



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS  
ALIMENTOS**

**JULIANA GOULART LORENZ**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS QUECHERS-  
CG/ECD E HS-SPME-CG/MS PARA ANÁLISE DE  
AGROTÓXICOS EM MAÇÃ, MORANGO E TOMATE**

**FLORIANÓPOLIS, SC  
2015**



Juliana Goulart Lorenz

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS QUECHERS-  
CG/ECD E HS-SPME-CG/MS PARA ANÁLISE DE  
AGROTÓXICOS EM MAÇÃ, MORANGO E TOMATE**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do Grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Ernani S. Sant'Anna  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Léa Luzia Freitas Costa

Florianópolis  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Lorenz, Juliana Goulart

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS QUECHERS-CG/ECD  
E HS-SPME-CG/MS PARA ANÁLISE DE AGROTÓXICOS EM MAÇÃ,  
MORANGO E TOMATE / Juliana Goulart Lorenz ; orientador, Ernani S.  
Sant'Anna ; coorientadora, Léa Luzia Freitas Costa – Florianópolis, SC, 2015

123 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro  
Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referência

1. Ciência dos Alimentos. 2. agrotóxicos. 3. otimização multivariada. 4.  
QuEChERS-CG/ECD. 5. SPME-HS-CG/MS. 6. Frutas e vegetais. I. Sant'Anna,  
Ernani S.. Costa, II. Léa Luzia Freitas. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

Juliana Goulart Lorenz

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS QUECHERS-  
CG/ECD E HS-SPME-CG/MS PARA ANÁLISE DE  
AGROTÓXICOS EM MAÇÃ, MORANGO E TOMATE**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutora em Ciências dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos.

Florianópolis, 14 de maio de 2015.

---

Prof.<sup>a</sup> Roseane Fett, Dr.<sup>a</sup>  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Ernani Sebastião Sant’Anna, Dr. Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Eliana Badiale Furlong, Dr.<sup>a</sup>  
Fundação Universidade Federal do Rio Grande

---

Prof.<sup>a</sup> Eliane Aparecida Suchara, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal do Mato Grosso

---

Prof.<sup>a</sup> Anna Porto Fett, Dr.<sup>a</sup>  
United States Department of Agriculture

---

Prof.<sup>a</sup> Vildes Maria Scussel, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Pedro Luiz Manique Barreto, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina



*Dedico este trabalho aos meus pais Ana e Paulo, meu marido Marcelo e meu filho Pedro, pelo apoio, incentivo e compreensão. Sem vocês não poderia ter chegado até aqui.*





## AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha família que mesmo longe se fez sempre presente em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ernani S. Sant'Anna pela dedicação, paciência e incentivo com que me conduziu durante o mestrado e o doutorado. Obrigada por ter acreditado que eu seria capaz e não ter me deixado desistir.

A minha co-orientadora Dra. Léa Luzia Freitas Costa pelo conhecimento transmitido em cromatografia, pela confiança e amizade.

A Profa. Dra. Eliane A. Suchara por estar sempre disponível, me ajudando no tratamento dos dados e análise estatística.

A Prof. Dra Eliane B. Furlong que me acompanhou desde a iniciação científica, mestrado e agora doutorado. Pessoa por quem tenho imenso respeito e admiração. Obrigada por todos os ensinamentos.

Ao Laboratório Central do Estado de Santa Catarina (LACEN-SC), por ter aberto as portas dos seus laboratórios e disponibilizado todos os equipamentos e materiais necessários para a realização deste trabalho.

A Vanira, Vânia, Cristine, Regina, Cida, Sandra, Eliane e demais funcionários do LANCEN, pelas palavras de incentivo, sorrisos e momentos de descontração proporcionados.

Aos colegas e amigos dos Laboratórios de Biotecnologia Alimentar que em algum período acompanharam a minha trajetória; em especial à Eunice pelos conselhos, carinho e amizade em todos os momentos.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela cooperação e disponibilidade.

A todos que de alguma forma direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.



