*)
- C8- Octil (do inglês, *Octyl*)
- CBO- Carbofuran
- CBR- Carbaril
- CBZ- Carbendazim
- CG- Cromatografia a Gás
- CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CV- Coeficiente de variação
- DAD- Detector de Arranjo de Diodo (do inglês, *Diode array detector*).
- DL50- Dose Letal 50
- DLLME- Microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês, *dipersive liquid-liquid extraction*).
- D-SPE- extração em fase sólida dispersiva (do inglês Dispersive Solid Phase Extraction)
- FAO- Fundação da Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*)
- FBZ- Fuberidazol
- FDA- Food and Drug Administration
- FLT- Flutriafol
- FLU- Detector de Fluorescência
- HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, *High performance liquid chromatography*).
- INCA- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
- INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade e Tecnologia
- ISO- International Standard Organization
- LC- Cromatografia a Líquido
- LLE- Extração líquido-líquido (do inglês, *liquid-liquid extraction*)

LMR- Limites Máximos de Resíduos

LOD- Limite de detecção (do inglês, *limit of detection*)

LOQ- limite de quantificação (do inglês *limit of quantification*)

LPME- microextração em fase líquida (do inglês, *Liquid-phase microextraction*)

NA- Não autorizado

NFT- 1-Naftol

PARA- Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos.

PSA- Amina primária e secundária (do inglês, *primary secondary amine*).

QuEChERS- Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro (do inglês, *quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*).

RSD- Desvio padrão relativo.

SPE- Extração em fase sólida (do inglês *Solid phase extration*).

TBZ-Tiabendazol

RESUMO

É crescente no mundo o uso de agrotóxicos e principalmente no Brasil, que apresenta um consumo de aproximadamente 5,2 kg/habitante. Por esse motivo, órgãos nacionais e internacionais (Codex, FAO e ANVISA) monitoram e estabelecem critérios de avaliação para o controle da qualidade dos alimentos, regulamentando os limites máximos de resíduos (LMRs), restringindo e proibindo o uso desses produtos que podem causar efeitos nocivos à saúde e ao meio ambiente. A maioria dos métodos utilizados para quantificação de pesticidas em alimentos são realizados por cromatografia em fase líquida ou a gás, empregando detector de massa, fluorescência ou arranjo de diodo. Neste trabalho é proposta uma metodologia para quantificação de sete pesticidas (carbendazim, tiabendazol, fuberidazol, carbofuran, flutriafol, carbaril e seu produto de degradação 1-naftol) em hortaliças utilizando extração QuEChERS e cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos. No processo cromatográfico foi empregado a eluição gradiente usando 0,014 mM de ácido fosfórico (eluente A) e metanol (eluente B): 40% de metanol por 3,5 minutos atingindo a proporção de 55% de metanol aos 22 minutos, com vazão de 1 mL min⁻¹ e uma temperatura de 35°C. Estes parâmetros cromatográficos, bem como modelos de calibração, foram elaborados, otimizados e validados visando uma análise livre de interferências nas amostras para atingir os LMR's estabelecidos pelos órgãos normalizadores nacionais e internacionais (INMETRO, ANVISA, EUROCHEM, FAO e Codex). Foram quantificados 0,21 mg kg⁻¹ de carbendazim e 0,31 mg kg⁻¹ de carbofuran na amostra de couve; 0,12 mg kg⁻¹ de flutriafol na amostra de beterraba; 0,05 mg kg⁻¹ de fuberidazol e flutriafol na amostra de tomate e 0,24 mg kg⁻¹ de carbendazim na amostra de pimentão. É importante ressaltar que, para as amostras quantificadas, a ANVISA permite apenas o uso de flutriafol em tomate, com limite máximo permitido de 0,1 mg kg⁻¹ e para as demais amostras não há autorização para o uso desses agrotóxicos no combate às pragas nas culturas dessas hortaliças.

Palavras chave: hortaliças, pesticidas, cromatografia em fase líquida, QuEChERS, validação.

ABSTRACT

The use of pesticide is increasing worldwide especially in Brazil, with a consumption of approximately 5.2 kg/inhabitant. For this reason, national and international regulatory agencies (Codex, FAO and ANVISA) monitor and establish assessments criteria for the quality control of food, regulating the maximum residue limits (MRLs), restricting and prohibiting the use of these products that causes harmful effects to health and the environment. The majority of the methods uses liquid or gas chromatography with mass detector, fluorescence and/or diode array for quantification of pesticides in foods. This paper proposes a methodology for quantifying seven pesticides (carbendazim, thiabendazole, fuberidazole, carbofuran, flutriafol, carbaryl and its degradation product 1-naphthol) in vegetables using QuEChERS extraction, without clean up step, and liquid chromatography with diode array detection. In the chromatographic procedure it was employed a gradient elution of 0.014M phosphoric acid (eluent A) and methanol (eluent B): 40% B for 3.5 minutes reaching a ratio of 55% B at 22 minutes with a flow rate of 1 mL.min⁻¹ and a temperature of 35°C. These chromatographic parameters and calibration models were developed, optimized and validated aiming an analysis free of interference and to achieve the MRLs established by the national and international standard-setting organizations (INMETRO, ANVISA, EUROCHEM, FAO and Codex). It was found 0.21 mg kg⁻¹ carbendazim and 0.31 mg kg⁻¹ carbofuran in cabbage sample; 0.12 mg kg⁻¹ in beet flutriafol; 0.05 mg kg⁻¹, fuberidazole and flutriafol in tomato and 0.24 mg kg⁻¹ carbendazim in green paprika. It is important to highlight, that ANVISA allows only the use of flutriafol in tomato, with maximum permitted limit of 0.1 mg kg⁻¹ and for the other samples there is no authorization for the use of these pesticides to combat pests on vegetables.

Keywords: vegetables, pesticides, Liquid chromatography, QuEChERS, validation.



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização do problema

O uso de agrotóxicos na agricultura tem se tornado uma prática constante mundialmente, isso vem ocorrendo a fim de atender a grande demanda e oferta de alimentos, principalmente de frutas e legumes [1-4]. A utilização de produtos químicos de baixo custo, que aumentem a produtividade agrícola e acentuem as características dos alimentos, vem chamando a atenção de instituições governamentais devido ao seu uso inadequado e contínuo, ocasionando danos à saúde humana e ao meio ambiente [1-4].

A facilidade de obtenção de substâncias químicas para o controle de micro-organismos patogênicos, assim como as diversas formas de aplicações e a falta de critérios técnicos adequados sobre o manuseio, pode tornar-se uma fonte de contaminação, pois são usados durante todo o período do plantio e também na pós-colheita, para garantir um melhor armazenamento [5].

Deste modo, organizações internacionais como a Comissão Européia, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) e a Food and Drug Administration (FDA) estabelecem critérios de avaliações para o controle de qualidade dos alimentos em relação a presença e quantidade de agrotóxicos [6-8].

No Brasil, o controle desses agrotóxicos só teve início em 2001 através do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com intuito de avaliar a qualidade dos alimentos naturais comercializados no varejo, contribuindo para a segurança alimentar, através do monitoramento dos limites máximos de resíduos (LMR) dos agrotóxicos [9-11].

Dentre as centenas de agrotóxicos produzidos e comercializados, alguns foram proibidos ou restringidos mundialmente, devido aos seus efeitos nocivos à saúde e ao meio ambiente [12]. Uma importante etapa para a regulamentação destas substâncias foi a Convenção de Estocolmo realizada em 2001. Hoje cerca de 164 países aderiram ao protocolo visando a eliminação de substâncias orgânicas que são classificadas como persistentes [13].

A regulamentação desses agrotóxicos é realizada segundo o grupo químico e quanto à natureza da praga a ser controlada. Dessa forma, estudos estão sendo

realizados para o controle de pesticidas em diversas culturas, não só em relação as altas concentrações, mas também em relação a sua efetividade no tratamento da praga. [1,3,14,14-16].

Segundo a literatura, os agrotóxicos, carbaril (1-naftil metilcarbamato), carbendazim (metil benzimidazol-2-ilcarbamato), carbofuran (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-ilmetilcarbamato), flutrialfol ((RS) -2,4'-difluoro-a- (1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil) benzidril álcool), fuberidazol (2- (2-furanil) -1H benzidazol), tiabendazol (2-(Tiazol-4-il benzimidazol), e 1-naftol (Naftalen-1-ol) são utilizadas em diversas culturas, com propostas analíticas diferentes [2,16-25].

Para a análise destes pesticidas em matrizes de vegetais, verduras e legumes, geralmente aplica-se a cromatografia a líquido (LC) ou a gás (CG), acoplada a um detector de massa (MS) [16-19], detector de arranjo de diodo (DAD) [2,20,21]. fluorescência (FLU) [22] ou captura de elétrons [23]. Outras metodologias analíticas são estudadas como a detecção eletroquímica com biossensores [24] e eletroforese capilar [25].

1.2 Objetivo

1.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar uma metodologia analítica para a quantificação de sete pesticidas (carbendazim, tiabendazol, fuberidazol, carbofuran, flutriafol, Carbaril e seu produto de degradação 1-Naftol) em hortaliças utilizando extração QuEChERS e cromatografia a líquido com detecção por arranjo de diodos.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Validar os modelos de calibração elaborados de acordo com os órgãos normalizadores nacionais e internacionais (INMETRO, ANVISA, EUROCHEM);
- Atingir limites de quantificação iguais ou menores ao limite máximo estabelecido pelos órgãos de monitoramento (ANVISA, FAO e *Codex Alimentarius*);
- Avaliar a eficiência da amostragem na extração QuEChERS, reduzindo a quantidade de solvente;
- Avaliar a presença de efeito de matriz e a seletividade da metodologia proposta.
- Avaliar o desempenho do modelo na predição de agrotóxicos nas amostras de pimentão, tomate, couve, alface, beterraba e cenoura;
- Avaliar a presença de pesticidas não permitidos nas hortaliças.



FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Agrotóxicos

Os agrotóxicos, comumente chamados de pesticidas, são utilizados para o combate a piolhos, insetos, ervas daninhas desde a Grécia antiga, oriundos de compostos inorgânicos naturais e derivados de origem vegetal, que tinham o poder de combater as pragas através do odor que exalavam [26-27]. A partir de 1940, houve o crescimento na produção e utilização de agrotóxicos sintéticos, em destaque para o dicloro-difenil-tricloro-etano (DDT), que era produzido para atender a variabilidade do cultivo de alimentos [26-27].

A partir da década de 1950 o Brasil passou a ter novos recursos tecnológicos passando a explorar ainda mais esses produtos agrícolas com finalidade de controlar as doenças e aumentar a produção agrícola [13].

Segundo a Lei Federal nº 7.802, Artigo 2, Inciso I, que trata sobre essa definição no país, diz que:

“Agrotóxicos e afins são os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso no setor de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbano, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento” [28].

A mesma Lei também utiliza um critério de toxicidade desses produtos, relacionados à dose letal 50 (DL50), que considera a quantidade de substância tóxica que produz uma mortalidade de 50% dos animais de prova, em condições controladas por um tempo de 24 horas [28].

A Legislação Federal regulamenta ainda, que os rótulos dos produtos identifiquem, através de uma faixa de cor, que varia entre o vermelho, amarelo, azul e verde, a intensidade de toxicidade [29]. A [Tabela 1](#) mostra a classificação dos agrotóxicos com relação a toxicidade e a cor de identificação dos rótulos.

Essas substâncias devem ser utilizadas de acordo com a classe funcional para cada propriedade metabólica específica dos organismos.

Tabela 1: Classe dos agrotóxicos em estudo de acordo com a natureza da praga controlada e toxicidade. Adaptada de ANVISA [9, 30,31].

Agrotóxico	Classe funcional	Organismo alvo	Toxicidade DL50 (mg kg ⁻¹ vivo)
Carbendazim	Fungicida	Fungos	Classe III 50 - 500 mg kg ⁻¹
Carbaril	Inseticida	Insetos	Classe II 5 - 50 mg kg ⁻¹
Carbofuran	Inseticida, cupinicida, caricida e nematicida	Ácaros, insetos, cupins, nematoides	Classe I < 5 mg kg ⁻¹
Flutriafol	Fungicida	Fungos	Classe III 50 - 500 mg kg ⁻¹
Fuberidazol	Fungicida	Fungos	Classe III 50 - 500 mg kg ⁻¹
Tiabendazol	Fungicida	Fungos	Classe IV 500 - 5000 mg kg ⁻¹
1-Naftol	Metabólito- (produto de degradação do Carbaril)		

Outros grupos importantes no combate a pragas e microorganismos compreendem:

- a) Raticidas (dicumarínicos): utilizados no combate a roedores;
- b) Molusquicidas: ação de combate a moluscos, basicamente contra o caramujo da esquistossomose;
- c) Bactericidas: ação no combate às bactérias;
- d) Algicida: utilizado para organismos como algas;
- e) Avicida: combate a ação dos pássaros

2.1.1 Classificação Química

Os agrotóxicos são agrupados em substâncias de classes orgânicas e inorgânicas, entre as que possuem estruturas moleculares semelhantes e de acordo com as propriedades metabólicas. As três maiores classes funcionais são fungicidas,

inseticidas e herbicidas [30-31]. A [Tabela 2](#) apresenta os principais grupos químicos no qual esses três principais grupos estão inseridos.

Tabela 2: Grupos químicos das três principais classes dos agrotóxicos. Adaptada de [4,9,30].

Classe	Grupos Químicos
Inseticidas	Organoclorados
	Organofosforados
	Carbamatos
	Piretróides sintético
Herbicidas	Dinitrofenóis e pentaclorofenol
	Fenoxiacéticos
	Dipiridilos
Fungicidas	Ditiocarbamatos
	Fentalamidas
	Triazóis

Outros agrotóxicos podem ainda ser classificados em grupos químicos, como hexaclorobenzeno, difenóis, trifenil, benzimidazol, cloroacetamidas, dinitroanilinas. [30]

Os analitos em estudo, foram classificados quanto ao grupo químico e a modalidade de emprego no uso agrícola.

2.1.1.1 Carbendazim-(metil benzimidazol-2-ilcarbamato)

É um fungicida altamente persistente, pertence ao grupo químico benzimidazol, usado para o controle de doenças em frutas, grãos e vegetais [10]. Atualmente está registrado pela ANVISA com aplicações foliar em culturas de algodão, citros, feijão, maçã, soja e trigo e na utilização em sementes de algodão, arroz, feijão, milho e soja [10].

Para o *Codex Alimentarius*, código internacional de alimentos [32], essa mesma substância pode ser usada em 48 culturas de grãos, frutas e vegetais, com LMRs definidos para cada uma.

A aplicação desse agrotóxico nas hortaliças estudadas não é permitida de acordo com os órgãos normalizadores, no entanto, de acordo com os relatórios emitidos pelo PARA é possível quantificar esse analito em alimentos comercializados [10]. A [Figura 1](#) apresenta a fórmula estrutural do carbendazim.

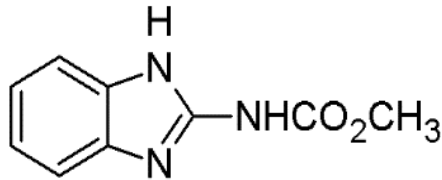


Figura 1: Fórmula estrutural do carbendazim. Adaptado de [9,10].

2.1.1.2 Carbaril-(1-naftil metilcarbamato)

É um inseticida pertencente ao grupo químico dos carbamatos, com estabilidade química em condições ácidas, mas sofre um processo de hidrólise em pH alcalino, temperaturas elevadas ou fotólise, dando origem ao 1- naftol. [33]. A [Figura 2](#) mostra a hidrólise do Carbaril à 1- naftol.

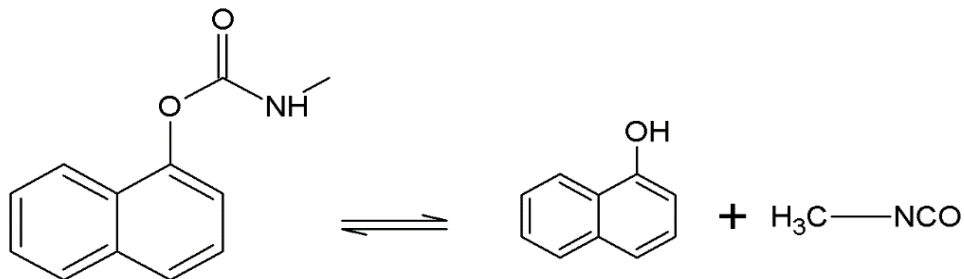


Figura 2: Representação da hidrólise do carbaril à 1- naftol. Adaptado de [33].

É utilizado com aplicação foliar em culturas de abacaxi, abóbora, algodão, alho, banana, batata, cebola, couve-flor, feijão, maçã, pastagem, pepino, repolho e tomate [10].

2.1.1.3 Carbofuran-(2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7- ilmetilcarbamato)

Pertence à classe funcional de inseticidas e grupo químico metilcarbamato de benzofuranila [9,10]. Está registrado no Codex a utilização em diversas culturas, desde grãos de café, milho, carnes, tubérculos e frutas [32].

Para a ANVISA, sua aplicação é feita em solo nas culturas de algodão, amendoim, arroz, banana, batata, café, cana-de-açúcar, cenoura, feijão, fumo, milho, repolho, tomate e trigo [9]. A [Figura 3](#) apresenta a fórmula estrutural do carbofuran.

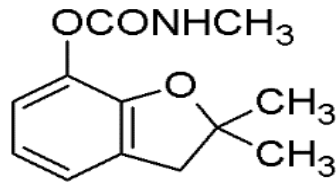


Figura 3: Fórmula estrutural do carbofuran. Adaptado de [9,10].

2.1.1.4 Flutriafol-((*RS*)-2,4'-difluoro- α -(1*H*-1,2,4-triazol-1-ilmetil) benzidril álcool).

Utilizado para o combate a fungos, é um agente pertencente ao grupo químico do triazol, com muitas modalidades de aplicação no Brasil. Segundo ANVISA sua aplicação pode ser realizada em culturas de banana, batata, café, cana de açúcar, soja, trigo, feijão, entre outras aplicações que também podem ser vistas no código alimentar internacional [9].

É importante observar que os LMR's permitidos não são os mesmos para o PARA e o *Codex*, devido a estudos de restrições e refinamento na avaliação de risco, podendo ser modificado de acordo com a utilização, exposição, efeitos adversos, entre outras causas. A fórmula estrutural do flutriafol está representado na [Figura 4](#).

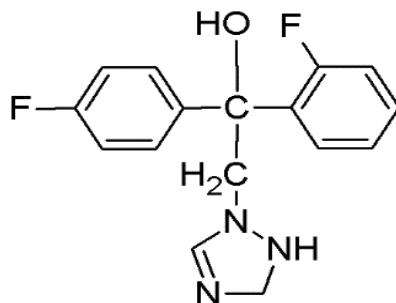


Figura 4: Fórmula estrutural do flutriafol. Adaptado de [9,10].

2.1.1.5 Fuberidazol- (2- (2- furanil)-1*H* benzimidazol)

Pesticida que atua no combate a fungos, pertencente ao grupo dos compostos de benzimidazol, é utilizado no tratamento de sementes para o cultivo de cereais, inibindo a mitose dos fungos, atuando no controle de *Fusarium ssp*, um fungo que está presente no solo e contamina os vegetais, não sendo autorizada a utilização desse produto no Brasil [34,35].

Mesmo não havendo autorização, ainda são registradas ocorrências da utilização desse agrotóxico nos relatórios emitidos pelo PARA [10]. A Figura 5 apresenta a fórmula estrutural do fuberidazol.

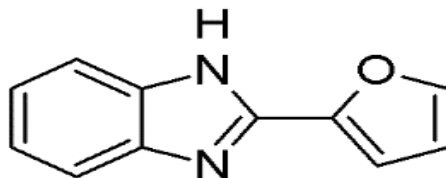


Figura 5: Fórmula estrutural do fuberidazol. Adaptado de [32].

2.1.1.6 Tiabendazol- (2- (tiazol- 4- il) benzimidazol).

Fungicida sistêmico com ações de proteção e curativa, possui diversas modalidades de emprego, seja foliar em abacaxi, banana, citros, mamão, pimentão, em sementes de arroz, tubérculos, feijão, girassol ou no pós colheita, em culturas de abacate, mamão, manga, melão, além de outros cultivos [9,34].

No *Codex Alimentarius* possui registro para aplicação em 15 culturas, sejam elas, frutas, vegetais, e produtos de origem animal [32]. A Figura 6 mostra a fórmula estrutural do tiabendazol.

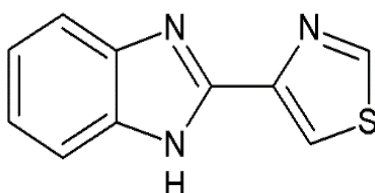


Figura 6: Fórmula estrutural do tiabendazol. Adaptado de [9,32].

Na Tabela 3 estão listados resumidamente os agrotóxicos autorizados para as culturas em estudo, assim como seus níveis de concentração permitido por organizações nacionais, como o PARA e pela as internacionais, como o *Codex* e a Comissão Europeia [10,32,6]. A utilização desses pesticidas é avaliada e permitida de acordo com os efeitos adversos, exposição dietética e ocupacional, podendo ou não sofrer alterações mediante a coleta e análise dos dados.

Tabela 3: Limites máximos de resíduos permitidos para o PARA e o Codex. Adaptada de [10, 32].

Vegetais	PARA	CODEX
Pimentão	Tiabendazol (2 mg kg ⁻¹)	Carbaril (5mg Kg ⁻¹)
		Flutriafol (1mg Kg ⁻¹)
Alface	NA	Carbendazim (5 mg Kg ⁻¹)
		Carbofuran (5mg Kg ⁻¹)
Cenoura	Carbofuran (0,5 mg Kg ⁻¹)	Carbaril (0,2 mg Kg ⁻¹)
		Carbofuran (0,5 m Kg ⁻¹)
Beterraba	NA	Carbendazim (0,1 mg Kg ⁻¹)
		Carbofuran (0,1 mg ⁻¹)
Couve	NA	NA
Tomate	Carbendazim (0,2 mg kg ⁻¹)	Carbendazim (0,5 mg Kg ⁻¹)
	Carbofuran (0,1 mg Kg ⁻¹)	Carbofuran (0,5 mg Kg ⁻¹)
	Carbaril (0,1 mg Kg ⁻¹)	Carbaril (5 mg Kg ⁻¹)
	Flutriafol (0,1 mg Kg ⁻¹)	

A Comissão europeia, através do um regulamento (CE) N^o 396/2005 do parlamento europeu e do conselho, fixa que os teores máximos de resíduos de pesticidas sobre produtos de origem vegetal, incluindo frutas e hortaliças, seja de 0,01 mg Kg⁻¹ [6].