## RESUMO

Este trabalho apresenta a otimização e validação dos métodos QuEChERS-CG/ECD e SPME-HS-CG/MS para a determinação de resíduos de agrotóxicos clorpirifós, dimetoato, malationa, mevinfós, pendimetalina, simazina e trifluralina em maçãs, morangos e/ou tomates. Os métodos foram otimizados através de processos de otimização multivariada buscando alcançar a melhoria das respostas analíticas e, conseqüentemente, da eficiência de extração. No método QuEChERS as variáveis quantidade de amostra, volume de solvente, pH e temperatura foram avaliadas através de um planejamento fatorial  $2^4$ . Neste planejamento as variáveis significativas para o método foram identificadas como sendo a quantidade de amostra e o volume de solvente. Estas foram submetidas a um planejamento Doehlert para determinação do ponto ótimo. O método QuEChERS otimizado consistiu em 18 g de amostra, 10 mL de solvente, pH 5 e temperatura de 10 °C. No método SPME, uma otimização univariada para definir o tipo de fibra mais adequado foi primeiramente realizada. Na sequência um planejamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$  foi utilizado para a otimização multivariada das variáveis pH, concentração de sal, quantidade de co-solvente, temperatura e tempo. Nesta etapa da otimização, temperatura e tempo de extração mostraram possuir influência significativa na resposta analítica do método, sendo portanto seu ponto ótimo determinado a partir do planejamento Doehlert. O método SPME otimizado consistiu na utilização da fibra PDMS 100 µm, amostra com pH 5, concentração de sal 5%, volume de co-solvente 0%, temperatura 60 °C e 25 min de extração. Os métodos foram validados em função dos principais parâmetros analíticos de mérito. Os resultados dos processos de validação mostraram que ambos os métodos avaliados apresentaram excelentes faixas de linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão intra laboratorial. QuEChERS-CG/ECD foi ainda aplicado em 91 amostras de maçã, morango e tomate produzidas e comercializadas no Estado de Santa Catarina. Resíduos de pelo menos um agrotóxico ( $\geq$  LOQ) foram encontrados em 8 (27,6%) amostras de maçãs, 12 (40,0%) de morangos e 17 (53,1%) de tomates. Estes resultados salientaram a necessidade do monitoramento contínuo do uso desses agrotóxicos em frutas e vegetais.

**Palavras-chave:** agrotóxicos. otimização multivariada. QuEChERS-CG/ECD. SPME-HS-CG/MS. Frutas e vegetais.



## ABSTRACT

This study presents the development and validation of QuEChERS-GC / ECD and SPME-HS-GC / MS methods for the pesticides residues analysis of chlorpyrifos, dimethoate, malathion, mevinphos, pendimethalin, trifluralin and simazine in apples, strawberries and / or tomatoes. The methods were optimized using multivariate optimization processes aiming to achieve the improvement of the analytical response and consequently the extraction efficiency. In the QuEChERS method, sample amount, volume of solvent, pH and temperature were evaluated in a  $2^4$  factorial design. The sample amount and volume of solvent were identified as significant variables for the method. These were subjected to a Doehlert design in order to determine the optimal point. The optimized QuEChERS method consisted of 18 g of sample, 10 ml of solvent, pH 5 and 10 °C temperature. For the SPME method, a univariate optimization was first performed to define the most adequate fiber. Then, a fractional factorial design  $2^{5-1}$  was used for multivariate optimization of pH, ionic strength, co-solvent amount, temperature and time variables. At this stage of optimization, temperature and extraction time shown to have a significant influence on the method analytical response. The optimum point was determined from Doehlert design. The SPME method was optimized using the PDMS fiber 100  $\mu\text{m}$ , sample with pH 5, salt concentration 5%, volume of co-solvent 0%, temperature 60 °C and 25 min of extraction. The methods were validated according to the main analytical parameters of merit. The results of the validation process showed excellent linearity ranges, detection and quantification limits, accuracy and intra laboratory precision for both evaluated methods. QuEChERS-GC/ECD was also applied on 91 samples of apple, strawberry and tomato produced in the State of Santa Catarina. Residues of at least one pesticide ( $\geq$  LOQ) were found in 8 (27.6%) samples of apples, 12 (40.0%) samples of strawberries and 17 (53.1%) samples of tomatoes. These results emphasized the need for continued monitoring of the use of these pesticides in fruits and vegetables.

**Keywords:** pesticides. Multivariate optimization. QuEChERS-GC/ECD. SPME-HS-GC/MS. Fruits and vegetables.



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1 - Dispositivo da fibra de SPME.....	41
Figura 2 - Processo de SPME, pela técnica de imersão direta, headspace, e dessorção do material extraído pela análise em CG.....	42
Figura 3 - Classificação das técnicas cromatográficas de acordo com a natureza física da fase móvel.....	45

### CAPÍTULO 2

Figura 1 - Pareto chat obtained through full factorial design using as response the geometric mean of peak areas for pesticides chlorpyrifos, dimethoate, mevinphos, malathion, pedimentalin, simazine and trifluralin.....	61
Figura 2 - Response surfasse graph for the geometric mean of the peak áreas for pesticides chlorpyrifos, dimethoate, mevinphos, malathion, pendimethalin, simazine and trifluralin depending on the amount of sample /g vs solvent volume /mL.....	63