2.1.2 Riscos à saúde no uso de agrotóxicos.

Como visto anteriormente, os agrotóxicos são substâncias químicas, ou produtos biológicos, que possuem objetivos de inibir, combater e dificultar o desenvolvimento de microrganismos patogênicos indesejáveis [12,30]. Assim como atuam em processos vitais, há a necessidade de pesquisas que investiguem os impactos do seu uso com relação à exposição ocupacional e também quanto à carga química que os alimentos sofrem.

Entre as causas de riscos à saúde referentes ao uso de agrotóxicos, a maioria está relacionada a exposição e ao descumprimento das normas de segurança para sua aplicação [36-38].

Em 2014 o Brasil consumiu em média 5,2 kg de agrotóxicos por habitante, o que o torna o maior consumidor desses insumos. Por isso órgãos nacionais estão pesquisando e alertando sobre a utilização demasiada desses agrotóxicos [38].

Em abril de 2015, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), alertou sobre os riscos à saúde que a exposição crônica a esses praguicidas em alimentos naturais pode causar. Espasmos, vômitos, diarreias, infertilidade, impotência e o desenvolvimento do câncer, são os problemas oriundos dessa exposição [39].

2.2 Alimentos

Uma boa saúde depende da alimentação, por isso é importante saber a origem dos alimentos e a qualidade biológica, que é influenciada pela maneira como os alimentos são produzidos [40]. Na maioria das vezes não sabemos a procedência dos alimentos, nem as características físicas, sensoriais, biológicas e químicas, que influenciam na apreciação do alimento em diversas formas [40].

As hortaliças são plantas herbáceas cultivadas em hortas, sendo ela orgânica ou não, dos quais algumas partes são utilizadas como alimento em forma natural [40]. São popularmente conhecidas como verduras e legumes, mas possuem diferença em sua classificação botânica. São divididas em: folhas, sementes, tubérculos e raízes; bulbos, flores, frutos e caule. [40]

Para esse trabalho foram selecionadas hortaliças com diferentes classificações botânicas, onde a aplicação de agrotóxico varia de acordo com o modo genérico das partes comestíveis. A beterraba e a cenoura, que podem ser classificados como raízes, couve e alface, que são consideradas verduras, e dois frutos, pimentão e tomate, classificados como legumes. Essas hortaliças são as mais contaminadas com agrotóxicos não autorizados para seu cultivo ou com ingredientes com LMR acima do permitido para a cultura [11]. A [Figura 7](#) mostra o nível de contaminação dos vegetais em estudo, no relatório do PARA de 2010 a 2012.

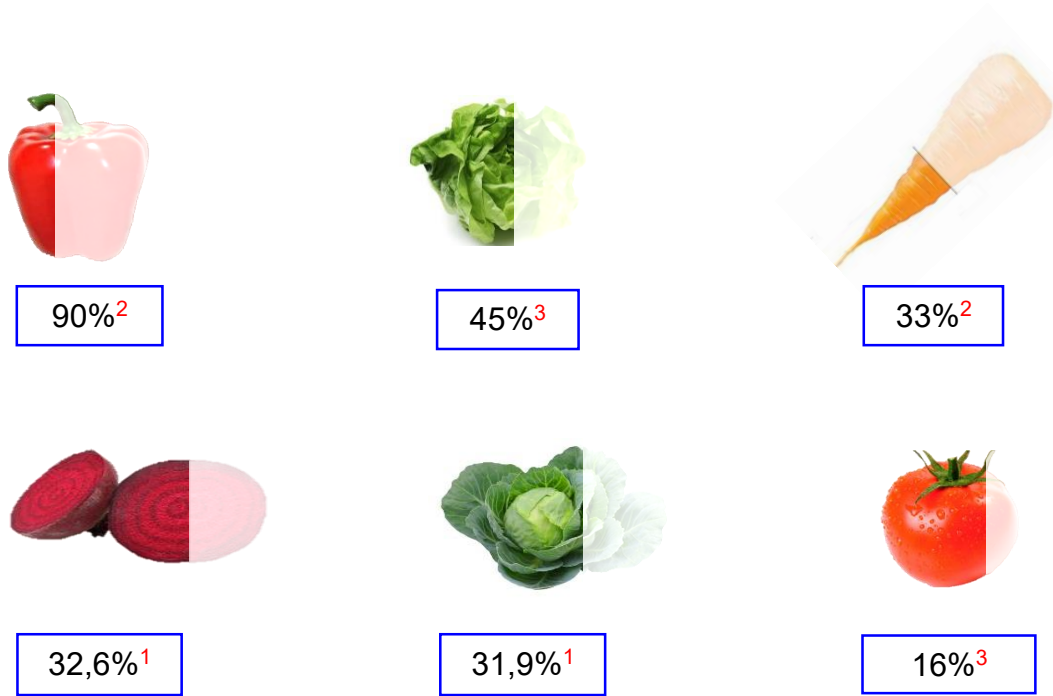


Figura 7: Nível de contaminação das amostras analisadas no Brasil em 2010 a 2012. Adaptado de [9,10]. Dados obtidos do PARA em 2010(1), 2011(2) e 2012(3).

Os alimentos a serem monitorados no PARA são escolhidos de acordo com a Pesquisa de Orçamento Familiar e de acordo com a incidência do uso de agrotóxicos nas culturas, com isso, as avaliações dos resultados subsidiam os órgãos normalizadores a decidir sobre as restrições desses ingredientes ativos [9,10]. Por esse motivo, a porcentagem dos alimentos contaminados mostrado na Figura 7, foram avaliados entre os anos de 2010 a 2012.

Para identificação e quantificação desses resíduos em matrizes alimentares, geralmente é utilizada uma das técnicas mais bem difundidas e aplicadas na Química Analítica, a cromatografia [2,16-23].

2.3 Métodos Cromatográficos

A cromatografia é um processo físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, que são distribuídos entre as fases móvel e estacionária. Existem mecanismos para que a separação ocorra, podendo ser ele físico, químico ou mecânico.

Os principais processos de separação são de adsorção, partição, troca iônica, exclusão, bioafinidade, gasoso, entre outras técnicas que diferenciam em sua fase móvel. Esses processos foram evoluindo, afim de obter melhores resultados.

É possível classificar os principais métodos cromatográficos, quanto à forma física, sejam eles com fases estacionárias ou móveis, líquidas, sólidas ou gasosas [41]. A Figura 8 representa em fluxograma as principais técnicas cromatográficas.

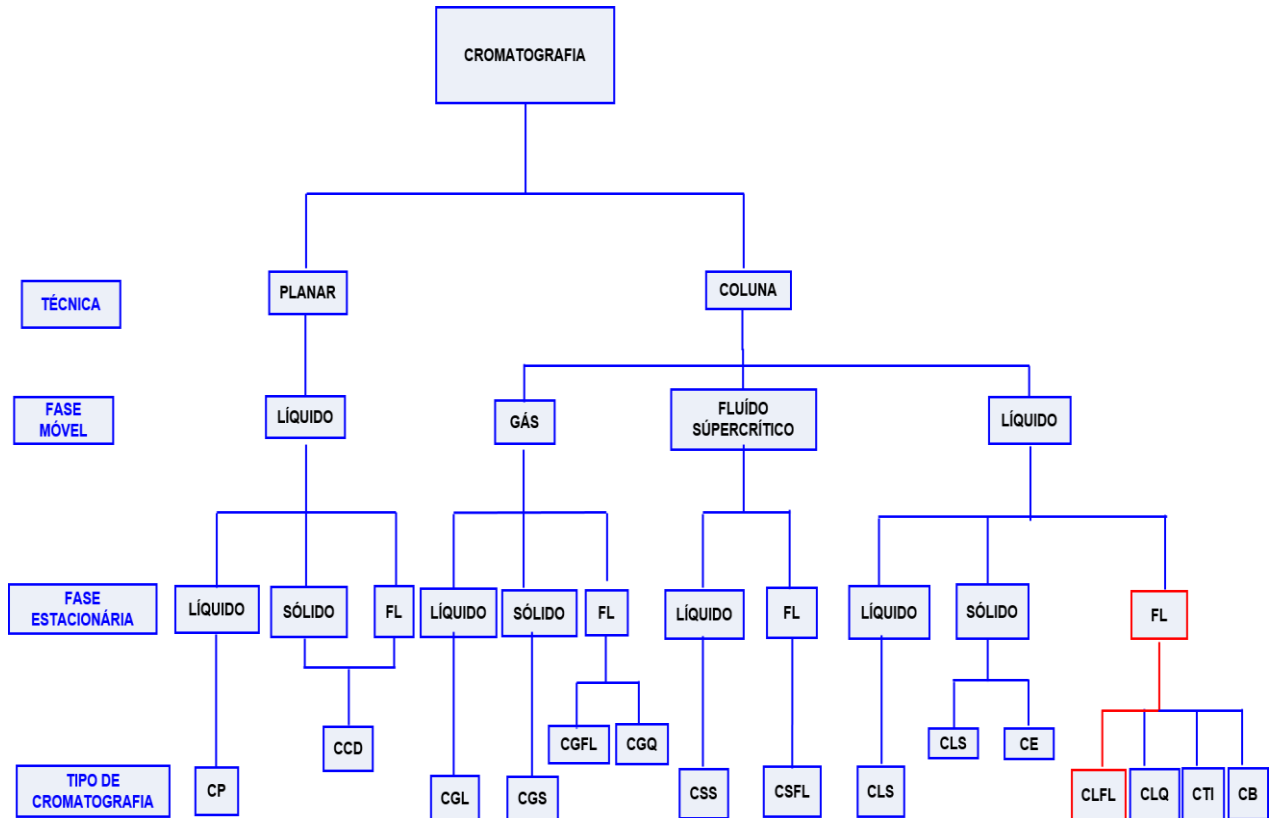


Figura 8: Fluxograma com a representação das principais técnicas cromatográficas. Adaptado de [41].

2.3.1 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês High Performance Liquid Chromatography) é um tipo de cromatografia que emprega em sua fase estacionária (fase ligada) colunas recheadas com materiais que possibilite realizar análises sob alta pressão [41].

Para atingir melhores resoluções a química dos materiais avançou e tecnologias em colunas foram sendo desenvolvidas a fim de aumentar a área superficial de contato, a simetria e a reprodutibilidade das partículas quimicamente modificadas. Ao reduzir o tamanho das partículas de sílica pode-se ter um ganho de resolução considerável devido ao aumento do número de pratos teóricos [41,42].

Na fase estacionária destaca-se a fase reversa, onde empregam-se cadeias alquilas mais longas como Ocetil (C8) e octadecil (C18), que estão quimicamente ligadas à sílica, proporcionando melhor afinidade com compostos apolares [42].

Assim como na química dos materiais, outras características no equipamento para cromatografia em fase líquida foram sendo otimizados, como o sistema de bombas de alta pressão, que envie fluxo reprodutível, principalmente quando a fase estacionária possui tamanhos de partículas pequenas [41-43]. O sistema de injeção das amostras, considerado um fator determinante na precisão das medidas pois estão relacionadas na reprodutibilidade com a qual as amostras podem ser introduzidas na coluna [41,43]

2.3.2 Detectores em Cromatografia Líquida

O detector é um dispositivo que responde à presença de componentes e emite um sinal elétrico, medindo propriedades físicas ou físico-química da amostra ou solução, geralmente diretamente proporcional à concentração do constituinte de interesse, em função do tempo [41-43].

Para obter resultados satisfatórios para as condições analíticas de contorno é preciso que o detector possua sensibilidade, boa estabilidade e reprodutibilidade, seletividade, boa resposta linear, similaridade na resposta, expressas pelos parâmetros de desempenho analítico, além de rapidez e integridade da amostra [41-44].

Existem diversas classes de detectores como os fotométricos, espectrofotométricos com arranjo de diodo (DAD), índice de refração, fluorescência, além de espectrômetro de massa e eletroquímicos [43].

Os mais utilizados para a cromatografia a líquido são os de DAD, espectrômetro de massa e os de fluorescência, que possuem a capacidade de determinar espécies em diferentes comprimentos de onda na região UV/Vis; os de fluorescência que permite a escolha de filtros que selecionem comprimentos de onda de excitação ou emissão, assim como em espectros de massa, onde são levados em consideração a ionização da molécula, gerando como resposta a razão massa/carga [41].

O detector DAD possibilita a análise em diferentes comprimentos de onda, pois toda a luz da fonte passa pela cela do detector. A luz emergente é dispersa por uma grade holográfica, e todos os comprimentos de onda resultantes são focalizados sobre uma fila de fotodiodos [41-43]. São detectores de fácil operação, apresentam boa

sensibilidade, relativamente insensíveis ao fluxo (compatível para eluição com gradiente), e a mudanças de temperatura da fase móvel e de baixo custo.

2.3.3 Preparo da Amostra

A separação dos constituintes presentes em uma matriz torna-se uma tarefa árdua, tendo em vista que há uma infinidade de substâncias presentes em uma amostra. [5].

Deste modo o ponto chave para obter resultados satisfatórios, especialmente em matrizes muito complexas é através de técnicas que reduzam ou eliminem os interferentes em uma análise e que não comprometam a exatidão do método [42].

Esse processo requer uma série de operações para que a análise seja realizada, desde a redução do tamanho das partículas, extração, pré-concentração ou diluição e limpeza, até o momento da análise [42].

Em especial, para o monitoramento de pesticidas em alimentos é necessário que os métodos analíticos sejam eficientes, principalmente no que diz respeito a técnica de extração, devido a necessidade de analisar vários resíduos de classificações diferentes em um mesmo procedimento analítico. Essas metodologias são conhecidas como método de multirresíduos e são realizadas para alcançar uma melhor seletividade e sensibilidade, fatores indispensáveis para obter resultados precisos [41-42].

Existem diversos procedimentos de preparo de amostra de alimentos para análise por cromatografia, como a extração líquido-líquido (LLE, *liquid-liquid extraction*), que consiste na utilização de dois solventes imiscíveis, ou seja, duas fases particionadas, uma contendo o analito de interesse e outra fase que será colocada para a transferência do soluto de acordo com a solubilidade [41]. A desvantagem dessa técnica é o grande consumo de solventes orgânicos, pois para aumentar a eficiência da extração, geralmente são realizadas sucessivas partições, por isso outras técnicas foram sendo desenvolvidas.

A extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*), consiste em um mecanismo de separação líquido-sólido, baseado na cromatografia líquida, onde uma fase estacionária em uma coluna aberta, denominada de cartucho de extração é utilizado, o líquido contendo o analito de interesse é aspirado com ajuda de vácuo,

deixando o analito retido no cartucho, sendo eluído com uma quantidade de solvente proporcional a concentração desejada [41,42,44].

A microextração em fase líquida (LPME, *liquid-phase microextraction*) que surgiu a partir da LLE, e é uma combinação de técnicas a fim de reduzir a desvantagem do gasto de reagentes [46].

A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, *dispersive liquid-liquid extraction*) baseia-se em um sistema ternário, onde são levados em consideração a solução aquosa, um solvente extrator e um solvente dispersor. Para a realização eficiente da extração, a escolha dos solventes é de fundamental importância, pois o solvente dispersor deverá ser miscível nas duas fases, extratora e aquosa, assim como o solvente extrator deverá ser imiscível na fase aquosa. Essa diferença na área superficial do solvente extrator e a solução aquosa é extremamente grande, sendo capaz de realizar a transferência do analito de interesse para a fase orgânica, atingindo rapidamente o equilíbrio formado [47-51]. A Figura 9 representa de forma simplificada o processo da microextração líquido-líquido dispersiva.

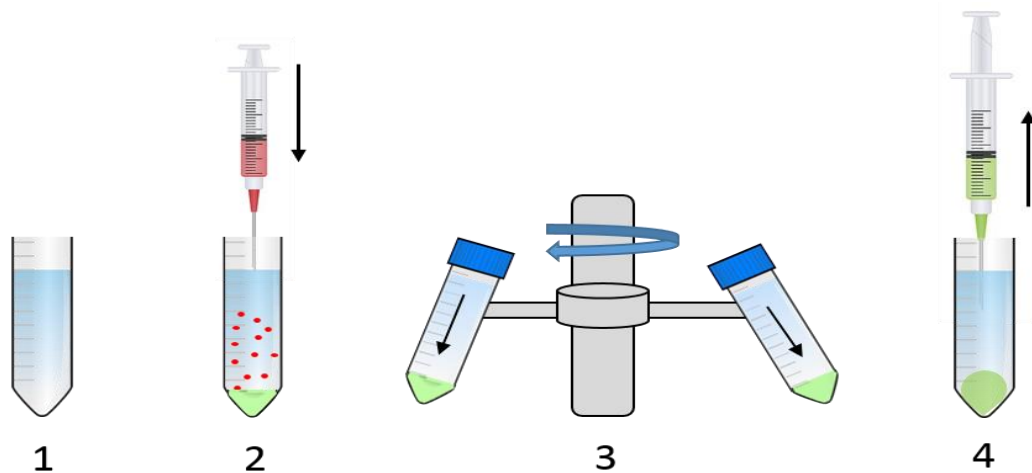


Figura 9: Representação da microextração líquido-líquido dispersiva. 1- Solução aquosa contendo o analito. 2.- Adição dos solventes extrator e dispersor e posterior homogeneização para a transferência do analito. 3- Centrifugação da solução para a sedimentação da fase de interesse. 4- Retirada da fase sedimentada. Adaptada de [47.49].

2.3.3.1 Extração líquido-líquido com dispersão em fase sólida –QuEChERS

O QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*, do inglês, rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro), apresenta com boa recuperação para uma ampla quantidade de pesticidas de diferentes polaridades [14-16,18, 19, 52-53].

O método inicialmente proposto em 2003, denominado também de extração líquido-líquido com partição em fase sólida, foi descrito para contornar as dificuldades do método de análise de multirresíduos possibilitando a identificação e quantificação de resíduos de agrotóxicos em alimentos [54].

Anastassiades e colaboradores propôs, que a amostra fosse triturada e homogeneizada para a devida extração com acetonitrila, este miscível em solução aquosa, requerendo a adição dos sais sulfato de magnésio anidro ($MgSO_4$) e cloreto de sódio (NaCl) para partição das fases, seguida da retirada da fase de interesse [54]. Outros procedimentos foram sendo desenvolvidos, a fim de obter melhores percentuais de recuperação.

O método oficial da Association of Official Analytical Chemist (AOAC) adotado em 2007, considera a adição de ácido acético, a fim de realizar uma etapa de tamponamento, que diminuiria o pH da solução extratora, facilitando a partição e precipitação das substâncias solúveis em água, por altas concentrações de sais (*salting out*) [54,55]. Em seguida foi lançado o método de referência da União Européia, que utiliza em sua metodologia o particionamento realizado por citrato de sódio dihidratado e hidrogenocitrato sesquihidratado de sódio para o efeito tamponante mantendo o pH entre 5 e 5,5 possibilitando a extração de agrotóxicos com caráter ácido [56].

Existem diversas formas de realizar a extração pelo método QuEChERS, tendo como solvente extrator a acetonitrila que promove a extração em fase única e possibilita uma menor extração de componentes lipofílicos, provenientes da amostra, como cera e gorduras [57].

A adição de sais é realizada para promover o *salting out* e a partição das fases em aquosa e orgânica. O sulfato de magnésio possui capacidade para formação de uma reação exotérmica, que favorece a extração de compostos apolares e a separação das fases aquosa e orgânica, enquanto o cloreto de sódio ou acetato de sódio, são utilizados para saturar a fase aquosa garantindo melhor recuperação do analito [55-59].

Outro processo do método QuEChERS é a etapa de limpeza (*clean-up*), que garante que os componentes da matriz alimentar não fiquem aderidos na coluna, alterando a resposta do sistema.

Atualmente utilizam para o clean up, a extração em fase sólida dispersiva (do inglês Dispersive Solid Phase Extraction- D-SPE), que utilizam C18 ou PSA (etilenodiamina-N-propil, uma amina primária/secundária do inglês, primary secondary amine), juntamente com MgSO_4 , que retém interferentes da matriz e removem resíduos de água, diminuindo a polaridade e facilitando a precipitação de coextrativos polares [55-57].

A Figura 10 mostra as etapas das técnicas de extração original, as realizadas pela AOAC e pela União Européia.

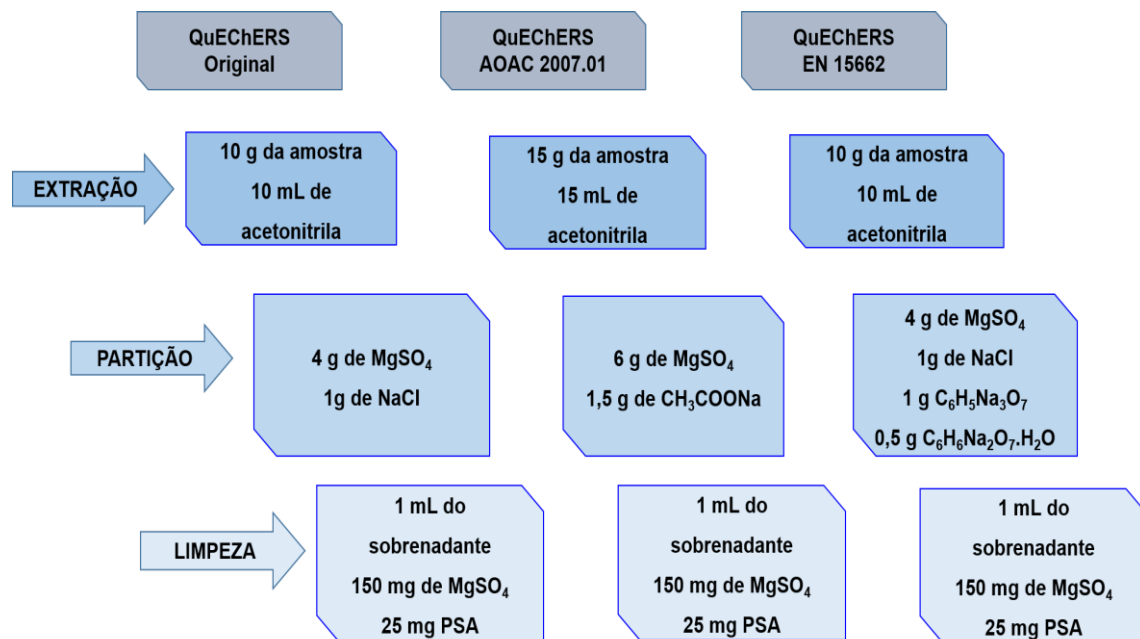


Figura 10: Representação das etapas das técnicas de extrações iniciais e as realizadas pela AOAC e União Europeia. Adaptado de [54-57].

A partir do desenvolvimento das condições cromatográficas e otimização da forma de extração, uma outra etapa fundamental é o tratamento dos dados obtidos e a realização da validação da metodologia desenvolvida, garantindo que o método desenvolvido é confiável e representa qualidade nas medições.

2.4 Calibração Univariada

A calibração é um processo que relaciona uma propriedade medida instrumentalmente a outra que não pode ser medida por um instrumento. Na Química Analítica, a propriedade que se pretende mensurar, geralmente, é a concentração de uma espécie química [60].

Para realizar uma calibração univariada, relaciona-se uma única resposta variável com a concentração de um padrão, essa variável pode ser absorvância, intensidade de corrente, a área de um pico cromatográfico, entre outras. Com essas respostas, pode-se obter uma relação a partir de uma função analítica, representada por um perfil de medidas previamente realizadas, relacionadas com o analito [60].

Para construir um modelo de calibração, deve-se registrar o sinal ao menos de cinco padrões com concentrações distintas e ajustar um modelo, geralmente linear, por mínimos quadrados [63]. Assim sendo, na Química Analítica, calibrar é definir experimentalmente os coeficientes de uma equação matemática que correlacione a propriedade mensurável pelo instrumento ao valor de concentração da espécie química [60,61].

Com a construção da curva analítica é possível inferir se o modelo proposto possui precisão, aplicabilidade e exatidão. O modo mais empregado para a correlação entre a curva obtida e os valores pretendidos é através da estimativa dos métodos dos mínimos quadrados, descrita pela [Equação 1](#), que representa matematicamente uma relação linear entre uma variável dependente y (absorvância) com a independente, x (concentração) e B_0 e B_1 são, respectivamente, os coeficientes linear e angular ajustados por mínimos quadrados [60].

$$y = b_0 + b_1x \quad (1)$$

A análise de variância (ANOVA - *Analysys of variance*) é utilizada para avaliar estatisticamente a confiabilidade do modelo. Na ANOVA, analisa-se a significância da regressão e da falta de ajuste, devendo ser estatisticamente significativo para a regressão e não ser significativo a falta de ajuste, que é avaliado com um teste F [60].

O teste F identifica a significância de variação entre as médias quadráticas como mostrado na [Tabela 4](#). Para definir a falta de ajuste deve-se ter ao menos um ponto medido em triplicata autêntica, pois só assim pode-se inferir qual a parte do resíduo é relacionada apenas ao erro puro e qual parte é referente à falta de ajuste [60-61].

Tabela 4: Equações para ANOVA. Adaptado de [60].

Fonte	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	$SQ_{reg} = \sum n_i [(y_{ei} - y_m)^2]$	$p - 1$	$MQ_{reg} = SQ_{reg} / (p - 1)$
Residual	$SQ_r = \sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	$n - p$	$MQ_{re} = SQ_{re} / (n - p)$
Falta de Ajuste	$SQ_{faj} = \sum n_i [y_{ei} - y_{im}]^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = SQ_{faj} / (m - p)$
Erro Puro	$SQ_{ep} = \sum \sum (y_{ij} - y_{im})^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = SQ_{ep} / (n - m)$

Os

índices i e j indicam o nível da variável x , e as repetições de cada nível x , respectivamente, p , está relacionada ao número de parâmetros avaliados, n , ao número de medidas, m , o número de níveis distintos da variável. Dessa forma para o nível i , pode-se ter várias repetições, sendo representados por n_i .

Dessa forma, consegue-se avaliar se o modelo é robusto, através das médias quadráticas que levam em consideração o número de graus de liberdade que cada termo adicionado à equação gera. Assim, é possível inferir que quanto maior a razão entre a média quadrática da regressão (MQ_{reg}) e a média quadrática residual (MQ_{re}), melhor é o modelo.

Com essas análises, também é possível compreender sobre o coeficiente de correlação gerado pela reta do modelo proposto, de forma que pode ser explicada pela razão entre a soma quadrática da regressão e a soma quadrática total, além de outros de testes estatísticos que podem ser comparados a fim de avaliar a capacidade preditiva, como o teste F [60].

O valor do F calculado através da relação da média quadrática da regressão (MQ_{reg}) e do erro puro (MQ_{ep}), deve ser maior que o valor de F crítico (tabelado) a 95% de confiança [60].

E para um modelo bem ajustado o valor de F, calculado através da relação da média quadrática da falta de ajuste (MQ_{faj}) e do erro puro (MQ_{ep}), deve ser menor que o tabelado, também a 95% de confiança.

Além de avaliar os parâmetros gerados pela regressão linear do modelo, deve-se ter a preocupação de levar em consideração se a metodologia desenvolvida apresenta robustez, demonstrando que o método proposto é apropriado para a finalidade de

identificar e quantificar o que se pretende determinar. Esse processo é denominado de validação ou análise dos parâmetros de desempenho analítico. Para esses estudos existem órgãos que regulamentam e normalizam essas práticas.

2.5 Parâmetros de desempenho analítico

O processo de validação é um indicativo de que a técnica analítica empregada possui confiabilidade nas medidas e nos modelos estatísticos envolvidos no processamento.

No Brasil, os órgãos que normalizam são o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade e Tecnologia (INMETRO) com seu documento (DOQ-CGCRE-008, de março/2003) [62] e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com a resolução (RE nº 899, de 29/05/2003) [63]. Outros órgãos internacionais como o International Standard Organization (ISO) [64], American Society for Testing and Materials (ASTM) [61], EUROCHEM/CITAC [66] também estabelecem condições para promoções da prática, assegurando que as características do método desenvolvido possuem desempenhos que atendam aos requisitos para operações analíticas pretendidas [66].

Os estudos como precisão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, seletividade, sensibilidade são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico e produzem informações sobre o comportamento geral e individual dos fatores que podem influenciar na estimativa da incerteza [66-68].

2.5.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade de determinar uma espécie de interesse diante de uma matriz que contenha analitos que não são de interesse [66]. Em cromatografia, pode ser interpretada como a capacidade do método em distinguir o sinal do analito de interesse na presença de interferentes que respondem no mesmo tempo de retenção e que podem causar desvio (aumento ou diminuição) do sinal atribuído à amostra [66-68].

É analisada pela comparação entre os espectros obtidos em amostras e padrões puros, de forma que demonstre maior pureza nos picos, e semelhança nos tempos de retenção e perfil espectral.

Outra maneira de avaliar a seletividade é realizando a comparação entre a matriz sem adição de padrão e com adição de substância padrão quando não é possível obter a matriz isenta do analito [68].

2.5.2 Linearidade

A linearidade corresponde a capacidade do método analítico correlacionar o sinal obtido aos níveis de concentrações do analito de forma linear. A linearidade pode ser inferida pelo coeficiente de correlação R, que consegue descrever a variação em y, através do coeficiente de regressão, denominado de “b”, e o intercepto “a” [68].

Para obtenção da curva de calibração cada órgão normalizador recomenda que certos números de níveis de calibração sejam analisados, podendo assim obter-se o coeficiente de correlação linear. A ANVISA recomenda que a linearidade seja determinada por, no mínimo, cinco concentrações diferentes, com critério mínimo de correlação de R=0,99. Ainda, estabelece que sejam descritas a faixa de trabalho, a equação matemática e a regressão linear da curva [63]. Para a EUROCHEM/CITAC [66], a faixa linear deve conter de seis a quinze níveis de concentração, e examinar se existem valores atípicos que reflitam no critério de correlação. Uma forma de avaliar se as amostras se comportam de forma a contribuir para uma regressão é através da avaliação dos resíduos de concentração, devendo estar aleatoriamente distribuídos ao longo da linha de regressão [60].

2.5.3 Limite de Detecção

O limite de detecção (LOD do inglês, *limit of detection*), normalmente é determinado para estabelecer a menor concentração que um método consegue detectar, podendo ser calculado através da relação sinal ruído ou pelo método baseado em parâmetros da curva analítica, que pode ser estimado com base na Equação 4:

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (4)$$

Onde s é dado pelo desvio padrão das medidas do branco e, S é o coeficiente angular estimado pela curva analítica. Para calcular esse parâmetro são realizadas replicatas do branco ou da menor concentração do limite de detecção. O INMETRO recomenda que sejam realizadas 7 replicatas para a determinação do LOD, já o guia

européu (EUROCHEM) recomenda que sejam realizadas 10 repetições do branco[62,66].

2.5.4 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LOQ do inglês *limit of quantification*) é dado pelo nível mais baixo em que um analito possui relação sinal ruído suficiente para que seja possível a sua quantificação no detector, com um desempenho que garanta a precisão e a exatidão do analito [66]. Da mesma forma do LOD, o LOQ também pode ser estimado pelos mesmos parâmetros. A [Equação 5](#), mostra como o cálculo para o LOQ pode ser realizado.

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{S}{S} \quad (5)$$

2.5.5 Precisão

Outro parâmetro que deve ser levado em consideração para validação é a avaliação da precisão do método, que representa as dispersões nas condições experimentais, podendo ser mensurada pelo desvio padrão absoluto (s) de medidas replicatas [66]. A precisão deve ser considerada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Também pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação, representado pela [Equação 6](#) [61,65].

$$\text{RSD}(\%) \text{ ou CV}(\%) = \frac{S}{X} \times 100 \quad (6)$$

O coeficiente de variação máximo aceitável para esse parâmetro não deve ultrapassar 5% [63].

Outra forma de avaliar a precisão do método é pela análise do desvio padrão e o teste t, que permite que o analista decida sobre a diferença significativa entre as medidas de um mesmo dia, a um nível especificado, ou medidas em dias alternados, sempre levando em consideração o número de graus de liberdade. A EUROCHEM leva em consideração a [equação 7](#) para o cálculo da precisão (r) [66].

$$r = \sqrt{2} \times t \times s \quad (7)$$

Onde $\sqrt{2}$ reflete a diferença entre duas medições e t é o valor de Student, relacionado ao número de graus de liberdade a um nível de confiança de 95%.

2.5.5.1 Repetibilidade

A repetibilidade é uma medida da variabilidade, devendo ter a menor variação dos resultados, realizados por um único analista, em um mesmo equipamento e em um curto espaço de tempo [63-66].

A ANVISA recomenda que sejam realizadas nove repetições, podendo haver três níveis de concentração, baixa, média e alta medidas em triplicata [63].

Para o guia europeu, as medidas também podem ser realizadas pelo mesmo analista, em um mesmo equipamento, em um curto espaço de tempo e com a realização de seis a quinze replicatas para o mesmo nível. Outras condições, como diferentes analistas ou diferentes equipamentos também são levados em consideração pela EUROCHEM [66].

2.5.5.2 Precisão Intermediária

Com o mesmo procedimento realizado para repetibilidade, a precisão intermediária é realizada pela concordância dos resultados obtidos em diferentes dias, no mesmo laboratório, sendo representada pela concentração média obtida, assim como a estimativa do desvio padrão e o coeficiente de variação obtido com experimentos em diferentes dias. A ANVISA recomenda que sejam realizadas medidas em, no mínimo, dois dias diferentes e com analista diferente [63].

2.5.6 Exatidão

A exatidão é a proximidade dos resultados obtidos comparados a resultados de referência [62]. Três abordagens podem ser realizadas quando queremos expressar a exatidão de um método analítico: análise de materiais de referência, testes de recuperação utilizando amostras enriquecidas com níveis de concentrações conhecidas ou comparação dos resultados obtidos com outros métodos analíticos [66]. A [Equação 8](#) mostra como é calculado o teste de bias ou a recuperação nas amostras reais.

$$R(\%) = \frac{\bar{X}}{X_{ref}} \times 100 \quad (8)$$

Onde, \bar{X} é a média das amostras fortificadas e X_{ref} o valor de referência, dado como um valor real ou um valor verdadeiro convencional.

Os valores individuais de recuperação possuem um intervalo de aceitabilidade com uma faixa de 70 à 120%, devendo ser avaliada em função da concentração do nível de fortificação [63]. Em geral, observa-se que quanto menor o nível de concentração avaliado, maior a probabilidade de se obter uma menor recuperação.

2.5.7 Efeito Matriz

As amostras podem sofrer interferência que afetam o desempenho das medidas, podendo acarretar no aumento ou na diminuição do sinal medido, afetados por processos de pré-concentração, extração ou até mesmo de outras substâncias, que tenham respostas semelhantes ou tempos de retenção próximos aos analitos em estudo [62].

Uma forma de avaliar esse efeito é realizando as medidas com os padrões preparados em solventes, denominados de padrões externos, comparando-os aos padrões extraídos em diferentes níveis de fortificação. Dessa forma, é realizada uma superposição de matriz [68].

Vários testes estatísticos, podem ser utilizados para o estudo do efeito de matriz, como o teste F (Fischer-Snedecor), que avalia a homogeneidade das variâncias, avaliando se as matrizes superpostas podem ser consideradas estatisticamente iguais em cada nível de fortificação, através da [Equação 9](#) [62, 69].

$$F_{cal} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (9)$$

onde s_1^2 e s_2^2 , são as variâncias dos padrões externos e os pontos extraídos, com fortificação, respectivamente. A comparação é realizada com o teste tabelado a um nível de 95% de confiança [62, 69].

Se esse teste não apresentar significância, ou seja, o F calculado for menor do que o F tabelado, considera-se que as variâncias são, estatisticamente, iguais e o teste de distribuição de Student pode ser realizado de acordo com a [Equação 10](#).

$$t_{cal} = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (10)$$

onde, $s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$, e \bar{X}_1 e \bar{X}_2 , são as médias das matrizes, com os padrões preparados com solvente, e com fortificação. n_1 e n_2 , são os tamanhos das amostras [62, 69].

Se o F calculado for maior que o F tabelado, não deve ser levado em consideração a igualdade das variâncias medidas e o teste t deve ser realizado de acordo com a [Equação 11](#) [62, 69].

$$t_{cal} = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)}} \quad (11)$$



METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1 Reagentes e Soluções

Os padrões de alta pureza dos analitos, 1-naftil metilcarbamato (carbaril, pureza de 99,8%); Metil benzimidazol-2-ilcarbamato (carbendazim, pureza de 99,2%); 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-ilmetilcarbamato (carbofuran, pureza de 99,9%); (RS)-2,4'-difluoro-a-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil (benzidril álcool)) (flutriafol, pureza de 97%); 2-(2-furanil) -1H benzidazol (fuberidazol, pureza de 99,5%); 2- (Tiazol-4-il benzimidazol), (tiabendazol, pureza de 99,9%); e Naftalen-1-ol (1-naftol, pureza de 99,9%), foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os solventes como metanol (J.T.Baker,México), acetonitrila (J.T.Baker,México), diclorometano UV/HPLC-espectroscópico (pureza de 99,9%) da Vetec, acetona, com pureza de 99,5% da Synth, ácido fosfórico (pureza de 85%) da Vetec, e água deionizada Mili-Q. Foi ainda utilizado N₂ para secagem das amostras, com pureza de 99,9%, fornecido pela Linde Group, São Paulo, Brasil.

As soluções estoque, preparadas inicialmente em metanol, de cada um dos analitos foram preparadas com as seguintes concentrações: carbendazim (320 mg L⁻¹), tiabendazol (232 mg L⁻¹), fuberidazol (250 mg L⁻¹), carbofuran (128 mg L⁻¹), carbaril (126 mg L⁻¹), 1-naftol (536 mg L⁻¹) e flutriafol (300 mg L⁻¹). Os estoques foram armazenados em frasco âmbar com batoque e acondicionados a uma temperatura de -20°C em freezer.

Para minimizar o erro sistemático proveniente do uso da micropipeta, uma série de diluições volumétricas foram realizadas a partir das soluções estoques. As soluções de carbendazim, tiabendazol, fuberidazol, 1-naftol e flutriafol foram diluídos à 100 mg L⁻¹ e as soluções de carbofuran e carbaril foram preparadas à 50 mg L⁻¹.

3.2 Amostras de calibração

Inicialmente foi avaliada a linearidade (faixa linear dinâmica) dos analitos utilizando quatorze amostras de calibração, em triplicatas autênticas, com faixas de concentrações diferentes para cada analito, visto que a detecção e perda da linearidade diferenciam para cada analito. A faixa linear de trabalho determinada para cada analito é mostrada na [Tabela 5](#).

Tabela 5: Concentrações de trabalho definidas para CBZ (carbendazim), TBZ (tiabendazol), FBZ (fuberidazol), CBR (carbaril), CBO (carbofuran), NFT (1-naftol) e FLT (flutriafol).

Nível de concentração	Analito						
	CBZ	TBZ	FBZ	CBO	CBR	NFT	FLT
1	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
2	0,50	1,00	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
3	1,00	2,50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
4	2,50	5,0	2,50	5,00	2,00	3,00	4,00
5	5,00	10,0	10,0	9,00	4,00	5,00	8,00
6	7,50	15,0	20,0	13,0	6,00	9,00	16,00
7	15,0	20,0	35,0	15,0	9,00	11,00	24,00

*Concentrações em mg L⁻¹

3.3 Otimização do processo de extração

Foi realizada a otimização do processo de extração para avaliar a recuperação dos analitos de acordo com a metodologia.

Os testes foram realizados com uma mistura dos analitos (mix) com concentrações de 3 mg L⁻¹ para CBZ, TBZ, FBZ, FLT e NFT e 1 mg L⁻¹ para CBR e CBO, todos preparados em água, para simular a fase aquosa das hortaliças.

Primeiramente, foram realizados testes separadamente com acetonitrila, metanol e uma mistura de metanol/ acetonitrila (1:1), tomando uma alíquota de 1 mL da solução do mix, e 1 mL dos solventes orgânicos acima, e adição do sulfato de magnésio e acetato de sódio, para partição e o salting out.

Após adição dos sais homogeneizou-se em vortex por 1 minuto e centrifugou por 5 minutos, coletando no final do processo o sobrenadante, que foi secado com nitrogênio, e redissolvido na fase móvel da corrida cromatográfica pré-definida.

Foram ainda realizados testes de extração com a técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), que envolve um solvente extrator e um solvente dispersor. Para esses casos, utilizou-se o diclorometano (CH₂Cl₂), como solvente extrator, e acetona, acetonitrila, e metanol, como solventes dispersores.

No teste de DLLME utilizou-se 1 mL da amostra e uma mistura do agente dispersor e agente extrator na proporção de (2:1). Homogeneizou-se e centrifugou-se

da mesma maneira que o teste anterior, retirando a parte sedimentada, que contém o diclorometano. Posteriormente secou-se com nitrogênio todas as amostras testes e redissolveu na fase móvel da corrida cromatográfica.

Os extratos obtidos foram injetados em triplicatas e os resultados foram obtidos através da média das áreas encontradas

3.4 Preparo das amostras

Seis amostras de hortaliças (alface, couve, tomate, pimentão, beterraba e cenoura), foram adquiridas no Mercado Público de João Pessoa, Paraíba, Brasil.

Depois de adquiridas no comércio local, as amostras foram acondicionadas separadamente em sacos plásticos herméticos, tipo *zip*, para evitar perda de umidade e de analito por volatilização.

As amostras foram congeladas em freezer, à uma temperatura de -20°C , por no máximo sete dias, afim de evitar perdas por atrito durante o processamento das hortaliças e obter homogeneidade, facilitando a pesagem das amostras.

Após o congelamento as amostras foram cortadas e trituradas sem nenhum pré-processamento, como lavagem ou retirada de alguma parte da hortaliça, em um mini processador (modelo HC31 da Black & Decker). Posteriormente, foram pesadas em balança analítica (modelo AY220 da Shimadzu) uma massa aproximada de 2,0000 gramas para cada amostra e para os níveis 1, 2, 3 e 4 de fortificação, totalizando 30 amostras para análise cromatográfica. Na [Tabela 6](#), pode-se observar os quatro níveis de fortificação para cada analito em estudo.

Tabela 6: Níveis de fortificação utilizados para os processos de recuperação e efeito matriz

Nível de fortificação	Analito						
	CBZ	TBZ	FBZ	CBO	CBR	NFT	FLT
1	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
2	3,00	4,00	8,00	2,00	1,00	2,00	5,00
3	6,00	8,00	12,0	4,00	3,00	4,00	10,0
4	9,00	12,0	18,0	6,00	5,00	6,00	15,0

*Concentração em mg.L⁻¹

Foram adicionados 2 mL de acetonitrila em cada amostra e para a separação das fases, orgânica e aquosa e o *salting out* dos analitos, foi utilizado o procedimento da AOAC 2007.01 Method Packet, que utiliza o Kit QuEChERS (Rock), que contém 0,6 g de sulfato de magnésio e 0,15 g de acetato de sódio para cada grama de amostra.

Após a adição, agitou-se em vortex e em seguida utilizou-se uma centrífuga (modelo Z206A da Hermlle), à 4000G por 10 minutos para garantir total separação das fases. A [Figura 11](#) simplifica o procedimento realizado no preparo das amostras.

**Figura 11:** Esquema simplificado do procedimento para o preparo das amostras.

Após a centrifugação, retirou-se uma alíquota de 1,5 mL da fase orgânica e realizou-se a secagem da acetonitrila com N₂. Posteriormente, realizou-se a redissolução em 0,3 mL da proporção de 40% de metanol e 60% de água, com a finalidade de pré-concentrar o extrato. Em seguida as amostras foram passadas em filtro seringa com membrana de nylon, com tamanho de poro de 0,22 µm e diâmetro de 4 mm, para garantir que não houvesse partículas sólidas que pudessem danificar a coluna ou reduzir a vida útil da pré-coluna. A [Figura 12](#), representa o sistema

montado para a secagem das amostras, e o filtro seringa utilizado antes e depois da filtração das amostras.