### CAPÍTULO 3

Figura 1 - Eficiência das fibras PDMS 100 $\mu\text{m}$ , PA 85 $\mu\text{m}$ e PDMS-DVB 65 $\mu\text{m}$ na extração dos agrotóxicos.....	83
Figura 2 - Gráfico Pareto obtido através do planejamento fatorial fracionado $2^{5-1}$ .....	85
Figura 3 - Superfície de resposta para a média geométrica da área dos picos dos agrotóxicos em função da temperatura e do tempo de extração.....	89





## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Informações gerais dos agrotóxicos estudados.....	35
--	----

### CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Two-level full factorial design for the screening of the significant variables.....	60
Tabela 2 - Doehlert's matrix and the corresponding experimental and predicted responses.....	62
Tabela 3 - Analytical parameters obtained for the optimized method: linear range, correlation coefficient (r), limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ).....	65
Tabela 4 - Recovery and repeatability of the method for three samples evaluated.....	67

### CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Matriz do planejamento fatorial fracionado $2^{5-1}$ .....	81
Tabela 2 - Propriedades químicas dos agrotóxicos em estudo.....	84
Tabela 3 - Matriz Doehlert, respostas experimentais e valores preditos para os ensaios de otimização das variáveis temperatura e tempo de extração.....	87
Tabela 4 - Resultados da ANOVA para o planejamento Doehlert.....	88
Tabela 5 - Parâmetros analíticos do método: faixa linear, coeficiente de correlação (r), Limite de Detecção (LOD), Limite de Quantificação (LOQ) e Limites Máximos de Resíduos (LMR) permitidos pela legislação.....	90
Tabela 6 - Recuperação e repetibilidade do método.....	91

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tabela 1 - Resumo dos resultados da análise de resíduos nas amostras de maçã, morango e tomate.....	94
---	----



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>25</b>
1 AGROTÓXICOS .....	27
<b>1.1 Agrotóxicos na produção de frutas e vegetais</b> .....	<b>29</b>
<i>1.1.1 Maçã</i> .....	<i>31</i>
<i>1.1.2 Morango</i> .....	<i>32</i>
<i>1.1.3 Tomate</i> .....	<i>33</i>
<b>1.2 Agrotóxicos estudados</b> .....	<b>34</b>
<b>2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS</b> .....	<b>37</b>
<b>2.1 Método QuEChERS</b> .....	<b>38</b>
<b>2.3 Microextração em Fase Sólida (SPME)</b> .....	<b>40</b>
3 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS .....	44
4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS .....	47
<b>CAPÍTULO 2 - OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DO MÉTODO     QuEChERS-CG-ECD E INVESTIGAÇÃO DE RESÍDUOS DE     PESTICIDAS EM MAÇÃS, MORANGOS E TOMATES     PRODUZIDOS NO SUL DO BRASIL</b> .....	<b>51</b>
1 INTRODUCTION .....	54
2 MATERIALS AND METHODS .....	56
<b>2.1 Sample</b> .....	<b>56</b>
<b>2.2 Reagents and Standards</b> .....	<b>56</b>
<b>2.3 Instrumentation</b> .....	<b>57</b>
<b>2.4 Extraction process – QuEChERS method</b> .....	<b>57</b>
<b>2.5 Multivariate optimization</b> .....	<b>58</b>
<b>2.6 Validation of the method</b> .....	<b>59</b>
3 RESULTS AND DISCUSSION .....	60
<b>3.1 Identification of the most significant variables</b> .....	<b>60</b>

3.2 Doehlert design application .....	62
3.3 Analytical performed of the optimizes method.....	64
3.4 Application to real sample .....	68
4 CONCLUSIONS.....	69
REFERENCES .....	69
<b>CAPÍTULO 3 - OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DO MÉTODO SPME-HS-CG/MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM TOMATES .....</b>	<b>73</b>
1 INTRODUÇÃO .....	76
2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	78
2.1 Reagentes e Padrões analíticos .....	78
2.2 Instrumentação.....	78
2.3 Processo de extração – método SPME –HS.....	79
2.4 Otimização das condições de extração.....	79
2.5 Validação do método .....	82
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	82
3.1 Escolha da fibra .....	82
3.2 Identificação das variáveis significativas.....	84
3.3 Aplicação da metodologia de superfície de resposta .....	87
3.4 Performance analítica do método .....	89
4 CONCLUSÃO .....	91
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	93
REFERÊNCIAS.....	95

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o desenvolvimento econômico, social e científico possibilitou a criação de novos recursos e/ou tecnologias para o uso na agricultura, objetivando o aumento da produção e da qualidade dos alimentos (RHODEN, 2005; ROCHA et al., 2010). Dentre essas tecnologias destaca-se os agrotóxicos, definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como toda substância capaz de controlar uma praga que possa oferecer risco ou incômodo às populações e ao meio ambiente (OMS, 2015).