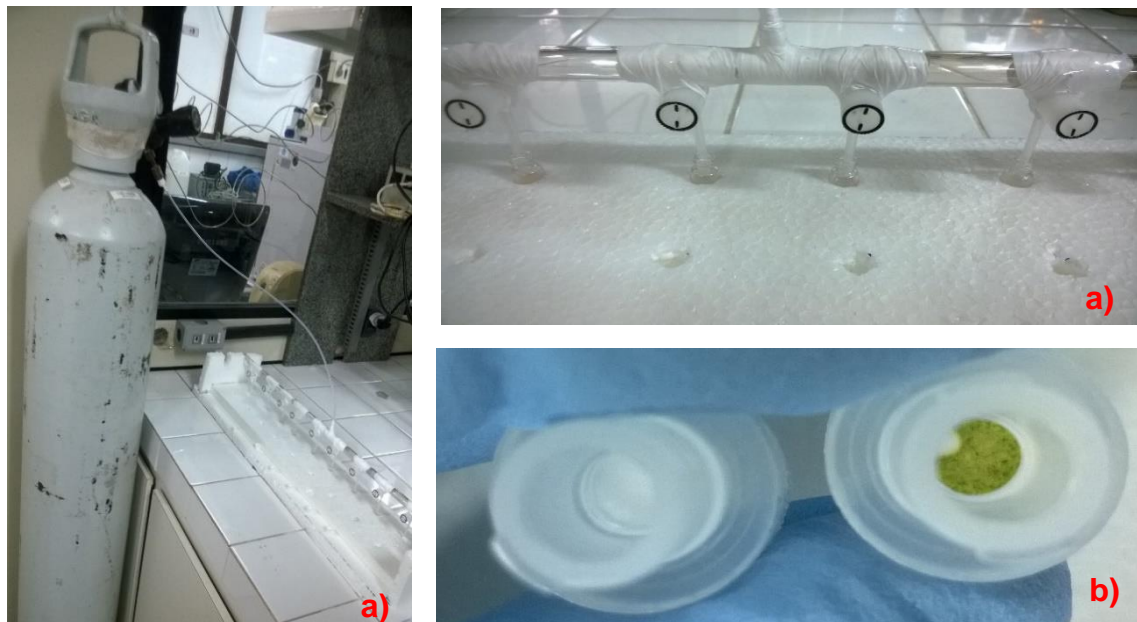


Figura 12: a) Sistema produzido para a secagem das amostras com N₂. b) Filtro seringa antes e depois da filtração.

Após todo o procedimento descrito anteriormente, foi obtido um extrato para identificação ou quantificação de agrotóxicos em hortaliças, obtidas no comércio local. A [Equação 12](#), foi utilizada para obtenção da massa de agrotóxico obtida por kg de amostra pesada.

$$\text{Concentração} = \frac{\text{concentração obtida pela equação da reta} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \times \text{Volume de ACN(L)}}{\text{massa da amostra (kg)}}$$

3.5 Análise cromatográfica

As amostras preparadas foram analisadas em um cromatógrafo Dionex da série Ultimate 3000 (Dionex Technologies), equipado com bomba quaternária, como mostrado na [Figura 13](#). O injetor é equipado com uma válvula de seis vias com alça de amostragem fixa de 20 μL . Foi utilizado ainda, uma coluna Acclaim™ 120 de C18 (120 Å, 4,6x150 mm, 5 μm de partícula) da Dionex Technologies e detector de DAD.

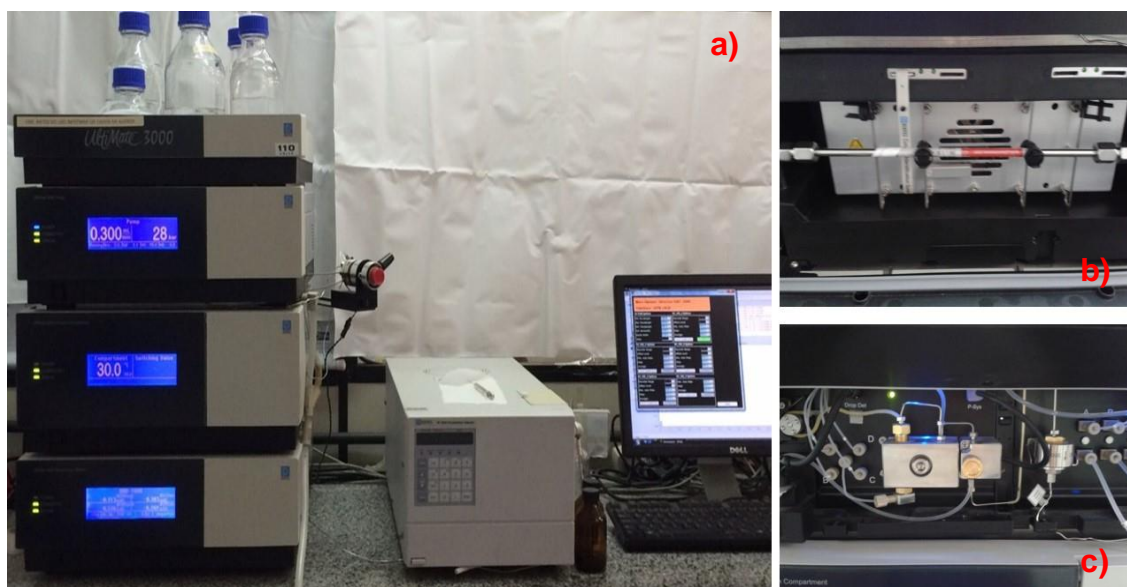


Figura 13: a) Cromatógrafo a líquido de alta eficiência; b) Compartimento da coluna; c) Compartimento da bomba quaternária.

As fases móveis utilizadas para a eluição dos compostos constituíram-se de água acidificada com ácido fosfórico à 0,001%, pH 4 (Fase A) e metanol (Fase B). A eluição foi realizada em modo gradiente linear, com vazão de 1 mL min^{-1} e uma temperatura de 35°C .

A [Tabela 7](#) apresenta as condições do gradiente, que se iniciou com a proporção de 40% de metanol e 60% de água acidificada.

Tabela 7: Condições do gradiente utilizadas durante as análises cromatográficas.

Tempo	Metanol	Água
0 – 3,5 min	40%	60%
3,5 min – 22 min	45%	55%
22 min – 26 min	90%	10%
26 min – 34 min	40%	60%

A corrida cromatográfica teve um tempo de aproximadamente 22 minutos para as amostras padrões e acréscimo de 12 minutos para limpeza da coluna para amostras e estabilização do detector entre uma corrida e outra. Foram registrados espectros do UV (190 a 400 nm) com uma frequência de 10Hz, utilizando um detector de arranjo de diodos da Dionex, da série Ultimate 3000.

Para cada analito, foram selecionados comprimentos de ondas que apresentassem maior sensibilidade e seletividade. Para CBO o comprimento de onda foi de 200 nm; para NFT e FLT, 210 nm; CBR, 220 nm; CBZ, 280 nm; TBZ, 300 nm e FBZ, 306 nm.

3.6 Validação dos métodos analíticos

A validação baseou-se nos parâmetros de qualidade analítica discutidas anteriormente no Capítulo 2, na [seção 2.5](#).

3.6.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada pela comparação de três cromatogramas:

- Mistura dos compostos com a mesma concentração da amostra fortificada;
- Amostras de hortaliças sem fortificação
- Amostra de hortaliças fortificadas com agrotóxicos antes da extração. (nível mais alto de fortificação, mencionado na Tabela 6, seção 3.4)

3.6.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através do método de padronização externa, correlacionando-se o sinal obtido, nesse caso, a área dos picos cromatográficos, aos níveis de concentrações dos analitos, avaliando os coeficientes de correlação linear (r). A ANVISA recomenda um ajuste ideal dos dados um coeficiente igual a 0,99 [63]

3.6.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir da menor concentração da faixa linear de trabalho ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$), realizando 10 ensaios para avaliar o desvio padrão da resposta instrumental de acordo com as [equações 4 e 5](#), citadas nas seções [2.5.4](#) e [2.5.5](#) do capítulo 2.

3.6.4 Precisão

A precisão foi calculada através de testes de repetibilidade em quatro níveis a fim de obter o coeficiente de variação (CV), discutida na [seção 2.5.6](#), capítulo 2.

- Sete repetições das concentrações do nível mais baixo contendo os sete pesticidas ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$ para cada analito);

- Sete determinações para o nível 2 contendo os sete agrotóxicos (3,0 mg L⁻¹ de CBZ; 4,0 mg L⁻¹ de TBZ; 8,0 mg L⁻¹ de FBZ; 2,0mg L⁻¹ de CBO; 1,0 mg L⁻¹ de CBR; 2,0 mg L⁻¹ de NFT e 5,0 mg L⁻¹ de FLT).
- Sete determinações do nível 3 com uma mistura dos sete agrotóxicos (6,0 mg L⁻¹ de CBZ; 8,0 mg L⁻¹ de TBZ; 12,0 mg L⁻¹ de FBZ; 4,0mg L⁻¹ de CBO; 3,0 mg L⁻¹ de CBR; 4,0 mg L⁻¹ de NFT e 10,0 mg L⁻¹ de FLT).
- Sete determinações do nível 4 com uma mistura dos sete agrotóxicos (9,0 mg L⁻¹ de CBZ; 12,0 mg L⁻¹ de TBZ; 18,0 mg L⁻¹ de FBZ; 6,0mg L⁻¹ de CBO; 5,0 mg L⁻¹ de CBR; 6,0 mg L⁻¹ de NFT e 15,0 mg L⁻¹ de FLT).

Todas as determinações foram realizadas pelo mesmo analista, no mesmo instrumento, em um curto intervalo de tempo.

A precisão intermediária foi realizada com sete determinações em quatro semanas diferentes.

3.6.5 Exatidão

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada de acordo com o descrito no capítulo 2 ([seção 2.5.7](#)) sendo realizados ensaios em triplicatas e com os 4 níveis de concentração descritas na [Tabela 6, seção 3.4](#). Os níveis escolhidos para realização do teste passaram pelo mesmo processo de extração das amostras, sendo comparados os valores recuperados após extração.

3.6.6 Efeito matriz

A fim de analisar o efeito de matriz proveniente do processo de extração ou pela amostra, onde existem diversos interferentes, foi realizado o teste t pareado, comparando as curvas obtidas para os padrões puros e extraídos. Para esse procedimento foram utilizados concentrações dos quatros níveis dispostos na [Tabela 6](#). Os testes estatísticos foram realizados no software Statistica® 6.0.



RESULTADOS E DISCUSSÕES

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Otimização das condições cromatográficas

Estudos preliminares mostraram que a fase móvel, eluída isocraticamente, não foi eficiente para resolver os picos dos agrotóxicos em estudo, dada a dificuldade na separação dos analitos CBZ, TBZ e FBZ, pelas suas similaridades estruturais e por apresentarem tempo de retenção próximos.

Outro fator para escolha do modo gradiente foi a adsorção que os analitos apresentaram a coluna. Dessa forma fatores que influenciam na adsorção foram otimizados, além da mudança da proporção do solvente, a temperatura e a vazão foram avaliados. [41-43].

Inicialmente foram estudadas vazões inferior a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, mas observou-se uma corrida muito longa e picos alargados, dessa forma, as vazões de $1,0$; $1,2$ e $1,5 \text{ mL.min}^{-1}$ foram trabalhadas obtendo como resposta distorções nos picos quando a vazão foi superior a $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$.

A [Figura 14](#) mostra as vazões para $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$, $1,2 \text{ mL.min}^{-1}$ e $1,5 \text{ mL.min}^{-1}$, obtidas a partir do nível 4 da mistura de calibração dos padrões, representados na [Tabela 5](#) (seção 3.2).

$2,5 \text{ mg L}^{-1}$

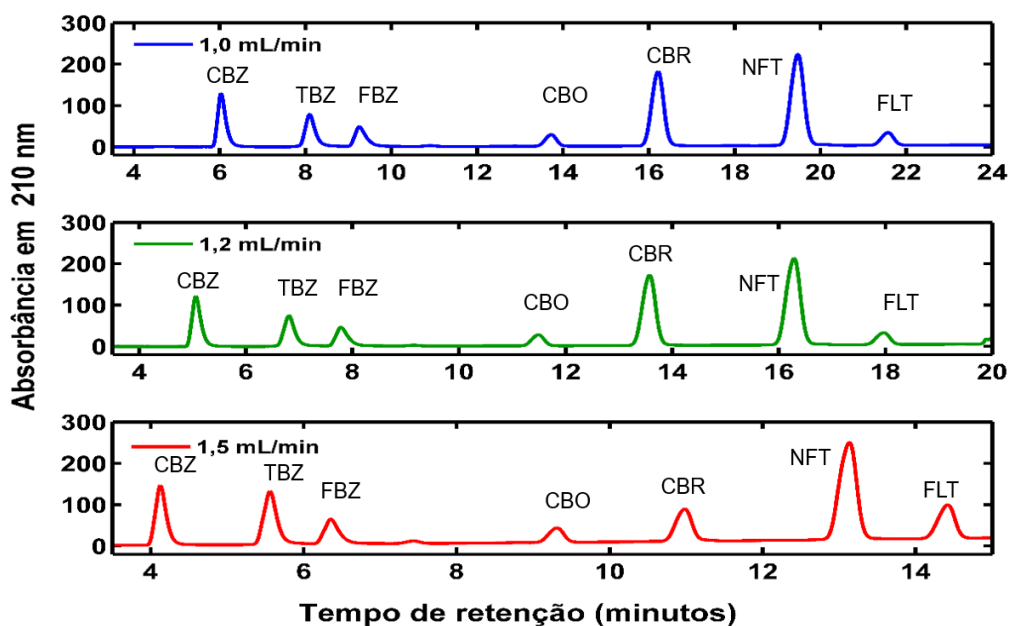


Figura 14: Vazões estudadas para otimização da corrida cromatográfica. Em (—), vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, em (—), $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, em (—), $1,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Durante a otimização das condições cromatográficas, verificou-se que após o teste de extração com os padrões haviam picos de interferentes que coeluíam com o analito, resultando em recuperações baixas ou muito altas. Assim optou-se por acidificar a fase aquosa com ácido fosfórico, com a finalidade de deslocar esses picos interferentes, provenientes dos sais utilizados na extração.

Esses modificadores de fase móvel, ácidos ou básicos (menos comum), são utilizados a fim de favorecer o processo de ionização do analitos, o que ocasiona alargamento do pico e/ou duplo pico. Dessa forma a adição de ácidos orgânicos, como acético, ou inorgânicos, como ácido fosfórico, acaba por deslocar o equilíbrio para a forma não ionizada [41-42].

Nesse caso, o ácido fosfórico foi escolhido devido sua absorção no DAD, ter ponto de corte no UV abaixo de 190 nm, não influenciando na linha de base.

A [Figura 15](#) mostra o cromatograma registrado em 220 nm, 300 e 306 nm, onde a presença do interferente pode ser vista entre dois analitos, TBZ e FBZ. Quando selecionou-se os comprimentos de 300 e 306 nm notou-se que não existia a presença desse interferente, isso mostra que o canal utilizado é seletivo e informativo aos analitos

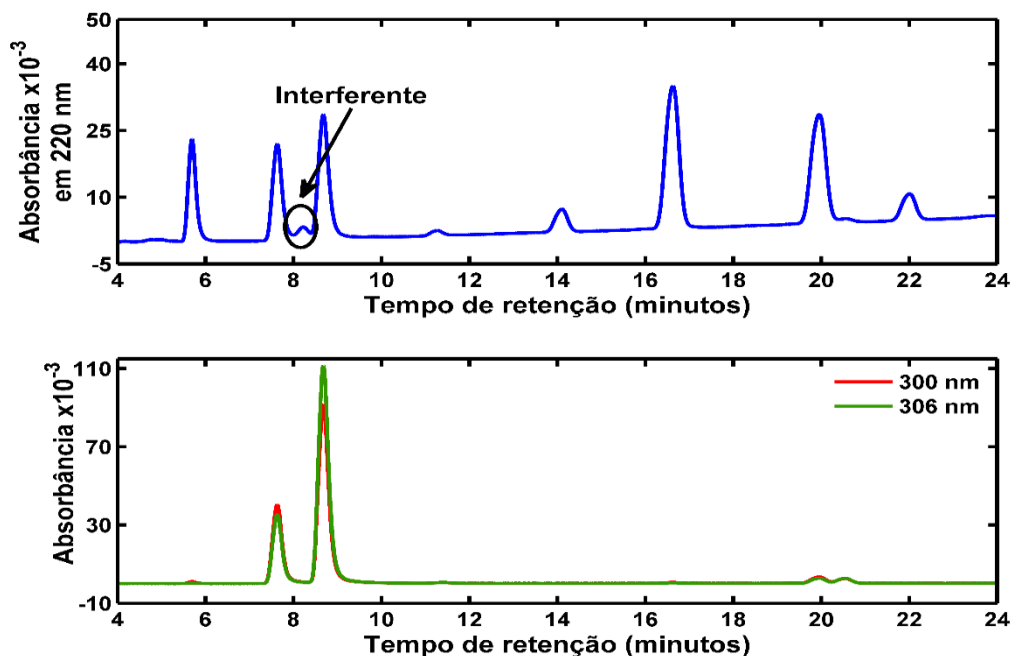


Figura 15: Cromatograma registrado em 220 nm (—) mostrando a presença do interferente. Em (—), o cromatograma registrado em 300 nm e em (—), o cromatograma registrado em 306 nm.

Os espectros das espécies discutidas anteriormente mostram que o interferente não responde em comprimentos de onda maior que 230 nm. A [Figura 16](#) apresenta esses espectros normalizados.

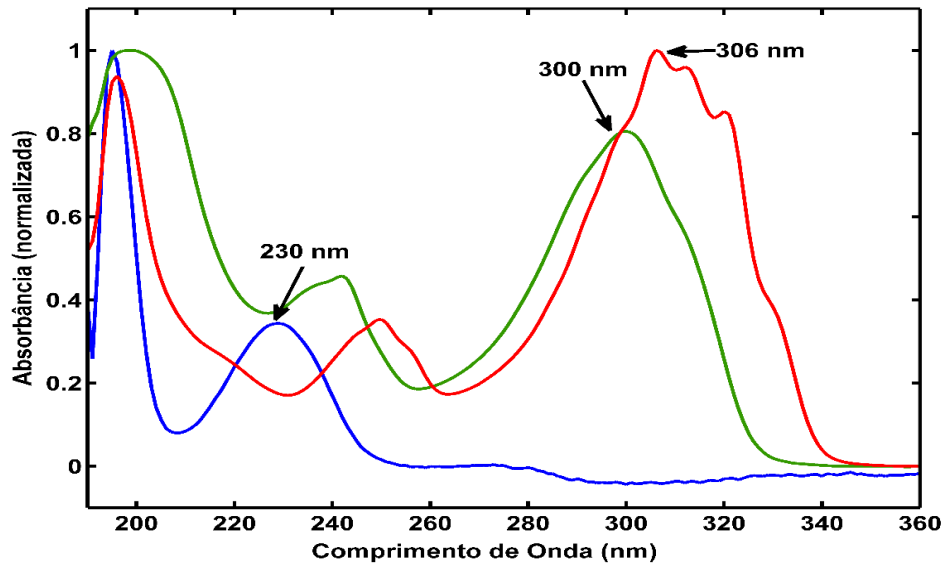


Figura 16: Espectro normalizado do interferente (—), Tiabendazol (—) e Fuberidazol (—)

A partir da otimização da corrida cromatográfica, foi realizada uma avaliação de alguns parâmetros que auxiliam na identificação dos compostos separados e o desempenho cromatográfico. A [Tabela 8](#) apresenta as informações, do tempo de retenção, largura do pico à meia altura, resolução, assimetria e pureza do pico, para os padrões extraídos.

Tabela 8: Desempenho cromatográfico obtido após a otimização da corrida cromatográfica para padrões extraídos com as seguintes concentrações: CBZ, TBZ e FBZ (2,5 mg L⁻¹), CBO (5 mg L⁻¹), CBR (2 mg L⁻¹), NFT (3 mg L⁻¹) e FLT (8 mg L⁻¹).

Analito	Tempo de Retenção (min)	Largura de pico à meia altura	Resolução	Assimetria	Pureza do pico (%)
CBZ	5,88	0,32	6,02	1,53	98,6
TBZ	7,95	0,39	2,95	1,41	99,8
FBZ	9,10	0,42	11,16	1,33	99,9
CBF	13,95	0,46	5,27	0,96	100
CBR	16,45	0,49	6,47	0,94	99,9
NFT	19,75	0,53	3,98	0,95	100
FLT	21,81	0,50	-	0,94	99,9

Para o flutriafol não há resolução, pois nesse parâmetro leva-se em consideração o tempo de retenção do pico com o seu subsequente, e indica que quanto maior a resolução, melhor a separação. Resolução maior que 1,5, indica que houve total separação entre os constituintes [41].

A assimetria é uma forma de avaliar o alargamento dos picos, que são considerados gaussianos, servindo para demonstrar se está ocorrendo dispersão dos componentes da amostra ao longo da corrida na coluna, obtém-se resultado satisfatório quando tem-se um valor próximo a um [41]. Dessa forma é possível controlar a retenção dos analitos na coluna e decidir sobre a força do solvente utilizado [41]

A pureza do pico indica a presença do composto puro na amostra e quanto mais próximo de 100%, mais puro o pico na amostra.

4.2 Otimização do processo de extração

Como relatado na [seção 3.3](#), foi realizado um procedimento a fim de otimizar o processo de extração com misturas de solventes que pudessem favorecer na recuperação dos analitos no processo de extração. A [Figura 17](#) mostra o resultado após centrifugação, podendo inferir visualmente que a extração com acetonitrila obteve melhor separação da fase orgânica que contém o analito.

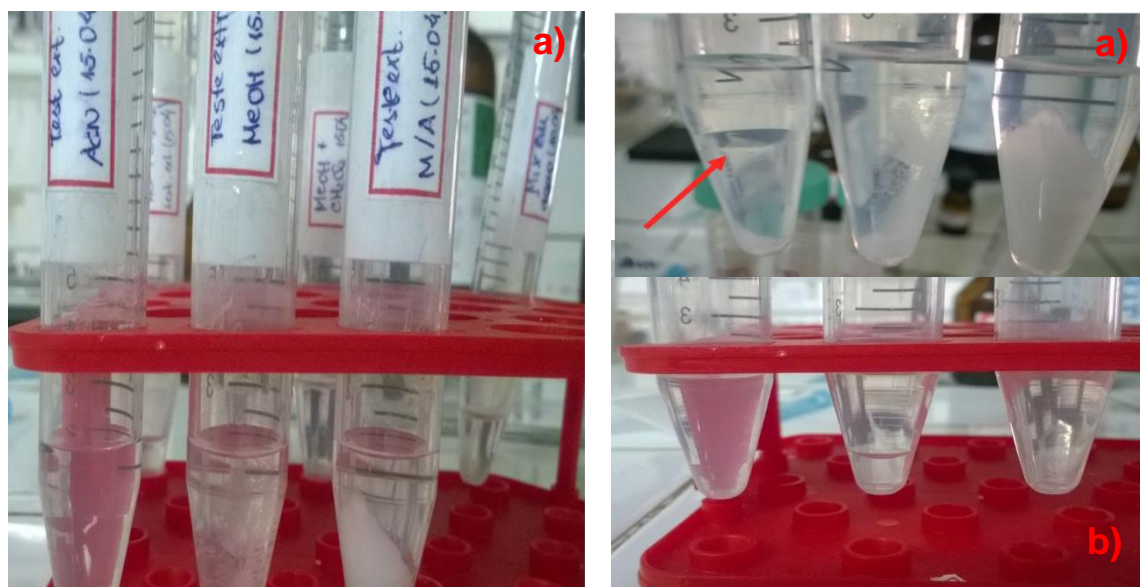


Figura 17: a) Teste de extração. Da esquerda para direita, teste com acetoneitrila, metanol e a mistura de acetoneitrila/metanol (1:1). b) Extração com DLLME. Da esquerda para direita, extração acetoneitrila/ CH_2Cl_2 , metanol/ CH_2Cl_2 , e por último, acetona/ CH_2Cl_2

Para verificar a eficiência da extração, foi realizado um teste de recuperação a partir das áreas obtidas pelos padrões de cada analito, antes e depois da extração.

Na [Tabela 9](#) pode-se observar os resultados das recuperações obtidas com as extrações descritas anteriormente.

Tabela 9: Resultado da recuperação (porcentagem) de cada analito por método de extração estudado.

Analito	ACN ¹ %	MeOH ² %	MeOH/ ACN ³ %	ACN/ DCM ⁴ %	MeOH/ DCM ⁵ %	ACT/ DCM ⁶ %
CBZ	92,4	53,1	66,1	37,2	14,8	27,2
TBZ	97,9	69,2	84,3	21,1	14,0	27,8
FBZ	97,8	59,2	71,9	28,3	20,3	35,6
CBO	94,8	48,7	65,9	43,6	34,2	58,2
CBR	91,3	39,5	61,7	42,8	36,4	52,3
NFT	85,6	27,2	53,8	39,9	31,9	46,8
FLT	90,0	53,5	66,6	43,3	36,00	52,7
Média	92,8	50,1	67,2	36,6	26,8	42,9

Sendo: 1 Acetoneitrila; 2 Metanol; 3 Metanol/Acetoneitrila; 4 Acetoneitrila/Diclorometano; 5 Metanol/Diclorometano e 6 Acetona/Diclorometano

A partir da [Tabela 9](#), observa-se que os resultados de extrações realizadas com diclorometano apresentaram baixa recuperação, isso é justificado pela questão do caráter polar que os analitos apresentam, mostrando que a extração com diclorometano extrai melhor compostos apolares. Após a realização dos testes de extração, chegou-se à conclusão que o método convencional do QuEChERS, com o uso da acetonitrila, obteve melhor desempenho, com melhor recuperação, sendo assim, o método escolhido para extração dos agrotóxicos em hortaliças [70]. As amostras não passaram pela etapa de limpeza pois, o PSA afeta a recuperação de alguns analitos, favorecendo a retenção na coluna durante a corrida cromatográfica [58].

4.3 Validação dos métodos analíticos

A validação realizada com esse conjunto de dados baseou-se nos parâmetros de qualidade analítica discutidas anteriormente no Capítulo 2

4.3.1 Seletividade

Os resultados dos testes de seletividade estão apresentados nos cromatogramas da [Figura 18](#). No [Apêndice A](#) é possível observar a seletividade do método proposto, a partir dos cromatogramas das amostras de alface, beterraba, couve, pimentão e tomate.

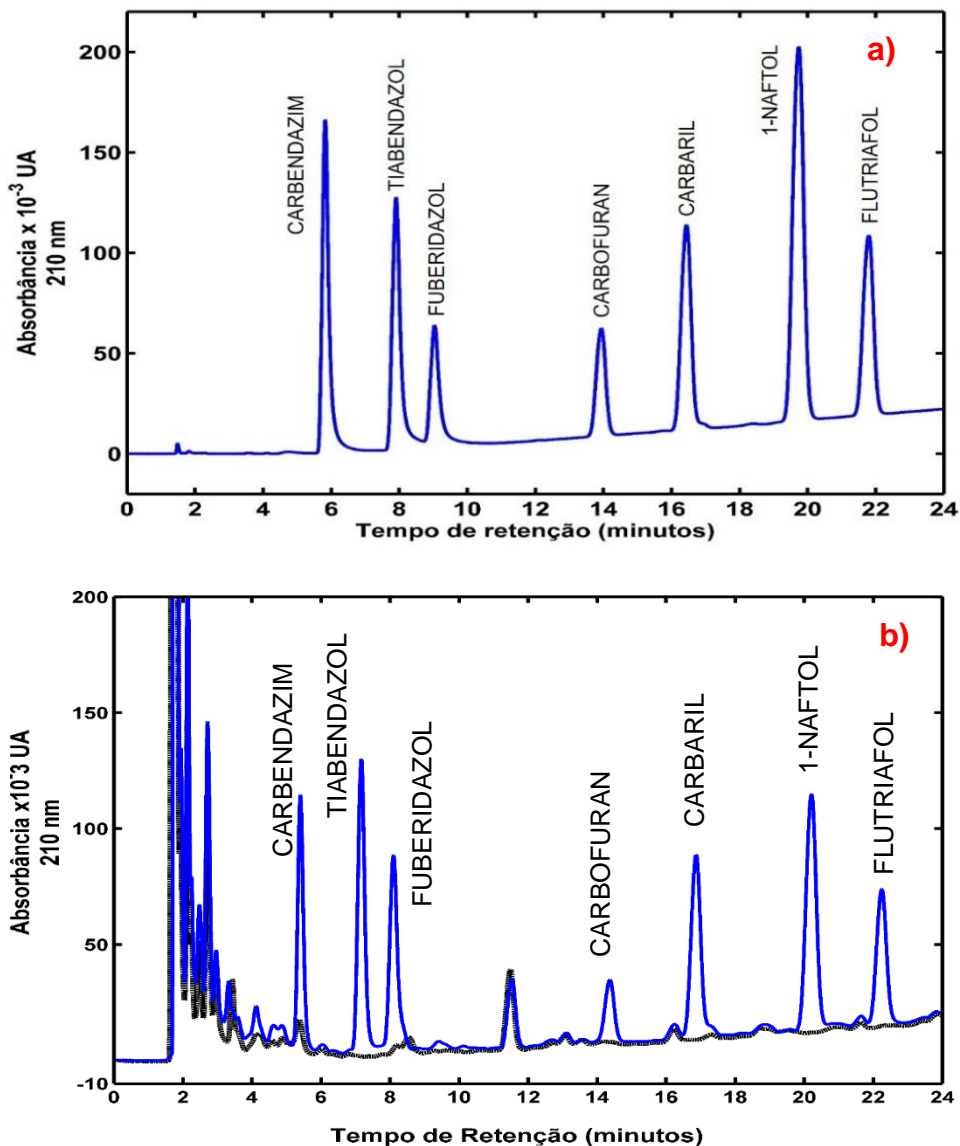


Figura 18: Cromatograma de: a) Mistura dos padrões de agrotóxicos. b) Amostra de cenoura fortificada no nível quatro (—) e em (----) amostra de cenoura sem fortificação.

Para comprovação da seletividade do método proposto, foi realizada a comparação entre os espectros de absorção molecular dos padrões puros dos agrotóxicos aos encontrados nas amostras sem fortificação e com fortificação com as seguintes concentrações: $9,0 \text{ mg L}^{-1}$ de CBZ; $12,0 \text{ mg L}^{-1}$ de TBZ; $18,0 \text{ mg L}^{-1}$ de FBZ; $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ de CBO; $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de CBR; $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NFT e $15,0 \text{ mg L}^{-1}$ de FLT. Esse mesmo estudo foi realizado com todas as amostras de hortaliças. Na [Figura 19](#), é possível observar os espectros mostrando a seletividade dos comprimentos de ondas escolhidos.

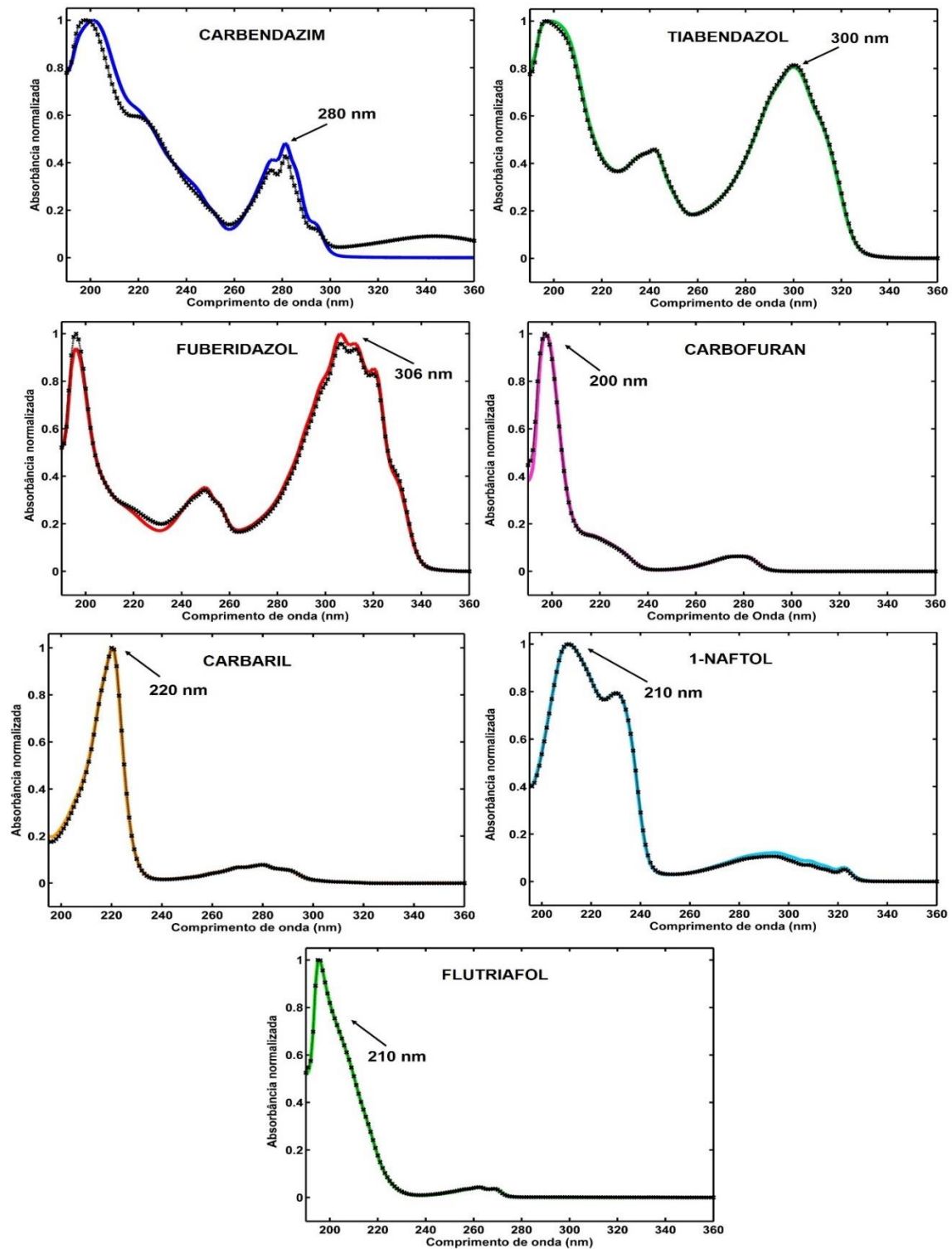


Figura 19: Espectros dos padrões em estudo com os comprimentos de onda selecionados. Carbendazim (—), Tiabendazol (—), Fuberidazol (—), Carbofuran (—), Carbaril (—), 1-Naftol (—) e Flutriafol (—). As linhas pontilhadas (----) representam os espectros das fortificações na amostra de cenoura.

4.3.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada por modelos de calibração entre as concentrações estudadas e a área dos picos cromatográficos. As curvas analíticas geradas pela correlação podem ser vistas na [Figura 20](#).

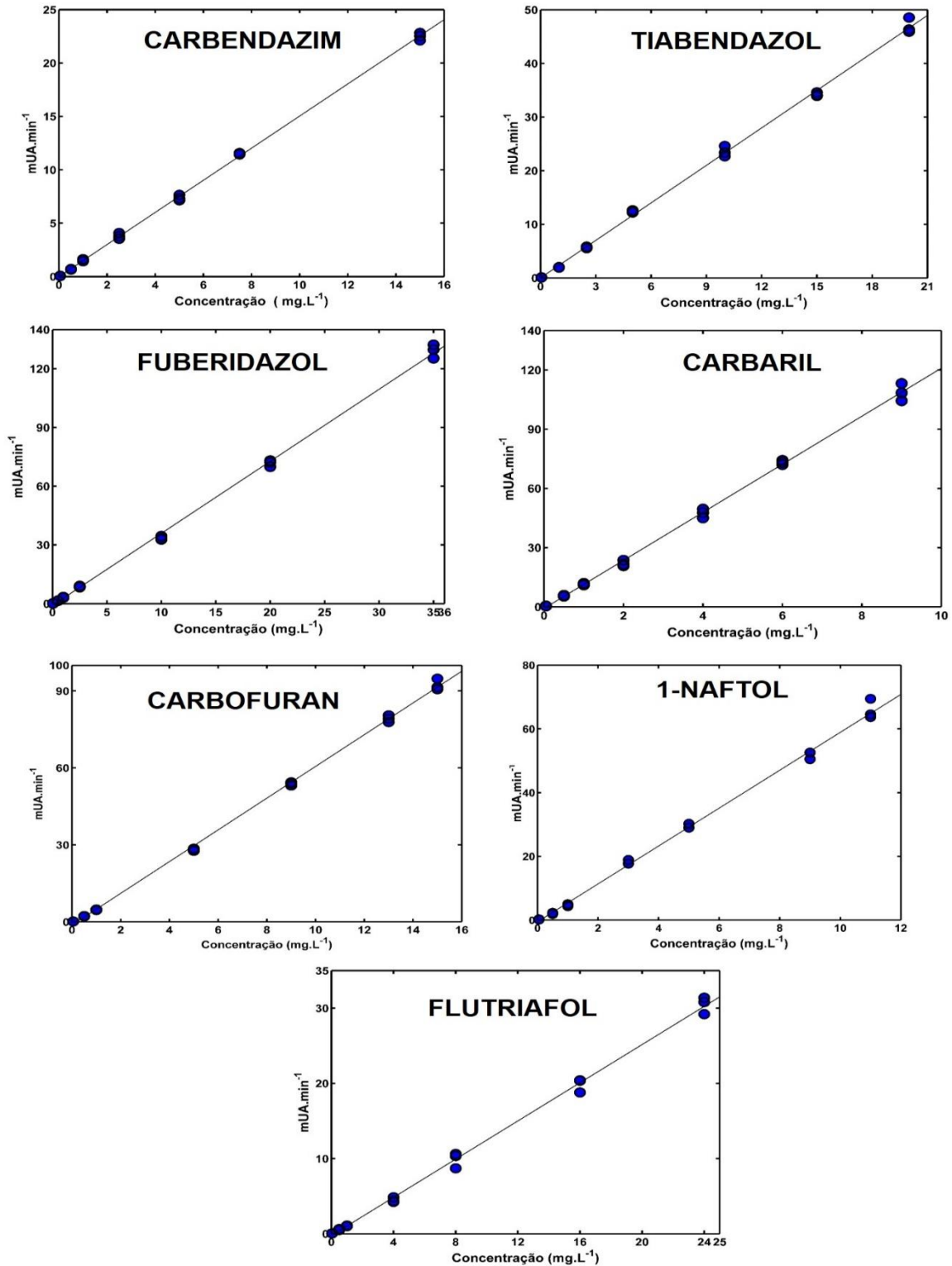


Figura 20: Curvas analíticas obtidas para os sete agrotóxicos

Com a finalidade de avaliar o modelo proposto obtido pela regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, usando medidas em triplicatas autênticas, foram avaliados os coeficientes de correlação linear e o desvio padrão do coeficiente linear das curvas obtidas para cada analito, apresentados na [Tabela 10](#).

Tabela 10: Equações das retas obtidas para cada modelo, desvio padrão, teste T com 20 graus de liberdade e o teste P para o coeficiente linear.

Analito	Equação	Desvio Padrão	T ₂₀	P
CBZ	$y = 1,51x - 0,005$	0,06	0,09	0,93
TBZ	$y = 2,33x + 0,02$	0,24	0,08	0,94
FBZ	$y = 3,68x - 0,86$	0,50	1,73	0,10
CBO	$y = 6,18x - 1,24$	0,40	3,16	0,005
CBR	$y = 12,17x - 0,77$	0,60	1,29	0,21
NFT	$y = 5,94x - 0,53$	0,47	1,11	0,28
FLT	$y = 1,27x - 0,23$	0,19	1,26	0,22

Analisando os valores da [Tabela 10](#) pode-se inferir que os resultados obtidos para carbendazim, tiabendazol, fuberidazol, carbaril, 1-naftol e flutriafol, possuem valores inferiores, quando comparamos o $t_{\text{crítico}}$, para 95% de confiança, com grau de liberdade igual a 20 (7 níveis de concentração, em triplicata), com valor tabelado de 2,086. Isso significa que o valor do coeficiente linear, não é significativo e pode ser interceptado no ponto zero.

Já para o carbofuran, o valor para o teste t mostra significância, implicando que o coeficiente linear deve ser levado em consideração, já que o resultado para esse teste, possui em módulo, um valor maior do que o tabelado. Um dos fatores para esses valores serem significativos é a contribuição da linha de base em 200 nm, mas a utilização do comprimento de onda maior diminui a sensibilidade e afeta o limite de detecção, por isso a escolha do menor comprimento de onda.

Esse efeito para o carbofuran já seria esperado uma vez que o comprimento de onda escolhido para esse analito (200 nm) sofre a influência da linha de base causada pela absorção do metanol, com ponto de corte próximo a esse comprimento de onda. A [Figura 21](#) apresenta a diferença na inclinação da linha de base para os comprimentos de 200 e 210 nm.

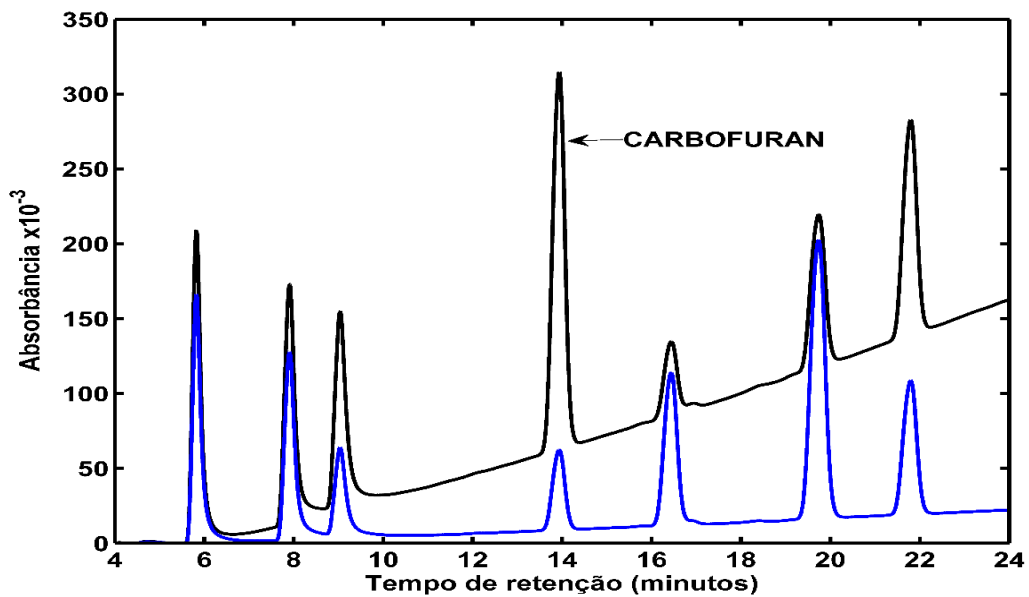


Figura 21: Cromatogramas em comprimentos de 200 nm (—) e 210nm (—)

Para o teste P, ou teste de hipótese, se fosse definido um nível de significância de 95%, tem-se um valor de α igual a 0,05, isso implica que valores, maior que esse não possuem significância estatística. Para o Carbofuran, observamos nesse teste que seu valor, é menor do que o α , e isso mostra que há significância estatística.

Além dessas análises dos parâmetros correlacionados aos coeficientes, ainda faz-se necessário uma análise da variância dos dados através das somas e médias quadráticas, afim de observar a significância da regressão e da falta de ajuste.

A análise de significância da regressão, é calculada, pela razão entre a média quadrática da regressão, e a média quadrática residual, (MQ_{reg}/MQ_{re}), devendo ter valores maiores que o ponto de distribuição F a um nível de 95% de confiança.

Para a significância da regressão, é possível compara-los ao F (tabelado), com pontos de distribuição, de 1 e 14 graus de liberdade, que possui valor igual a 4,60. Os resultados obtidos possuem significância elevada, visto que, os valores encontrados pela regressão, são maiores que o valor tabelado.

Para a falta de ajuste, que leva em consideração a razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste, e a média quadrática do erro puro, (MQ_{faj}/MQ_{ep}), podendo inferir que esse valor seja menor do que o encontrado para os valores tabelados de F de Snedecor, para os graus de liberdade descritos pelo modelo, também com nível de confiança de 95%. Os resultados obtidos, com pontos de distribuição de 5 e 14 graus de liberdade, que possui um valor de F (tabelado) de 2,96,

possui valores menores que o ponto de distribuição F (tabelado), e que não há falta de ajuste, mesmo que alguns valores sejam elevados, deve-se levar em consideração que os pontos do conjunto de calibração foram preparados em triplicatas autênticas.

A [Tabela 11](#) apresenta os valores obtidos para as somas e médias quadráticas, significância da regressão, falta de ajuste e o R^2 , de acordo com a [Tabela 4](#) descrita na [seção 2.4](#).

Tabela 11: Resultados da ANOVA para CBZ, TBZ, FBZ, CBR, CBO, NFT e FLT. Em vermelho, entre parênteses, estão os graus de liberdade.