Os agrotóxicos compreendem uma larga variedade de substâncias químicas com diferentes grupos funcionais e, conseqüentemente, com diferentes modos de ação, biotransformação e eliminação. Estas substâncias estão divididas em mais de 100 grupos, sendo organofosforados, carbamatos, organoclorados, piretróides, sulfoniluréias, triazinas e dinitroanilinas os mais importantes (TOMLIN, 2000; GALLI et al., 2006). Apesar dos significativos benefícios econômicos associados ao emprego dos agrotóxicos, existe uma preocupação crescente em relação aos seus efeitos adversos no ambiente, tais como, contaminação dos recursos hídricos, impactos em organismos não alvos e na saúde humana (PRESTES, 2007; DAMALAS, 2014).

O Brasil é o líder mundial na aplicação de agrotóxicos na agricultura (TEÓFILO et al., 2014). O país consome 20% de todo o agrotóxico utilizado no mundo (SINDAG, 2010), cerca de 936 mil toneladas do produto são aplicadas anualmente nas lavouras (ABRASCO, 2012). A utilização intensa dos agrotóxicos associada à grande variedade de substâncias existentes, mais de 900 princípios ativos, indica que os riscos para a saúde e ambiente não devem ser negligenciados e devem ser estudados mais intensamente (COSTA, 2007; BESIL et al., 2015).

Segundo o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (PARA/ANVISA), culturas como o tomate, o morango e a maçã possuem longo histórico de contaminação, estando entre os quinze alimentos avaliados com maiores índices insatisfatórios de resíduos de agrotóxicos no Brasil e entre os dez no Estado de Santa Catarina (ANVISA, 2012). O desenvolvimento de métodos analíticos mais sensíveis e precisos para a determinação desses resíduos torna-se de fundamental importância (BESIL et al., 2015).

Métodos tradicionais de determinação de agrotóxicos envolvem várias etapas de extração, purificação e concentração, que consomem tempo e grandes quantidades de solventes. A complexidade das amostras a serem analisadas e a exigência em determinar níveis cada vez menores de concentração, têm demandado o desenvolvimento de novos métodos para análise de resíduos (LOPES, DÓREA, 2003; BEYER, BIZIUK, 2008; LI et al., 2011; WILKOWSKA, BIZIUK, 2011). Métodos de extração rápidos, simples, baratos e que dispensam o alto uso de solventes extratores vêm sendo estudados como alternativa às metodologias tradicionais.

ANASTASSIADES et al. (2003) reportaram um método rápido e barato para a análise de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais, o método QuEChERS (do inglês, Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe). O método baseia-se na combinação da extração dos agrotóxicos em micro-escala, com auxílio de um solvente orgânico, e posterior limpeza através da técnica de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE). Este destaca-se justamente pela simplicidade e economia na execução, sem afetar adversamente a magnitude das recuperações dos analitos (PAREJA et al., 2011; HANOT, GOSCINNY, DERIDDER, 2015). Desde o seu desenvolvimento, QuEChERS vêm sofrendo modificações e melhorias sendo atualmente o método mais pesquisado para análise de agrotóxicos. A principal desvantagem do método está na baixa pré-concentração dos analitos no extrato, devido a proporção 1:1 entre a quantidade de amostra e o volume de solvente (DÍEZ, TRAAG, 2006; PINTO et al., 2010; ZHANG, ZHANG, JIAO, 2014).

A Microextração em fase sólida (SPME) foi introduzida por ARTHUR e PAWLISZYN (1990) no início da década de 90, como um método inovador de extração e pré-concentração de analitos. O método é composto pelas etapas de absorção e desorção. A absorção combina extração, isolamento e enriquecimento do analito em um passo único e contínuo. Por ser um método fácil, simples, eficiente e seguro, pois elimina a necessidade de solventes, SPME vem sendo largamente aplicado na análise de amostras ambientais, de alimentos, forensicas e na área farmacêutica (QUINTEIRO et al., 2003; OUYANG, PAWLISZYN, 2006).

O aprimoramento dos métodos analíticos de extração de agrotóxicos pode ser obtido através de processos de otimização multivariada. A identificação das variáveis significativas e das interações que ocorrem entre elas, possibilitam uma melhor resposta do método, da razão sinal-ruído e eliminação de possíveis interferências, alcançando desta forma a máxima eficiência de extração. Além disso, a

otimização multivariada economiza tempo, devido a necessidade de poucos experimentos, e possibilita a avaliação das interações entre as variáveis em estudo, o que não é possível quando um processo univariado é utilizado (MARTENDAL, BUDZIAK, CARASEK, 2007; CALDAS et al. 2011).

Com base nisto, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar dois métodos de determinação de agrotóxicos em amostras de maçã, morango e/ou tomate. Para isso, os métodos QuEChERS-CG/ECD e SPME-HS-CG/MS foram avaliados estatisticamente através de processos de otimização multivariada. No método QuEChERS-CG/ECD a proporção 1:1 entre a quantidade de amostra e o volume de solvente foi pela primeira vez analisada, juntamente com outras variáveis de extração. O método QuEChERS-CG/ECD otimizado foi aplicado em amostras de maçã, morango e tomate coletadas no Estado de Santa Catarina.

A presente tese encontra-se estruturada na forma de capítulos, onde o primeiro capítulo apresenta uma revisão bibliográfica da literatura e os demais relatam os resultados desta pesquisa em formato de artigos científicos.

O Capítulo 1, que apresenta a revisão bibliográfica, o uso de agrotóxicos na horticultura mundial e brasileira; os agrotóxicos em estudo; métodos analíticos de extração e resíduos; métodos cromatográficos de detecção e quantificação; e o processo de validação

No Capítulo 2, o método QuEChERS-CG/ECD foi otimizado de forma multivariada para a determinação de resíduos dos agrotóxicos clorpirifós, dimetoato, malationa, mevinfós, pendimetalina, simazina, trifluralina em amostras de maçã, morango e tomate. O método foi aplicado em amostras produzidas e comercializadas no Estado de Santa Catarina.

No Capítulo 3, a otimização multivariada e a validação do método SPME-HS-CG/MS foram realizadas visando melhorar a extração simultânea dos agrotóxicos em amostras de tomate.

Esta tese foi realizada em parceria com o setor de toxicologia do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina (LACEN-SC).





**CAPÍTULO 1**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## 1 AGROTÓXICOS

Agrotóxicos são definidos como qualquer substância utilizada com a finalidade de prevenir, destruir ou repelir, direta ou indiretamente, qualquer forma de agente patogênico ou de vida animal ou vegetal, que seja nociva às plantas e animais, seus produtos e subprodutos, e ao homem (PERES, MOREIRA, 2003).

No Brasil (2002), o Decreto nº 4.074, que regulamenta a Lei nº 7802/1989, estabelece agrotóxicos e afins como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Existem atualmente cerca de 900 ingredientes ativos, utilizados na formulação de agrotóxicos, registrados para uso específico na agricultura (BESIL et al., 2015). Destes, 350 contribuem com 98% dos agrotóxicos mais utilizados, sendo que 80% deles são rotineiramente empregados nas lavouras dos países da América do Sul, especialmente o Brasil (ANDEF, 2009), maior mercado mundial para esses produtos (BASTOS et al. 2011). Nos anos de 2010 e 2011, 936 mil toneladas de agrotóxicos foram comercializados no país, sendo 833 mil toneladas produzidas nacionalmente, e 246 mil toneladas importadas (ABRASCO, 2012).

Bombardi (2011) indica a intensidade do uso de agrotóxicos por municípios no Brasil. Destacam-se os municípios da região Sul e Centro Oeste do país, onde há predominância de monoculturas de soja, milho, cana, cítricos, algodão e arroz (THEISEN, 2010). Mato Grosso é o maior consumidor de agrotóxicos, representando 18,9%, seguido de São Paulo (14,5%), Paraná (14,3%), Rio Grande do Sul (10,8%), Goiás (8,8%), Minas Gerais (9,0%), Bahia (6,5%), Mato Grosso do Sul (4,7%) e Santa Catarina (2,1%) (IBGE, 2006; SINDAG, 2010; THEISEN, 2010).

Os agrotóxicos podem ser classificados em função do tipo de pragas que controlam, do seu modo de ação, dos efeitos à saúde e ao meio ambiente, e do grupo químico a que pertencem (SANCHES et al., 2003). Quanto ao tipo de praga que combatem, são agrupados nas seguintes classes: inseticidas (usados no controle de insetos), fungicidas

(usados no controle de fungos), herbicidas (usados no controle de plantas invasoras), desfolhantes (controle de folhas indesejadas), fumigantes (controle de bactérias do solo), rodenticidas ou raticidas (controle de roedores /ratos), nematicidas (controle de nematóides) e acaricidas (usado no combate a ácaros) (RIBAS; MATSUMURA, 2009). Os herbicidas representaram 45% do total de agrotóxicos comercializados no Brasil, os fungicidas respondem por 14%, os inseticidas 12% e as demais categorias de agrotóxicos 29% (ANVISA, 2012).