Analito	Fonte de Variação	Soma Quadrática	Média Quadrática	F _{cal} Regressão	F _{cal} Falta de ajuste	R ²
CBZ	Regressão (1)	1164,72	1164,72	28226,41	1,27	99,93
	Resíduo (19)	0,78	0,04			
	Falta de Ajuste (5)	0,25	0,05			
	Erro Puro (14)	0,54	0,04			
TBZ	Regressão (1)	5663,64	5663,64	10408,60	1,86	99,82
	Residual (19)	10,34	0,54			
	Falta de Ajuste (5)	4,12	0,82			
	Erro Puro (14)	6,21	0,44			
FBZ	Regressão (1)	42704,7	42704,7	13459,64	2,52	99,86
	Residual (19)	60,28	3,17			
	Falta de Ajuste (5)	28,56	5,71			
	Erro Puro (14)	31,72	2,27			
CBR	Regressão (1)	29144,2	29,1442	8114,94	0,60	99,77
	Residual (19)	68,24	3,59			
	Falta de Ajuste (5)	12,00	2,40			
	Erro Puro (14)	56,23	4,01			
CBO	Regressão (1)	26410,7	26410,7	17706,02	2,67	99,89
	Residual (19)	28,34	1,49			
	Falta de Ajuste (5)	13,84	2,77			
	Erro Puro (14)	14,50	1,03			
NFT	Regressão (1)	11926,3	11926,3	5346,82	2,14	99,65
	Residual (19)	42,38	2,23			
	Falta de Ajuste (5)	18,36	3,67			
	Erro Puro (14)	24,02	1,72			
FLT	Regressão (1)	2437,19	2437,19	6105,14	0,40	99,69
	Residual (19)	7,58	0,39			
	Falta de Ajuste (5)	0,96	0,19			
	Erro Puro (14)	6,63	0,47			

4.3.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados com base nas com as equações 4 e 5 citadas nas seções 2.5.4 e 2.5.5 do capítulo 2. Seus valores estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Limites de detecção e quantificação obtidos para os agrotóxicos.

Analito	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	Desvio Padrão
CBZ	0,007	0,020	0,003
TBZ	0,011	0,030	0,008
FBZ	0,009	0,030	0,01
CBO	0,004	0,010	0,004
CBR	0,005	0,020	0,02
NFT	0,008	0,020	0,014
FLT	0,011	0,030	0,004

Foram realizados 10 ensaios, de acordo com a EUROCHEM e o INMETRO [61,65], para obter a estimativa do desvio padrão da resposta instrumental. Diante dessas repetições, determinou-se a menor concentração de detecção dos analitos, realizada pelas condições pré definidas, e a quantificação da menor concentração, com um nível de precisão.

Os resultados obtidos foram satisfatórios, visto que os limites de quantificação ficaram abaixo do menor valor da curva de calibração.

4.3.4 Precisão

A precisão foi calculada através do coeficiente de variação (CV), discutida na seção 2.5.6 no capítulo 2, realizada com a estimativa do desvio padrão e a média de sete repetições em quatro níveis distintos de concentração, assim como o estudo pelo teste t com graus de liberdade relacionados as medidas. A Tabela 13 mostra os resultados obtidos para o coeficiente de variação em quatro níveis, e em quatro semanas diferentes, mostrando a precisão intermediária.

Tabela 13: Resultados obtidos para a precisão da metodologia através do coeficiente de variação (CV) em porcentagem avaliada pela média das sete repetições nas quatro semanas de estudo.

Analito	Níveis de Concentração mg L ⁻¹	CV (%) 1ªsem	CV (%) 2ªsem	CV (%) 3ªsem	CV(%) 4ªsem
CBZ	0,1	2,95	1,33	3,33	2,75
	3,0	1,53	1,48	2,30	2,66
	6,0	1,21	1,77	1,45	1,19
	9,0	1,00	0,55	1,38	1,38
TBZ	0,1	1,41	2,98	3,84	2,50
	4,0	1,48	1,22	1,73	2,70
	8,0	0,83	2,11	2,04	1,17
	12	1,34	1,00	1,32	1,13
FBZ	0,1	1,94	1,99	2,82	3,55
	8,0	1,36	2,12	2,15	2,44
	12	0,79	1,38	1,59	1,24
	18	1,39	0,55	1,34	1,71
CBO	0,1	1,24	2,54	2,04	3,95
	2,0	1,87	1,81	2,33	3,29
	4,0	1,10	1,99	0,89	2,42
	6,0	1,11	0,48	0,67	0,84
CB	0,1	1,36	1,47	2,60	1,95
	1,0	1,52	1,79	2,15	2,07
	3,0	0,87	1,89	1,57	0,80
	5,0	1,18	0,44	1,32	1,74
NFT	0,1	1,60	3,16	2,61	2,18
	2,0	1,57	1,73	2,29	3,39
	4,0	1,91	1,89	1,18	1,28
	6,0	1,20	0,93	1,19	1,40
FLT	0,1	4,60	2,60	1,63	2,68
	5,0	1,70	4,61	1,72	2,11
	10	1,02	1,81	1,88	1,53
	15	1,19	0,59	0,73	1,88

É possível observar que os resultados obtidos para o parâmetro de precisão corroboram aos resultados previstos pelos órgãos nacionais normalizadores, visto que para a ANVISA, não deve haver variação maior do que 5%, tanto para a repetitividade, quanto na precisão intermediária (dias diferentes) [61].

Outra forma de avaliar a precisão é comparando os resultados obtidos, através da equação 7, descrita na seção 2.5.2, aos valores do teste t, para diferentes graus de liberdade. No caso da repetitividade, o valor tabelado para as 7 repetições, ou seja, 6 graus de liberdade é de 2,44, já para a precisão intermediária, o número de graus de

liberdade levados em consideração é 3, pois as medidas foram realizadas em 4 semanas diferentes, o valor de $t_{\text{crítico}}$ é de 3,18, a [Tabela 14](#) apresenta os resultados referentes à precisão, comparando-os ao teste de Student a 95% de confiança.

Tabela 14: Valores de precisão encontrados a partir do teste t de Student obtido para as quatro semanas, assim como a precisão interdia.

Analito	Níveis de Concentração mg L ⁻¹	r				
		1ªsem	2ªsem	3ªsem	4ªsem	Interdia
CBZ	0,1	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00
	3,0	0,14	0,12	0,19	0,22	0,13
	6,0	0,14	0,25	0,20	0,17	0,20
	9,0	0,18	0,11	0,29	0,29	0,26
TBZ	0,1	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
	4,0	0,23	0,19	0,27	0,42	0,09
	8,0	0,25	0,65	0,63	0,37	0,39
	12	0,64	0,48	0,63	0,54	0,25
FBZ	0,1	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	8,0	0,40	0,61	0,63	0,72	0,55
	12	0,34	0,59	0,70	0,54	0,72
	18	0,95	0,38	0,92	1,16	0,68
CBO	0,1	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00
	2,0	0,12	0,11	0,15	0,21	0,03
	4,0	0,16	0,29	0,13	0,35	0,10
	6,0	0,25	0,11	0,15	0,19	0,33
CB	0,1	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00
	1,0	0,05	0,06	0,07	0,07	0,05
	3,0	0,09	0,21	0,17	0,09	0,13
	5,0	0,22	0,08	0,25	0,33	0,37
NFT	0,1	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
	2,0	0,10	0,11	0,14	0,22	0,10
	4,0	0,25	0,25	0,16	0,17	0,03
	6,0	0,25	0,19	0,25	0,30	0,45
FLT	0,1	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
	5,0	0,29	0,79	0,30	0,36	0,07
	10	0,35	0,63	0,66	0,53	0,39
	15	0,65	0,32	0,41	1,06	0,94

Percebe-se que os valores para t nas repetições diárias, são inferiores ao valor de $t_{\text{crítico}}$, de 2,44, e para as precisões interdias, obtivemos valores menores que o $t_{\text{crítico}}$, para 3 graus de liberdade, de 3,18. De acordo com esses resultados conclui-se que a metodologia desenvolvida com o HPLC-DAD é considerada precisa e reprodutível, visto que os compostos estudados apresentaram bons desempenhos, nos testes de repetibilidade e precisão intermediária.

4.3.5 Exatidão

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada de acordo com o descrito no capítulo 2, seção 2.5.7

A Figura 22 apresenta a sobreposição dos cromatogramas dos quatro níveis de concentração. As concentrações para os quatro níveis estão apresentadas na Tabela 6

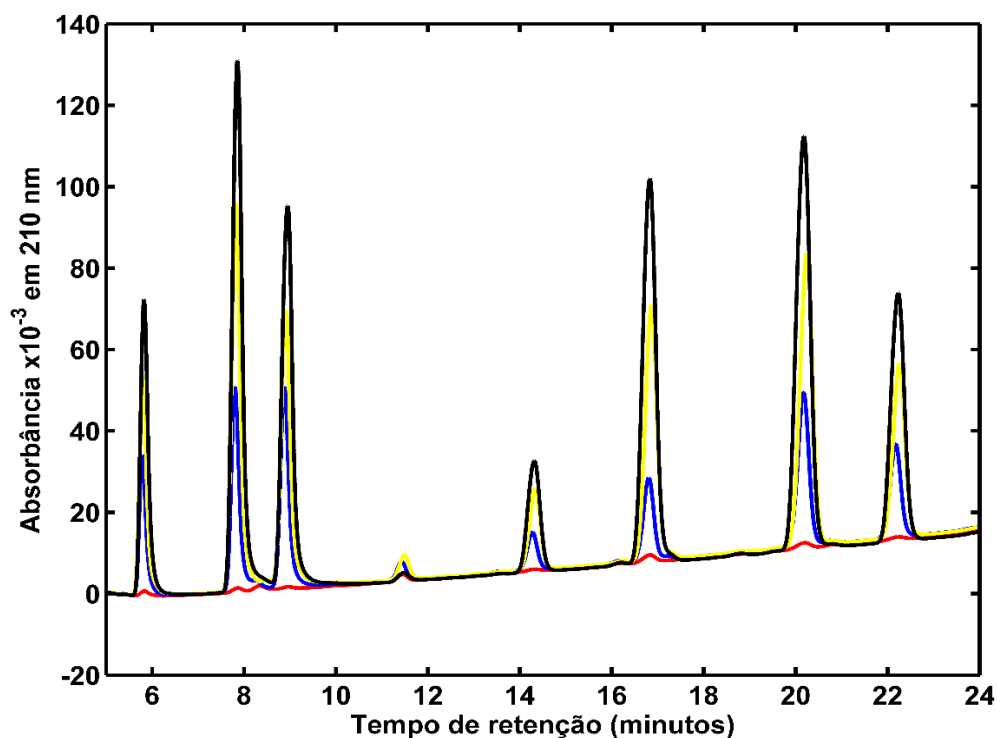


Figura 22: Sobreposição dos cromatogramas que representam as quatro concentrações escolhidas para o teste de precisão e exatidão.

Os valores dos ensaios de recuperação podem ser avaliados na Tabela 15.

Tabela 15: Resultados obtidos para as médias das recuperações para os ensaios de exatidão nos quatro níveis de concentração e as médias dos níveis.

Analito	Níveis de Concentração (mg.L ⁻¹)	Recuperação (%)
CBZ	0,1	97,9
	3,0	79,9
	6,0	66,7
	9,0	65,9
Média		77,6
TBZ	0,1	102
	4,0	111
	8,0	112
	12	115
Média		110
FBZ	0,1	102
	8,0	105
	12	104
	18	109
Média		105
CBO	0,1	88,3
	2,0	90,6
	4,0	104
	6,0	108
Média		97,7
CB	0,1	92,1
	1,0	94,8
	3,0	105
	5,0	107
Média		99,7
NFT	0,1	71,4
	2,0	92,3
	4,0	94,7
	6,0	100
Média		89,6
FLT	0,1	108
	5,0	98,5
	10	100
	15	107
Média		103,4

Verificou-se resultados satisfatórios com valores de recuperação no intervalo de 77,5 e 110%, como previsto pela ANVISA e pelo INMETRO [61,62].

Embora o carbendazim tenha apresentado recuperação inferior a 70% nos níveis 3 e 4, ainda pode-se considerar satisfatório, pois a exatidão é obtida pela média dos níveis de fortificações escolhidos. Mesmo assim, foram realizados testes para identificar se possivelmente poderia haver efeito matriz proveniente da extração.

4.3.6 Efeito matriz

A fim de analisar o efeito de matriz proveniente do processo de extração foi realizado o teste t pareado comparando as curvas obtidas para os analitos apenas no solvente puro e nos extraídos com fortificação.

Para essa avaliação foram utilizados as quatro concentrações estudadas nos testes de precisão e exatidão. A Tabela 16 mostra o resultados obtidos para os testes t pareado, onde as concentrações são iguais para efeito de comparação.

Tabela 16: Teste t pareado para análise do efeito matriz proveniente do processo de extração.

Analito	Equação da reta para padrões externos	Equação da reta para extração	t
Carbendazim	$y = 1,50x - 0,22$	$y = 0,97x + 0,28$	1,07
Tiabendazol	$y = 2,61x - 0,32$	$y = 2,65x - 0,18$	0,08
Fuberidazol	$y = 4,05x - 0,97$	$y = 4,07x - 0,92$	0,02
Carbofuran	$y = 6,28x - 0,70$	$y = 6,74x - 1,02$	0,02
Carbaril	$y = 10,66x - 1,21$	$y = 13,09x - 0,97$	0,58
1-Naftol	$y = 7,36x - 1,03$	$y = 6,04x - 0,64$	0,56
Flutriafol	$y = 1,29x - 0,04$	$y = 1,34x - 0,27$	0,05

O teste t apresentou um t tabelado de 1,79, mostrando que não há efeito de matriz dos padrões externos e dos padrões extraídos para essas concentrações trabalhadas.

As curvas obtidas podem ser vistas na Figura 23, onde o carbendazim, carbaril e 1-naftol apresentaram visivelmente um desvio nas curvas, mas que de acordo com os testes estatísticos foram consideradas significativamente iguais. As retas de cor preta, são os pontos de padrões externos, ou seja, os padrões preparados em solventes, e as curvas coloridas, representam os padrões extraídos.

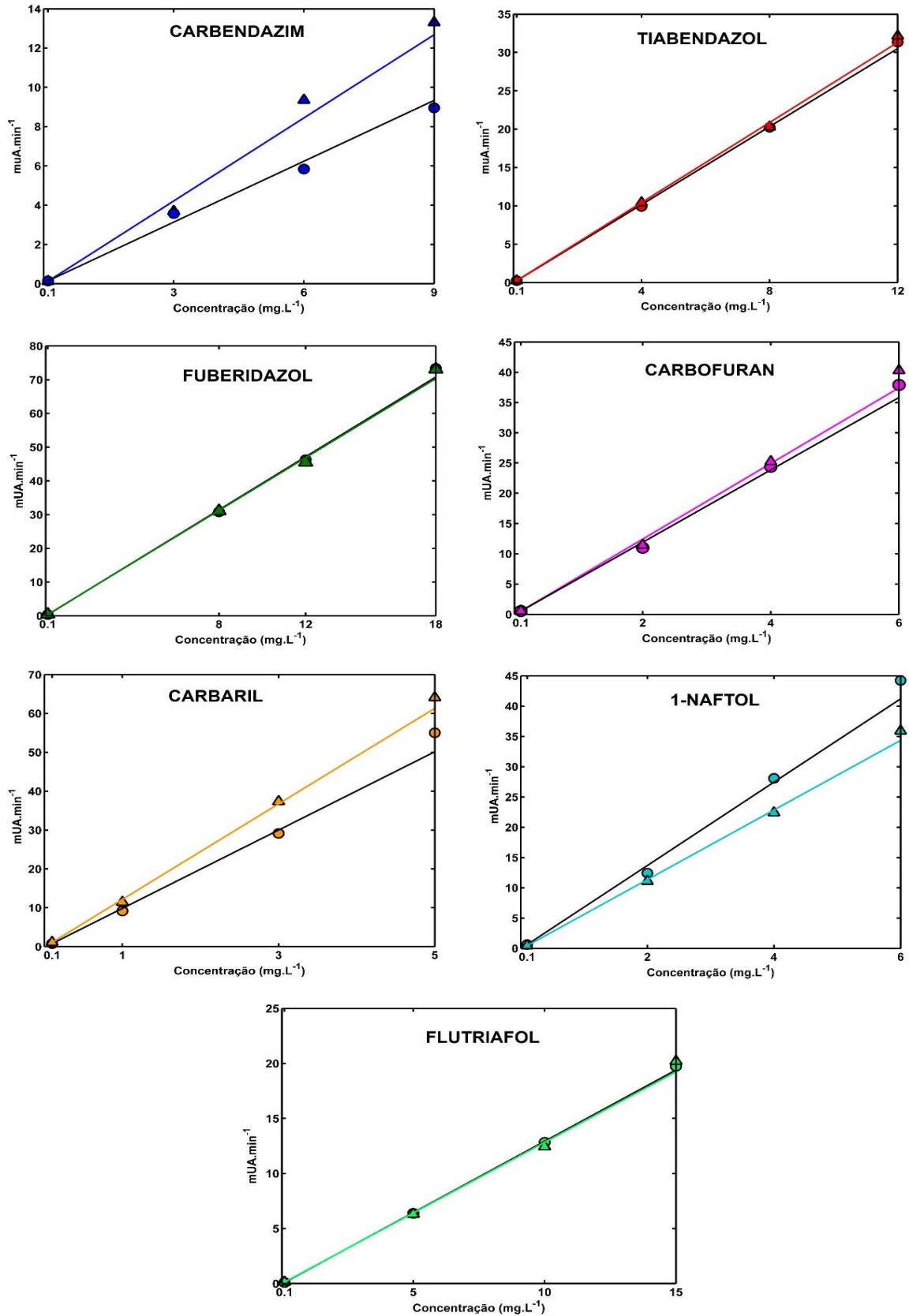


Figura 23: Regressões obtidas para o efeito matriz. Em (—) estão as retas para os padrões em solventes, e em colorido, as retas após extração. Carbendazim (—), Tiabendazol (—), Fuberidazol (—), Carbofuran (—), Carbaril (—), 1-Naftol (—) e Flutriafol (—).

4.4 Aplicação do método desenvolvido nas amostras

4.4.1 Efeito matriz nas amostras

Foi realizado um teste de efeito matriz comparando os dados das amostras de hortaliças com os resultados obtidos para os padrões extraídos. Para contornar o efeito matriz das amostras foi realizada adição de padrão.

A seguir serão discutidos os resultados por analito mostrando os valores estatísticos, testes t e F, para 8 graus de liberdade.

Para o teste t pareado o valor de $t_{\text{crítico}}$ para 8 graus de liberdade é de 1,86. Para o teste F, o valor tabelado é de 3,44, sendo os dois avaliados a um nível de 95% de confiança.

4.4.1.1 Carbendazim

As fortificações das amostras foram realizadas em três pontos, 3, 6 e 9 mg L⁻¹.

A [Tabela 17](#) apresenta os valores do teste t e F, e a recuperação média para cada cultura quando não houve efeito matriz.

Tabela 17: Análise estatística para o efeito matriz do carbendazim, concentração encontrada para o analito nas diferentes culturas e recuperação média.

Carbendazim	Concentração (mg L ⁻¹)	t	F	Recuperação Média (%)
Alface	<LOQ	1,74	0,21	99,1
Couve	0,21	2,09	0,002	Efeito matriz
Cenoura	ND	0,22	0,35	66,3
Beterraba	ND	1,35	0,37	88,4
Tomate	<LOQ	3,76	0,29	Efeito matriz
Pimentão	0,24	3,66	0,25	Efeito matriz

Sendo: ND- Não detectável e LOQ- Limite de Quantificação

Com base nessas informações, conclui-se que o carbendazim apresentou efeito matriz nas amostras de tomate, couve e pimentão, além disso o ponto de maior fortificação foi retirado da amostra de couve devido a inconsistência no resultado

Na [Figura 24](#) pode-se observar as regressões geradas para representar as diferenças provenientes de amostras com efeito matriz. Em preto, está a regressão obtida com os padrões fortificados, e as cores, azul, verde, laranja, magenta, vermelho e amarelo, representam as regressões para alface, couve, cenoura, beterraba, tomate

e pimentão, respectivamente. Os pontos que estão em zero, são os pontos encontrados na amostra sem fortificação.

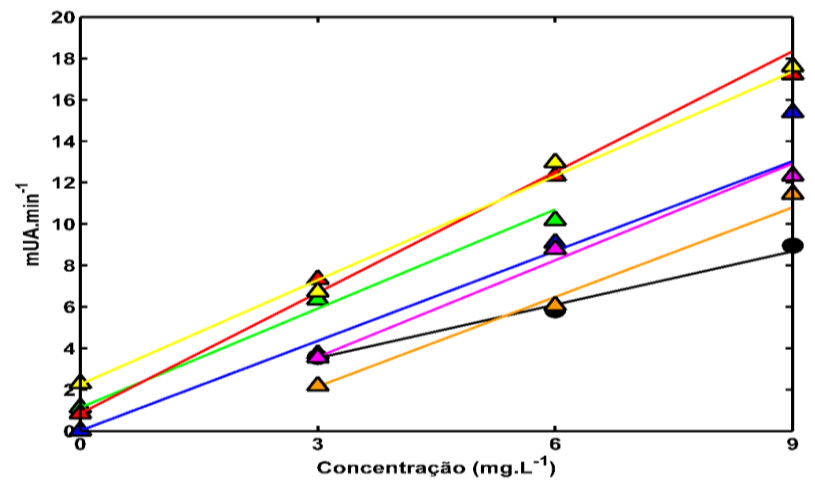


Figura 24: Regressões obtidas para o carbendazim nas culturas de alfaca (—), couve (—), cenoura (—), tomate (—), beterraba (—) e pimentão (—) e em (—) estão os padrões que foram apenas extraídos.

O carbendazim apresenta efeito de matriz ser o analito com menor retenção na coluna, podendo sofrer interferência de outras substâncias presentes na matriz.

Para a couve e o pimentão a concentração obtida foi de 0,21 e 0,24 mg.Kg⁻¹, respectivamente. O cálculo para obtenção das concentrações está descrito na [Equação 12](#), na [seção 3.4](#)

Segundo os órgãos normalizadores, como o PARA [10] e o Codex [30], não há autorização para o uso desse agrotóxico nessas culturas, e para o código europeu [6], valores acima de 0,01 mg.Kg⁻¹ não são aceitos

4.4.1.2 Tiabendazol

Para o Tiabendazol, as concentrações escolhidas para fortificação foram de 4, 8 e 12 mg L⁻¹, sendo realizado o mesmo procedimento de pré concentração descrito na [seção 3.4](#). A [Tabela 18](#) é apresentado os resultados das análises estatísticas

Tabela 18: Análise estatística para o efeito matriz do tiabendazol, concentração encontrada para o analito nas diferentes culturas e a recuperação média.