Em relação ao modo de ação, os agrotóxicos podem atuar por contato, quando o organismo alvo é atingido diretamente pela substância; por ingestão, quando a substância atua após ser ingerida pelo organismo alvo; ou sistêmico, quando a substância é absorvida por uma parte da planta e translocada para todos os tecidos vasculares (MARASCHIN, 2003). Seus efeitos para a saúde e ao meio ambiente estão divididos pela legislação brasileira em quatro classes toxicológicas, baseadas nos parâmetros de bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico (BRASIL, 1996). A classe I (rótulo vermelho) abrange os compostos considerados altamente tóxicos; a II (rótulo amarelo), os muito tóxicos; a III (rótulo azul), os tóxicos; e a IV (rótulo verde) os pouco tóxicos.

Quanto ao grupo químico que pertencem, os agrotóxicos são classificados em *inorgânicos*: cujas composições químicas apresentam arsênio, tálio, bário, nitrogênio, fósforo, cádmio, ferro, selênio, chumbo, cobre, mercúrio e zinco; e *orgânicos*: organoclorados, organofosforados, carbamatos (nitrogenados), clorofosforados, piretróides e triazinas (TOMLIN, 2000; JARDIM et al., 2009). Os compostos inorgânicos não estão sujeitos a degradação e quando utilizados como agrotóxicos apresentam uma longa persistência como substâncias tóxicas. O grupo dos orgânicos é composto tanto por agrotóxicos produzidos naturalmente por certas plantas (agrotóxicos de origem vegetal), como pelos produzidos pelo homem (agrotóxicos sintéticos) (MCKINLAY et al., 2008).

Os agrotóxicos de origem vegetal, pouco utilizados na agricultura, são de baixa toxicidade e de curta permanência no ambiente (como o piretro contido no crisântemo e a rotenona extraída do timbó) (DIMETRY, 2012), enquanto que os agrotóxicos sintéticos, mais utilizados no mundo, além de persistirem por muitos anos nos ecossistemas, contaminando-os, também trazem uma série de problemas de saúde para os seres vivos (DOS SANTOS et al., 2007).

A contaminação pelo consumo de alimentos com altas concentrações de resíduos de agrotóxicos é rara. No entanto, o efeito cumulativo, oriundo desses resíduos em baixos níveis, é responsável por diversos efeitos crônicos (ARAÚJO et al., 2007; BASTOS et al., 2011). Tais efeitos, estão relacionados à possibilidade de associação entre a exposição aos agrotóxicos e doenças como cânceres (JOBIM et al., 2010), endocrinopatias, neuropatias (WAISSMANN, 2007), sintomas neuropsíquicos (GENIUS, 2008) e doenças degenerativas do sistema nervoso central (COLOSIO et al., 2009).

Dessa forma para que os agrotóxicos sejam utilizados é necessário que sejam seguidos padrões toxicológicos considerados seguros ao homem e aos animais de criação. O risco potencial que os agrotóxicos oferecem aos consumidores, determinou que Limites Máximos de Resíduos (LMR) fossem estabelecidos por agências governamentais de diversos países (STEPAN et al., 2005; JARDIM et al., 2009). O objetivo principal é a garantia de que a população, ao consumir diariamente produtos cujos níveis de resíduos de agrotóxicos estejam dentro dos limites estabelecidos, não apresente problema de saúde (RIPLEY et al., 2000).

No Brasil, segundo o decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamentou a lei nº 7.802/1989, o LMR é definido como a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expresso em mg/kg (BRASIL, 2006). No âmbito nacional os LMR são estabelecidos pelo Ministério da Saúde (MS) por meio da ANVISA. No âmbito internacional o Codex Alimentarium é o órgão regulador e pode ser utilizado no caso de compostos com limites não estabelecidos pelos órgãos brasileiros (BASTOS et al., 2011).

O uso indiscriminado e ilegal de agrotóxicos na agricultura, gerando alimentos com níveis de resíduos superiores aos LMR, apresenta como principais consequências: o aumento da exposição do trabalhador rural aos compostos tóxicos; e o risco para os consumidores que ingerem o alimento contaminado, e que têm este risco potencializado à medida que esse agrotóxico é encontrado em um número maior de alimentos comercializados (ANVISA, 2010).

### 1.1 Agrotóxicos na produção de frutas e vegetais

A utilização de agrotóxicos na horticultura é indispensável como meio de proteger as culturas das pragas e doenças visando assegurar as produções. Nesse enfoque, ressalta-se que a qualidade do produto final,

proveniente da colheita, é de vital importância para o consumidor, que aponta a aparência do produto como a característica mais relevante no momento da compra (TEIXEIRA et al., 2006; ZAWIYAH et al., 2007; TREVISAN et al., 2014).