Tiabendazol	Concentração (mg L ⁻¹)	t	F	Recuperação Média (%)
Alface	ND	0,01	0,21	110,3
Couve	0,44	1,11	2,52	60,47
Cenoura	ND	0,67	0,99	92,57
Beterraba	<LOQ	0,09	0,97	113,7
Tomate	0,03	1,87	1,82	Efeito matriz
Pimentão	ND	0,10	0,96	108,8

Sendo: ND- Não detectável e LOQ- Limite de Quantificação

Na cultura de couve pode-se observar uma recuperação abaixo de 70%, mas o que indicam os testes estatísticos é que não há efeito de matriz nessa amostra; apenas o tomate apresentou um valor de t-Student um pouco acima do valor tabelado (1,86).

Na [Figura 25](#) é possível ver as regressões obtidas para os pontos de fortificação escolhidos.

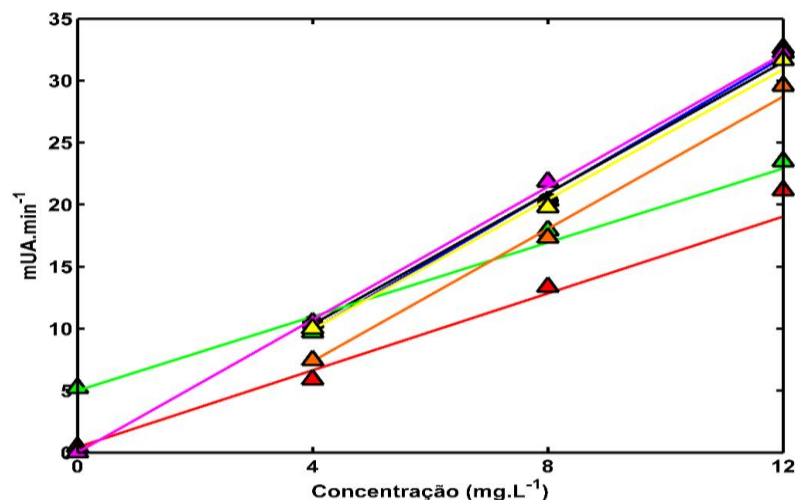


Figura 25: Regressões obtidas para o tiabendazol nas culturas de alface (—), couve (—), cenoura (—), tomate (—), beterraba (—) e pimentão (—), em (—) estão os padrões que foram apenas extraídos.

Foram encontrados para a amostra de couve uma concentração de 0,04 mg kg⁻¹, e 0,03 mg kg⁻¹ para a amostra de tomate. Para essas culturas, segundo o PARA [10] e o Codex [30] não há autorização para esse analito, sendo autorizado apenas na cultura de pimentões, além disso, essas concentrações estão acima do permitido pela comissão europeia de 0,01 mg kg⁻¹ [6].

4.4.1.3 Fuberidazol

As análises estatísticas para esse analito podem ser verificadas através da [Tabela 19](#)

Tabela 19: Análise estatística para o efeito matriz para o fuberidazol, concentração encontrada para o analito nas diferentes culturas e recuperação média.

Fuberidazol	Concentração (mg L ⁻¹)	t	F	Recuperação Média (%)
Alface	<LOQ	0,52	1,21	97,6
Couve	ND	6,95	36,35	Efeito matriz
Cenoura	ND	1,92	0,99	Efeito matriz
Beterraba	ND	0,66	1,44	96,0
Tomate	0,05	0,29	1,02	99,0
Pimentão	ND	1,42	1,78	83,7

Sendo: ND- Não detectável e LOQ- Limite de Quantificação

As regressões obtidas, comparando os resultados das hortaliças com os padrões extraídos, podem ser vistos na [Figura 26](#). É visivelmente notório que o efeito matriz ocorre nas culturas de cenoura e couve.

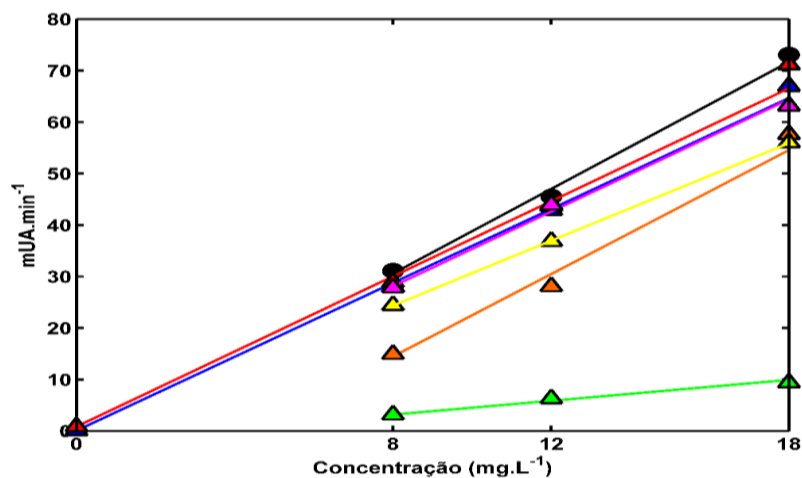


Figura 26: Regressões obtidas para o fuberidazol nas culturas de alface (—), couve (—), cenoura (—), tomate (—), beterraba (—) e pimentão (—), em (—) estão os padrões que foram apenas extraídos.

Os órgãos normalizadores, PARA e Codex não apresentam limites máximos para essas culturas, no entanto, de acordo o código europeu, fica estabelecido, que o valor máximo para agrotóxicos em alimentos é de 0,01 mg kg⁻¹, dessa forma a concentração encontrada no tomate foi de 0,05 mg kg⁻¹, o que mostra que essa amostra possui concentração do analito superior ao permitida [6,10,30].

4.4.1.4 Carbofuran

As amostras reais foram fortificadas em três níveis com concentrações de 2, 4 e 6 mg L⁻¹. A Tabela 20 apresenta os resultados obtidos para o teste t e F, assim como, a concentração encontrada na amostra sem fortificação (quando foi possível ser detectada).

Tabela 20: Análise estatística para o efeito matriz para o carbofuran, concentração encontrada para o analito nas diferentes culturas e recuperação média.

Carbofuran	Concentração (mg L ⁻¹)	t	F	Recuperação Média (%)
Alface	<LOQ	0,60	1,35	88,7
Couve	0,31	2,00	1,28	Efeito matriz
Cenoura	0,01	0,29	1,34	94,2
Beterraba	0,10	0,48	1,23	100,7
Tomate	0,01	0,43	1,29	90,2
Pimentão	<LOQ	0,48	1,12	116,3

Sendo: ND- Não detectável e LOQ- Limite de Quantificação

A Figura 27, mostra as regressões para cada amostra, com os efeitos de matriz. Em preto, está a curva dos padrões extraídos.

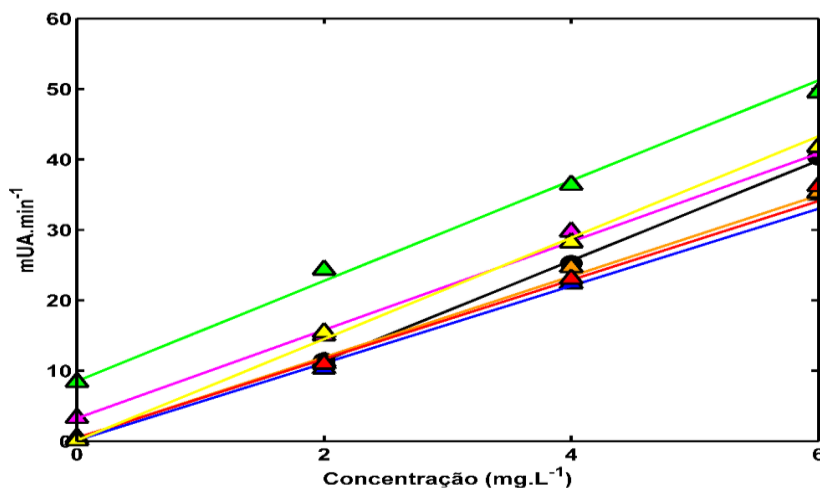


Figura 27: Regressões obtidas para o carbofuran nas culturas de alface (—), couve (—), cenoura (—), tomate (—), beterraba (—) e pimentão (—), em (—) estão os padrões que foram apenas extraídos.

Foram detectadas a presença de carbofuran, em todas as amostras de hortaliças, mas apenas no couve e na beterraba houve a quantificação

Pelo Codex, a utilização de carbofuran é feita em culturas de alface (5 mg Kg^{-1}) cenoura ($0,5 \text{ mg Kg}^{-1}$), tomate ($0,5 \text{ mg Kg}^{-1}$) e beterraba ($0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$). Já para o PARA apenas as culturas de cenoura e tomate, dentre as amostras em trabalho, podem fazer uso desse agrotóxico com concentrações de até $0,5 \text{ mg Kg}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$, respectivamente. Para a cultura de beterraba esse inseticida não é autorizado [30].

Dessa forma, foi detectada uma concentração de $0,31 \text{ mg Kg}^{-1}$ na amostra de couve e aproximadamente $0,01 \text{ mg Kg}^{-1}$, nas amostras de beterraba, cenoura e tomate, essas, abaixo do limite permitido.

4.4.1.5 Carbaril

Para o carbaril, um inseticida, que pode ser utilizado em culturas, como algodão, abacaxi, batata, alho, couve-flor, pepino, e tomate, uma das hortaliças escolhidas nesse estudo [10]. Foram realizados testes estatísticos, afim de identificar as amostras que apresentaram efeito matriz, ou seja, valores de t tabelado maiores que 1,86.

Para a realização desse teste, foram feitas fortificações na amostras reais em três níveis de concentração, 1,3 e 5 mg L^{-1} . Na Tabela 21 encontram-se os valores de t, F, a recuperação média obtida para cada cultura, e a concentração encontrada em cada amostra.

Tabela 21: Valores do teste t e F para o analito carbaril, recuperação média e concentração encontrada em cada amostra

Carbaril	Concentração (mg L^{-1})	t	F	Recuperação Média (%)
Alface	ND	0,84	1,53	79,3
Couve	0,01	0,21	1,40	101
Cenoura	<LOQ	0,93	1,66	76,8
Beterraba	<LOQ	0,70	1,49	82,7
Tomate	ND	2,04	2,41	Efeito matriz
Pimentão	ND	0,81	1,44	78,9

Sendo: ND- Não detectável e LOQ- Limite de Quantificação

Observa-se que a amostra de tomate apresenta um valor para t maior do que o esperado, embora o teste F, esteja de acordo com o valor tabelado, isso significa, que os valores para o teste F não apresentam variância nos resultados obtidos nos níveis de fortificação, mas distingue-se dos valores obtidos apenas com os padrões extraídos. Na Figura 28 observa-se as regressões obtidas para cada amostra.

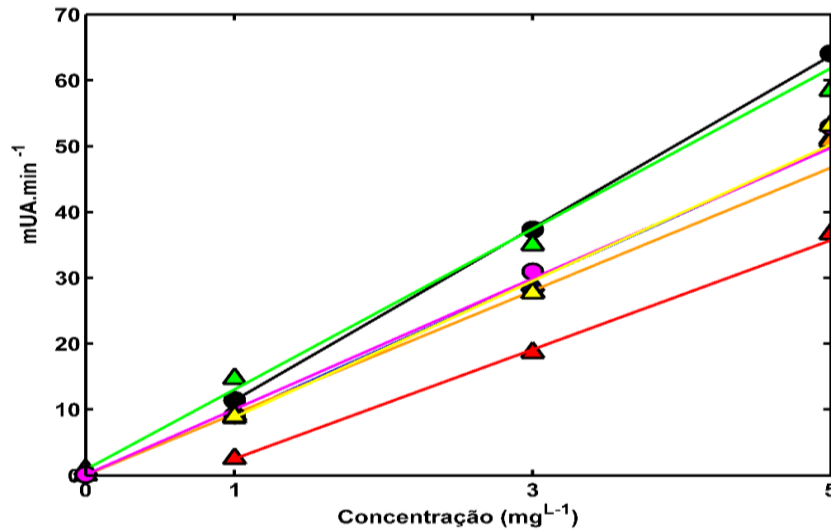


Figura 28: Regressões obtidas para as culturas de alface (—), couve (—), cenoura (—), tomate (—), beterraba (—) e pimentão (—), em (—) estão os padrões que foram extraídos do carbaril

Apenas na amostra de couve foi possível quantificar o Carbaril, embora não haja registro do limite máximo desse analito permitido nessa cultura, nem no *Codex*, nem em avaliações realizadas pelo PARA, dessa forma uma concentração de 0,01 mg kg⁻¹, foram encontrada nessa amostra, em outras culturas, não foi detectado, ou o valor encontrado ficou abaixo do LOQ [10,30].

4.4.1.6 1-Naftol

Como discutido no capítulo 2, na seção 2.1.1.2, o 1 naftol não é um agrotóxico, mas é produto de degradação do carbaril, ocasionado pela variação de pH, temperatura e fotólise, essas mudanças ocasionam a hidrólise do carbaril, realizando a formação do 1-Naftol [71]. Não há limites estabelecidos para esse analito

A Tabela 22 mostram os valores do teste t e F, a recuperação média, e as concentrações encontradas nas amostras. Da mesma forma que os outros analitos também foram realizadas fortificações em três níveis, 2,4 e 6 mg L⁻¹, assim como a pré concentração dos extratos obtidos, afim de obter concentrações próximo ao LOQ.

Tabela 22: Valores do teste t e F para o analito 1-naftol, recuperação média e concentração encontrada em cada amostra

1-Naftol	Concentração (mg L ⁻¹)	t	F	Recuperação Média (%)
Alface	ND	4,16	7,49	Efeito matriz
Couve	0,01	0,77	0,71	112,4
Cenoura	ND	0,57	0,86	79,0
Beterraba	ND	0,45	1,01	84,8
Tomate	<LOQ	0,11	1,01	93,9
Pimentão	ND	0,92	1,27	76,3

Sendo: ND- Não detectável e LOQ- Limite de Quantificação

Embora não conste na lista de agrotóxicos do PARA e do *Codex* o LMR para esse analito, ainda sim, foram encontradas na amostra de couve uma concentração de 0,01 mg kg⁻¹

A [Figura 29](#) mostra as regressões para cada amostra, confirmando que a amostra de alface, em azul, possui efeito de matriz.

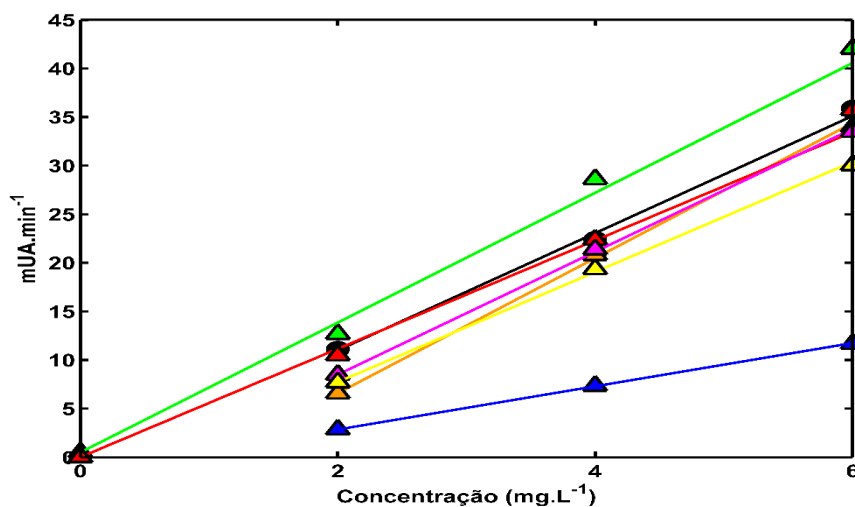


Figura 29: Regressões obtidas para o teste efeito matriz nas amostras de alface (—), couve (—), cenoura (—), beterraba (—), tomate (—) e pimentão (—). Em (—), estão os padrões nos três níveis de fortificação de 1-naftol

4.4.1.7 Flutriafol

Para o Flutriafol, foram realizadas fortificações nas concentrações de 5,10 e 15 mg L⁻¹, para a verificação do efeito de matriz, comprovada pelo teste t emparelhado, e pelo teste F. A [Tabela 23](#) apresenta os resultados obtidos para os testes de efeito matriz, a recuperação média para cada amostra e a concentração encontrada na amostra sem fortificação.

Tabela 23: Valores do teste t e F para o analito flutriafol, recuperação média e concentração encontrada em cada amostra.

Flutriafol	Concentração (mg L ⁻¹)	t	F	Recuperação Média (%)
Alface	<LOQ	0,89	1,34	82,1
Couve	ND	0,83	0,99	79,6
Cenoura	<LOQ	0,39	1,17	91,8
Beterraba	0,12	0,25	1,13	102,0
Tomate	0,05	0,27	1,24	107,1
Pimentão	ND	0,00	1,03	101,5

Sendo: ND- Não detectável e LOQ- Limite de Quantificação

Pelo testes t e F o Flutriafol não apresentou nenhum efeito de matriz, mesmo assim pode-se avaliar na [Figura 30](#) as regressões obtidas comparando os resultados encontrados pelos padrões extraídos e as curvas obtidas das amostras reais.

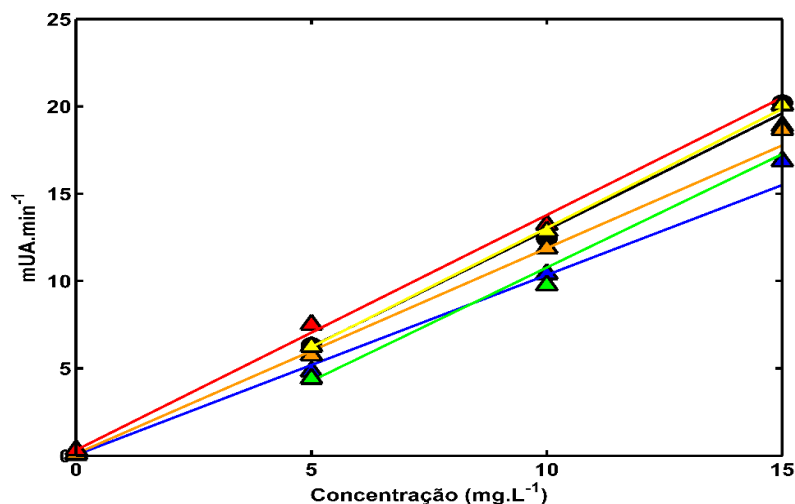


Figura 30: Regressões obtidas para o teste efeito matriz nas amostras de alface (—), couve (—), cenoura (—), beterraba (—), tomate (—) e pimentão (—). Em (—) estão os padrões nos três níveis de fortificação do flutriafol.

Não foi detectado flutriafol nas amostras de pimentão e couve, mas para as amostras de beterraba e tomate quantificou-se 0,12mg kg⁻¹ e 0,05 mg kg⁻¹, respectivamente.

De acordo com o PARA [10] apenas nas culturas de tomate é autorizada a utilização de pesticida, com limite máximo permitido de 0,1 mg kg⁻¹ e para o Codex [30] apenas o pimentão, que não foi detectado dentre as hortaliças em estudo, tem autorização para o uso desse analito.

Para a cultura de beterraba não há especificações nesses órgãos normalizadores, citados anteriormente, mas, pelo código europeu, o limite máximo de resíduos excede o valor estabelecido de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$

É apresentado na [Tabela 24](#) um resumo das concentrações encontradas nas amostras de couve, alface, cenoura, beterraba, tomate e pimentão, assim como as concentrações permitidas pelo PARA e pelo *Codex* [10,30], comparando os limites máximos de resíduos permitidos para cada cultura.

Tabela 24: Resumo das concentrações (mg kg⁻¹) encontradas a partir da metodologia desenvolvida e os limites estabelecidos para os órgãos normalizadores como o PARA e Codex.

Agrotóxicos	CBZ	TBZ	FBZ	CBO	CB	NFT	FLT	PARA	Codex
Hortalças									
Alface	<LOQ	ND	<LOQ	<LOQ	ND	ND	<LOQ	NA	CBZ (5 mg Kg ⁻¹) CBO (5mg Kg ⁻¹)
Couve	0,21	<LOQ	ND	0,31	<LOQ	<LOQ	ND	NA	NA
Cenoura	ND	ND	ND	<LOQ	<LOQ	ND	<LOQ	CBO (0,5 mg Kg ⁻¹)	CB (0,2 mg Kg ⁻¹) CBO (0,5 mg Kg ⁻¹)
Beterraba	ND	<LOQ	ND	<LOQ	<LOQ	ND	0,12	NA	CBZ (0,1 mg Kg ⁻¹) CBO (0,1 mg Kg ⁻¹)
Tomate	<LOQ	<LOQ	0,05	<LOQ	ND	<LOQ	0,05	CBZ (0,2 mg Kg ⁻¹)	CBZ (0,5 mg Kg ⁻¹)
								CBO (0,1 mg Kg ⁻¹)	CBO (0,5 mg Kg ⁻¹)
								CB (0,1 mg Kg ⁻¹)	CB (5 mg Kg ⁻¹)
								FLT (0,1 mg Kg ⁻¹)	
Pimentão	0,24	ND	ND	<LOQ	ND	ND	ND	TBZ (2 mg Kg ⁻¹)	CB (5mg Kg ⁻¹) FLT (1mg Kg ⁻¹)

NA- Nenhum dos agrotóxicos trabalhados, são autorizados para essa cultura

LOQ- Limite de Quantificação

ND- Analito não detectado na amostra real, sem fortificação.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 Conclusões

Neste trabalho foi desenvolvida e validada uma metodologia baseada na cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos, para quantificar sete pesticidas (carbendazim, tiabendazol, fuberidazol, carbofuran, carbaril, 1-naftol e flutriafol) em amostras de alface, couve, cenoura, beterraba, tomate e pimentão

Para o preparo das amostras foi utilizado o método de extração líquido-líquido com partição em fase sólida (QuEChERS), o qual apresentou melhores resultados de recuperação, comparados ao método DLLME. Ainda realizou-se a otimização da metodologia de extração, em busca da redução da massa de amostra, bem como a redução de solvente extrator. A etapa de limpeza do QuEChERS com C18 ou PSA foi suprimida pois os mesmos influenciam na recuperação de compostos planares como tiabendazol e fuberidazol.

A aplicação da metodologia as amostras reais permitiu a quantificação de 0,21 mg kg⁻¹ de carbendazim e 0,31 mg kg⁻¹ de carbofuran na amostra de couve, assim como 0,12 mg kg⁻¹ de flutriafol na amostra de beterraba, 0,05 mg kg⁻¹ de fuberidazol e flutriafol na amostra de tomate e 0,24 mg kg⁻¹ de carbendazim na amostra de pimentão.