O problema está no fato que resíduos de agrotóxicos, depositados sobre a superfície dos frutos, podem não ser posteriormente removidos. A remoção depende da natureza da fruta, do tipo e da quantidade de agrotóxico que foi pulverizada durante o cultivo, ou seja, da concentração residual (OLIVEIRA, TOLEDO, 1995; COSTA et al., 2002).

Culturas com ciclo de desenvolvimento mais longo como a maçã, o morango, a goiaba, a uva, o pêssego, o mamão, o figo, a pêra, o melão, nectarina e o tomate recebem um número maior de pulverizações de agrotóxicos durante o cultivo, sendo considerados alimentos de alto risco de contaminação (RHODEN, 2005). Além disso, este tipo de fruto é geralmente consumido com a ingestão da casca, às vezes sem lavagens adequadas, o que expõe as pessoas aos riscos de contaminação com resíduos de agrotóxicos (JARDIM et al., 2009). Esta situação, aliada ao incentivo do consumo diário de frutas “in natura”, remete à necessidade de monitoramento de resíduos de agrotóxicos na horticultura e demais produtos destinados ao consumo humano (CHEN et al., 2011).

No Brasil existem dois programas de monitoramento de resíduos em alimentos: o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (JARDIM, CALDAS, 2012).

O PARA foi iniciado em 2001 com o intuito de monitorar a qualidade dos alimentos produzidos e consumidos no Brasil. Baseado nos dados de consumo obtidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e no uso intensivo de agrotóxicos em determinados cultivos, o PARA vem monitorando desde então 18 alimentos: abacaxi, alface, arroz, batata, beterraba, cebola, cenoura, couve, feijão, laranja, maçã, mamão, manga, morango, pepino, pimentão, repolho e tomate. Segundo dados do programa, o maior problema no uso de agrotóxicos no Brasil não está na forma de aplicação dos produtos e sim na utilização de agrotóxicos não autorizados para as culturas analisadas. Entre 2009 e 2012 os principais grupos químicos encontrados de forma irregular foram os organofosforados, piretróides, clorociclodienos, metilcarbamatos de oxima, benzimidazóis, dicarboximidas, dimetilditiocarbamatos e triazóis (ANVISA, 2015).

Segundo Jardim e Caldas (2012), dentre os alimentos avaliados pelos programas citados acima, pimentão, maçã, mamão papaya e morango foram as amostras com maiores contaminações por resíduos de agrotóxicos entre os anos de 2001 e 2010. O tomate aparece logo abaixo com a detecção de multirresíduos em grande parte das amostras analisadas.

### 1.1.1 Maçã

A maçã é a quarta fruta mais produzida no mundo, atrás apenas da banana, laranja e da uva (BHUSHAN et al., 2008; MAHAWAR et al., 2012). No Brasil, o cultivo de maçã em escala comercial foi iniciado a partir da década de 1970, tendo atualmente o predomínio de três espécies cultivadas, *gala*, *fugi* e *golden delicious*, principalmente na região sul do país. Santa Catarina é o Estado de maior produção nacional, sendo responsável por aproximadamente 46% das maçãs brasileiras, com 629.437 toneladas produzidas em 2013/2014. A produção está concentrada nas microrregiões geográficas de Campos de Lages (69,77%), Joaçaba (22,45%), Curitiba (6,6%), Canoinhas (1,1%), Rio do Sul (0,1%) e Tubarão (0,02%) (VIEIRA, JUNIOR, 2014).

Do total de maçãs produzidas no Brasil, 70% são destinadas ao consumo *in natura*, comercializadas especialmente via Centrais de Abastecimento S/A (CEASA) e grandes supermercados. Os 30% restantes são reservadas à agroindústria e consumidas na forma de produtos processados, como sucos, purês, geleias, doces, sidras, vinagres, chá, polpas desidratadas e em alimentos para bebês (BRDE, 2011). Apesar das maçãs serem vendidas durante todo o ano, o período de safra é somente entre janeiro e abril. Após esse período, a maioria das maçãs comercializadas no mercado brasileiro é importada de outros países, como a China (JARDIM et al., 2009).

No cultivo de maçãs, os agrotóxicos são utilizados para eliminar a presença de insetos que são atraídos pela cor e a doçura da fruta comprometendo a produção e provocando depreciação na qualidade e valor comercial do produto (KOVALESKI, RIBEIRO, 2003; MANZONI et al., 2006; SANTOS, WAMSER, 2006; TICHA et al. 2008). O manejo para o controle desses insetos é bastante dificultado, em razão de seus hábitos e comportamento. O controle geralmente é realizado nas etapas de pré-colheita e armazenamento (TICHA et al., 2008), por meio de inúmeras aplicações de inseticidas, herbicidas e fungicidas de amplo espectro, principalmente organofosforados como o

clorpirifós e a malationa (BOTTON et al., 2000; SINGH et al. 2009), além de fenitrotiona, fosmete, metidationa, captam e mancozebe (JARDIM et al., 2009).