Todas as concentrações quantificadas estão dentro dos limites permitidos pelos órgãos normalizadores, mas foi possível identificar que o uso dos agrotóxicos não segue as normas técnicas de aplicações definidas para cada cultura.

Na etapa de validação do método analítico pode-se concluir que:

- O método proposto possui boa seletividade;
- As curvas analíticas apresentaram significância nas regressões de acordo com os resultados obtidos pela ANOVA
- O coeficiente de variação foi inferior a 5%, como definido pela ANVISA sendo trabalhados quatro níveis de concentrações para os estudos de precisão e exatidão.
- As taxas de recuperações dos agrotóxicos extraídos apresentaram bons resultados com valores médios entre 77,5 e 110%

- Na avaliação de estabilidade as soluções padrão apresentaram-se estáveis durante o período de 4 semanas.

5.2 Propostas Futuras

- Desenvolver um método que empregue uma quantidade maior de pesticidas, associando a calibração de ordem superior, para reduzir o tempo da corrida cromatográfica.
- Avaliar a metodologia proposta em outros alimentos.
- Realizar *data fusion* para melhorar os parâmetros de qualidade analítica, principalmente seletividade e sensibilidade.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. M.Alamgir Zaman Chowdhurya. A.N.M. Fakhruddin; Md. Nazrul Isla; Mohammed Moniruzzamana; Siew Hua Gan; Md. Khorshed Alam. Detection of the residues of nineteen pesticides in fresh vegetable samples using gas chromatography-mass spectrometry. *Food Control* 34 (2013) 457e465.
2. Valeria Boeris, Juan A. Arancibia, Alejandro C. Olivieri. Determination of five pesticides in juice, fruit and vegetable samples by means of liquid chromatography combined with multivariate curve resolution. *Analytica Chimica Acta* 814 (2014) 23–30.
3. Lukman Bola Abdulra'uf, Guan Huat Tan. Chemometric approach to the optimization of HS-SPME/GC–MS for the determination of multiclass pesticide residues in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 177 (2015) 267–273.
4. Magalhães, M. A. S. Exposição a agrotóxicos na atividade agrícola: um estudo de percepção de riscos à saúde dos trabalhadores rurais no Distrito de Pau Ferro – Salgueiro/PE/. 146f. Dissertação de mestrado em Saúde Pública. Centro de Pesquisa Ageu Magalhães. Fundação Oswaldo Cruz. Recife. 2010.
5. Wu. Q; Li. Y; Wang. C; Liu. Z; Zang. X; Zhou. X; Wang. Z. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography–fluorescence detection for the determination of carbendazim and thiabendazole in environmental samples. *Analytica Chimica Acta* 638 (2009) 139–145.
6. Jornal Oficial da União Europeia, Rulamentação (EC) Nº 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 fevereiro 2005 relativo aos limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície dos gêneros alimentícios e dos alimentos para animais, de origem vegetal ou animal, e que altera a Directiva 91/414/CEE do Conselho.
7. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [Online] [Acessado em 29 de março de 2015]. Disponível em: <http://www.fao.org/home/en/>.
8. U.S. Department of Health & Human Services. U.S. Food and Drug Administration. [Online] [Acessado em 15 de outubro de 2015]. <http://www.fda.gov/>.
9. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agrotóxicos e Toxicologia. Portal ANVISA. [Online] [acessado em 15 de outubro de 2015.] <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia>.
10. ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) Relatório de Atividades de 2011 e 2012. Outubro de 2013

11. MAPA. Ministério da agricultura pecuária e abastecimento. *Análise de Resíduos e Contaminantes em Alimentos*. [Online] [acessado em 15 de outubro de 2015]. www.agricultura.gov.br.
12. Soares, W. L. *Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a Agricultura*. 150f. Tese de Doutorado. Escola Nacional de Saúde Pública Arouca. Rio de Janeiro. 2010.
13. Ministério do Meio Ambiente. *Segurança Química. Convenção de Estocolmo*. [Online] [acessado em 15 de outubro de 2015]. <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/convencao-de-estocolmo>.
14. Zbynek D.; Milena Z.; Zdenka V.; Michal G.; Jana H. Multi-analyte high performance liquid chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry method for control of pesticide residues, mycotoxins, and pyrrolizidine alkaloids. *Analytica Chimica Acta* 863 (2015) 29–40.
15. Sinha. S. N; Rao. M.V.V; Vasudev. K; Distribution of pesticides in different commonly used vegetables from Hyderabad, India. *Food Research International* 45 (2012) 161–169.
16. Camino-Sánchez. F.J.; Zafra-Gómezb. A.; Ruiz-García. J; Bermúdez-Peinado. J. O. Ballesteros; A. Navalon; José L. Vílchez. 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* 24 (2011) 427–440.
17. Hanot. V, Gosciny. S, Deridder. M. A simple multi-residue method for the determination of pesticides in fruits and vegetables using a methanolic extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Optimization and extension of scope. *Journal of Chromatography A*, 1384 (2015) 53–66.
18. Gómez-Ramos. M.M; Ferrer C; Malato. O; Agüera. O; Fernández-Alba. A.R. Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in fruit and vegetables: Screening and quantitative studies. *Journal of Chromatography A*, 1287 (2013) 24– 37.
19. Li. Y.F.; Qiaob. L.Q.; Li. F.W.; Dinga. Y.; Yang. Z. J.; Wanga. Z. J. Determination of multiple pesticides in fruits and vegetables using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method with magnetic nanoparticles and gas

- chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1361 (2014) 77–87.
20. Watanabe. E.; Kobara. Y.; Baba. K.; Eun. H. Aqueous acetonitrile extraction for pesticide residue analysis in agricultural products with HPLC-DAD. *Food Chemistry* 154 (2014) 7–12.
 21. Melo. A.; Aguiar. A.; Mansilha. C.; Pinho. O.; Ferreira. I.M.P.L.V.O. Optimisation of a solid-phase microextraction/HPLC/Diode Array method for multiple pesticide screening in lettuce. *Food Chemistry* 130 (2012) 1090–1097.
 22. Wu. Q; Li. Y; Wang. C; Liu. Z; Zang. X; Zhou. X; Wang. Z. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography–fluorescence detection for the determination of carbendazim and thiabendazole in environmental samples. *Analytica Chimica Acta* 638 (2009) 139–145.
 23. Kin. C. M; Huat. T. G. Headspace solid-phase microextraction for the evaluation of pesticide residue contents in cucumber and strawberry after washing treatment. *Food Chemistry* 123 (2010) 760–764.
 24. Cesarino. I; Moraes. F. C; Lanza. R. V. Z; Machado. S. A. S. Electrochemical detection of carbamate pesticides in fruit and vegetables with a biosensor based on acetylcholinesterase immobilised on a composite of polyaniline–carbon nanotubes. *Food Chemistry* 135 (2012) 873–879.
 25. Wang. Y; Xiao. L; Cheng. M. Determination of phenylureas herbicides in food stuffs based on matrix solid-phase dispersion extraction and capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 9115–9119.
 26. IUPAC- Internacional Union of pure and applied Chemistry. [Online] [Acessado em 30 de outubro de 2015]. Disponível em http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31.
 27. G. Matthews, *Pesticides: Health, Safety and the Environment*, Wiley-Blackwell, 2006, 248p.
 28. BRASIL. Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989. Lei federal de agrotóxicos, Brasília, DF. [Online] [acessado em: 07 de novembro de 2015]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L7802.htm
 29. Londres, F. *Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida*. – Rio de Janeiro. AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011. 190 p

30. Peres, F.; Moreira, J.C. (Ed.). *É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. 384p.
31. Baird, C; Cann, M. *Química Ambiental*. 4.ed. Porto Alegre, Bookman, 2011. 844p.
32. Codex alimentarius. Codex pesticides residues in food online database. Pesticide Residues in Food and Feed. [Online] [acessado em: 23 de setembro de 2015] <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/index.html>.
33. Shao-Hua Zhu, Hai-Long Wu, A-Lin Xia, Jin-Fang Nie, Ying-Chao Bian, Chen-Bo Cai, Ru-Qin Yu. Excitation-emission-kinetic fluorescence coupled with third-order calibration for quantifying carbaryl and investigating the hydrolysis in effluent water. *Talanta* 77 (2009) 1640–1646.
34. Rodrigues, M. A. T. Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo FRAC.249f. Dissertação de mestrado.Faculdade de Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual Paulista. Botucatu. 2006.
35. European Food Safety Authority (EFSA). Review of the existing maximum residue levels for fuberidazole according to Article 12 of Regulation (EC) N° 396/2005. [Online] [acessado em: 25 de abril de 2015]. http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/4220.pdf
36. Toan. P. V; Sebesvari. Z; Bläsing. M; Rosendahl. I; Renaud. F. G. Pesticide management and their residues in sediments and surface and drinking water in the Mekong Delta, Vietnam. *Science of the Total Environment* 452–453 (2013) 28–39.
37. Magnusson. M; Heimann. K; Ridd. M; Negri. A. P. Pesticide contamination and phytotoxicity of sediment interstitial water to tropical benthic microalgae. *Water research* 47 (2013) 5211 e 5221.
38. Carneiro, F. F.; Pignati, W.; Rigotto, R. M.; Augusto, L. G. S.; Rizollo, A; Muller, N. M.; Alexandre, V. P.; Friedrich, K.; Mello, M. S. C. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: ABRASCO, abril de 2012. 1ª Parte. 98p.
39. INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. [Online] [acessado em: 30 de outubro de 2015.] Disponível em: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf.

40. Ornelas, L. H. Técnicas dietéticas: Seleção e preparo de alimentos. 8ª edição. São Paulo: Atheneu editora São Paulo, 2007.
41. Collins, C. H.; Braga, G.L.; Bonato, P. S.; Fundamentos de Cromatografia. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.
42. Lanças, F. M.; Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE. Campinas, SP: Editora Átomo, 2009.
43. Skoog, D. A; Holler, F.J; Nieman, T.A. Princípios de análise instrumental. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
44. Pinto Segundo Neto, J. L. Uma metodologia analítica rápida para quantificação simultânea de estrógenos em águas usando HPLC-DAD e calibração de segunda ordem. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba, Brasil, 2014.
45. Sharif. Z; Man. Y. B. C; Hamid. A.S.N; Keat.C.C. Determination of organochlorine and pyrethroid pesticides in fruit and vegetables using solid phase extraction clean-up cartridges. *Journal of Chromatography A*, 1127 (2006) 254–261.
46. Asensio-Ramos. M; Ravelo-Pérez. L.M; González-Curbelo. M. A; Hernández-Borges. J. Liquid phase microextraction applications in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 7415–7437
47. Rezaee. M; Yamini. Y; Faraji. M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 2342–2357
48. Yee-Man Ho, Yeuk-Ki Tsoi, Kelvin Sze-Yin Leung. Highly sensitive and selective organophosphate screening in twelve commodities of fruits, vegetables and herbal medicines by dispersive liquid–liquid microextraction. *Analytica Chimica Acta* 775 (2013) 58–66.
49. Agnieszka Zgoła-Grzes'kowiak, Tomasz Grzes'kowiak. Dispersive liquid-liquid microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 30, No. 9, 2011
50. Pinto. M. I; Sontag. G; Bernardino. R. J; Noronha. J.P. Pesticides in water and the performance of the liquid-phase microextraction based techniques. A review. *Microchemical Journal* 96 (2010) 225–237
51. Martins. M. L; Primel. E. G; Caldas. S. Z; Prestes. O. D; Adaime. M. B; Zanella. R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. *Scientia Chromatographica* 2012; 4(1):35-51
52. Satpathya. G; Tyagia. Y. K; Guptab. R.K. A quick method for surveillance of 59 pesticide residues in fruits and vegetables using rapid three-dimensional gas chromatography (GC/MSD/ μ -ECD/FPD) and LC/MS-MS. *European Journal of Chemistry* 2 (4) (2011) 524-534

53. Yan-Fei Li, Lu-Qin Qiaob; Fang-Wei Li; Yi Dinga; Zi-Jun Yang; Ming-Lin Wanga. Determination of multiple pesticides in fruits and vegetables using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method with magnetic nanoparticles and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1361 (2014) 77–87.
54. Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., and Schenck, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solidphase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86, 412-431. 2003
55. AOAC International. Official Method 2007.01: Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate. AOAC International; 2007.
56. 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.
57. Prestes. O. D; Friggi. C. A; Adaime. M. B; Zanella. R. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Quim. Nova*, vol.32, nº.6. São Paulo, 2009.
58. M.Á. González-Curbelo, B. Socas-Rodríguez, A.V. Herrera-Herrera, J. González-Sálamo, J. Hernández-Borges, M.Á. Rodríguez-Delgado, Evolution and applications of the QuEChERS method, *TRAC - Trend Anal Chem* 71 (2015) 169-185
59. I. Jeong, B. Kwak, J. Ahn, S. Jeong, Determination of pesticide residues in milk using a QuEChERS-based method developed by response surface methodology, *Food Chem.* 133 (2012) 473–481.
60. Pimentel, M.F.; Barros. B.N. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. *Quim Nova* 19 (1996) 268-277.
61. Barros. B.N.; Pimentel, M. F.; Araújo, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica – parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). *Quim Nova*, Vol 25 (2002) 856-865.
62. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DQO-CGRE-008, 2007.

63. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº899, de 29/05/2003.
64. International Standard Organization (ISO) - General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, ISO/IEC 17025, 1999.
65. Annual Book of ASTM Standards, Standards practices for infrared, multivariate, quantitative analysis, E1655, vol 03.06, ASTM International: West Conshohocken, 2000.
66. EURACHEM/CITAC Guide CG4, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 3ª Edição, 2012.
67. Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C. S. F. Melo, L.F.C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Quim. Nova*, vol 27, nº 5, 771-780, 2004.
68. Valderrama, P.; Braga, J. W. B.; Poppi, R. J. Estado da Arte de Figuras de Mérito em Calibração Multivariada. *Quim. Nova*, vol 32, nº5, 1278-1287, 2009.
69. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília. Mapa/ACS, 2011.72 p.
70. López, M. G; Fussell. R. J. S. L. Stead, D. Roberts, M. McCullagh, R. Rao. Evaluation and validation of an accurate mass screening method for the analysis of pesticides in fruits and vegetables using liquid chromatography–quadrupole-time of flight–mass spectrometry with automated detection. *J Chromatogr A*, 1373 (2014) 40–50.
71. Santa-Cruz. P, García-Reiriz. A Application of third-order multivariate calibration algorithms to the determination of carbaryl, naphthol and propoxur by kinetic spectroscopic measurements. *Talanta* 128 (2014) 450–459.70.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Cromatograma das amostras de hortaliças

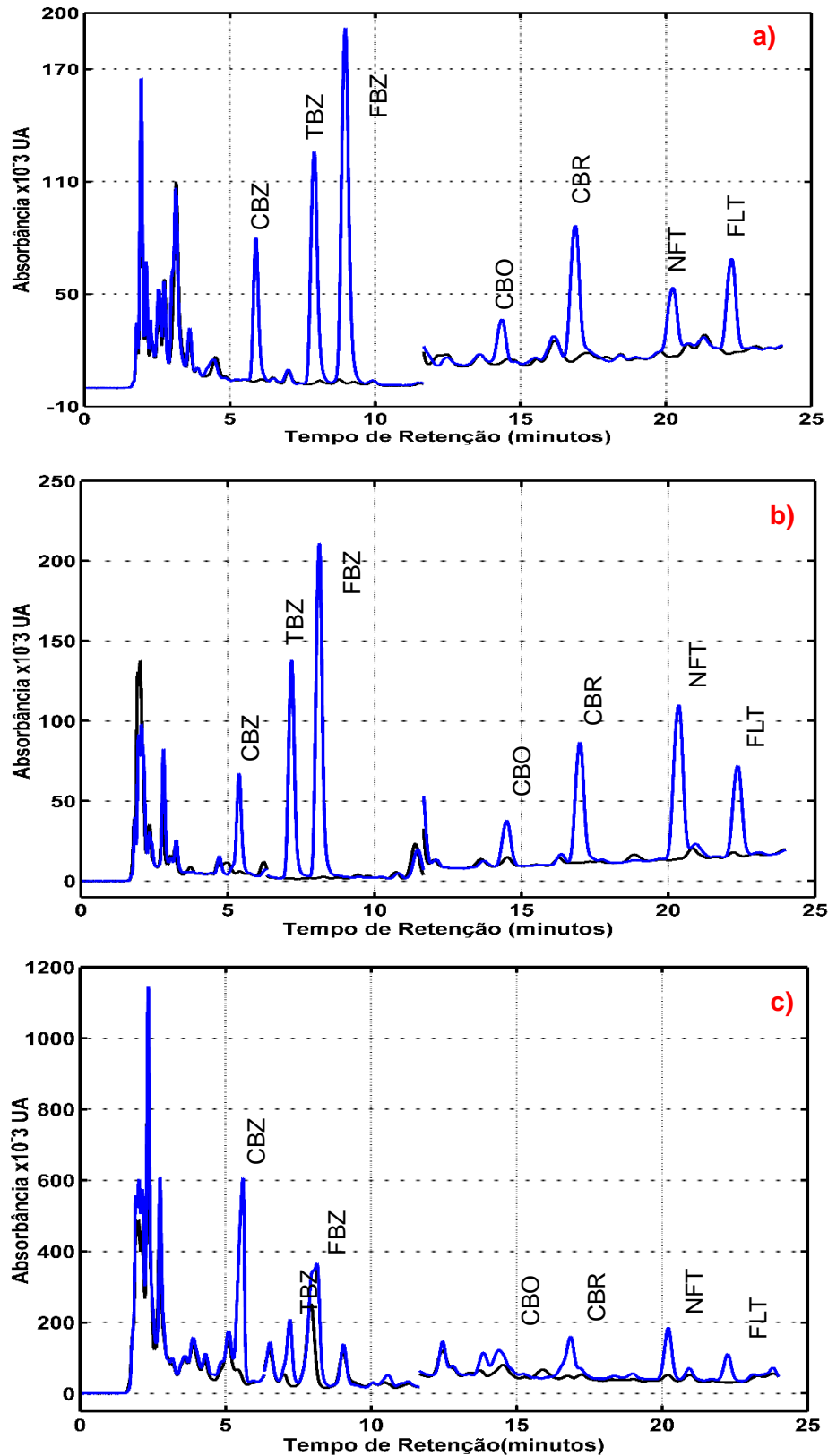


Figura A.1: Cromatograma registrado de 0 a 6,3 minutos (280 nm); 6,3 a 11,6 minutos (300 nm) e 11,6 a 24 minutos (210 nm) das amostras de: a) alface, b) beterraba e c) couve, sem fortificação (—) e com fortificação no nível máximo (—)

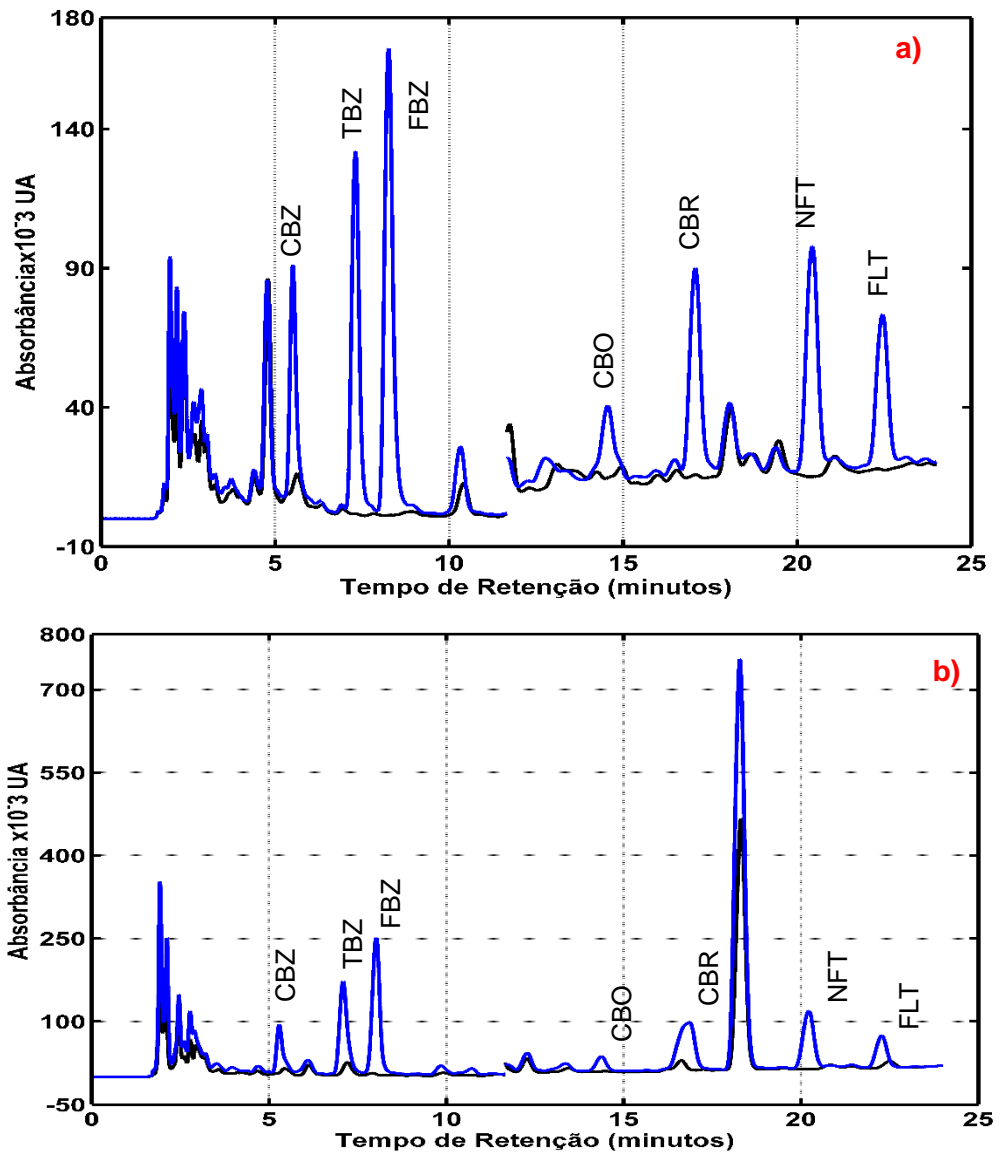


Figura A.2: Cromatograma registrado de 0 a 6,3 minutos (280 nm); 6,3 a 11,6 (300 nm) e 11,6 a 24 minutos (210nm) das amostras de: a) pimentão, b) tomate, sem fortificação (—) e com fortificação no nível máximo (—).