### 1.1.2 Morango

O Brasil ainda não está entre os principais produtores de morango do mundo, porém o país é o quarto em produtividade da fruta, com 30 toneladas ha<sup>-1</sup> (REISSER JUNIOR et al., 2014), e começa a se destacar devido as condições ambientais favoráveis ao cultivo e pela produção em quase todos os meses do ano (COCCO, 2010).

A produção brasileira de morango está em torno de 105 mil toneladas ano<sup>-1</sup>, cultivadas numa área de aproximadamente 4.000 ha (REISSER JUNIOR et al., 2014). Esta produção é praticamente toda voltada para o mercado interno, sendo a maioria destinada ao consumo “*in natura*” e o restante industrializadas de diversas formas (COCCO, 2010). Sua colheita ocorre entre abril e setembro, com ponto alto da safra entre os meses de julho e agosto. No entanto, a época recomendada para o consumo da fruta é entre junho e outubro, quando o cultivo nacional está no auge (CAMARGO FILHO, CAMARGO, 2009).

O Estado de Minas Gerais constitui o maior pólo produtor, seguido de Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, São Paulo, Espírito Santo, Distrito Federal, Bahia e Ceará (REETZ et al., 2015). Em Santa Catarina, o morango é cultivado principalmente nos municípios de São João do Sul, Rancho Queimado, Águas Mornas, Angelina e São Joaquim. Toda a oferta produzida no Estado destina-se ao mercado interno onde são comercializados exclusivamente na forma “*in natura*”. Os principais cultivares utilizados são: Camarosa, Dover, Chandler, Campinas e Oso Grande (SATO, ASSUMPCÃO, 2002; BRUGNARA et al., 2013).

Por ser uma planta susceptível a doenças e pragas, como ácaros e pulgões, o morango pode receber em média 45 pulverizações de agrotóxicos, principalmente da classe dos inseticidas e fungicidas (BERBARI et al., 1998; DAROLT, 2001; UENO, 2004). A apresentação de frutos verdes e outros maduros no mesmo pé é uma característica do morangueiro. Isto dificulta o cumprimento do período de carência no uso de agrotóxicos pelos produtores e facilita o acúmulo dos resíduos químicos. Além disso, o rápido amadurecimento e a impossibilidade de descascar a fruta acentuam o problema para o consumidor (DAROLT, 2001).



Dessa forma o uso exagerado de agrotóxicos vem transformando o morango num vilão perante os consumidores. O morango está entre os alimentos que tiveram os maiores índices insatisfatórios de resíduos de agrotóxicos em 2012 (ANVISA, 2015). As amostras apresentaram a presença tanto de ingredientes ativos não autorizados para uso, quanto de concentrações de agrotóxicos superiores aos LMR permitidos pela legislação. Os agrotóxicos mais detectados nas amostras foram: fosmete, captana, clorotaloni, clorpirifós, metamidofos, acefato e dimetoato (ANVISA, 2015).

### 1.1.3 Tomate

Hortaliça mais consumida no mundo, o tomate constitui um fruto originário dos países andinos, desde o norte do Chile até a Colômbia. Pertence a família das solanáceas, como o pimentão, o jiló, a berinjela e a batata (MELO et al., 2012). Pode ser consumido tanto fresco como processado, sendo uma fonte diária de carotenóides (licopeno e  $\beta$ -caroteno), ácido ascórbico e uma série de compostos fenólicos e sais minerais como potássio e magnésio (CAMPBELL et al., 2004; CHANFORAN et al., 2012).

Quanto ao tipo de cultivo, o tomate pode ser dividido conforme seu hábito de crescimento em “estaqueado” (de mesa) ou “rasteiro” (industrial). No estaqueado, as plantas apresentam porte maior e necessitam de suporte para o crescimento, sendo preferido para o consumo “*in natura*”. No rasteiro, as cultivares são de porte baixo e não necessitam de suporte, sendo mais utilizado para a indústria (REIS FILHO, 2002; LATORRACA et al., 2008).

No Brasil o tomate está entre as hortaliças de maior produção e comercialização. O país é o principal produtor de tomate da América do Sul, seguido pelo Chile e pela Argentina (MELO, VILELA, 2004; SECEX, 2010). Santa Catarina está entre os seis principais produtores de tomate do país, tanto em produção, como em produtividade. A cultura se desenvolveu no Estado a partir da década de 80. Atualmente as cultivares mais produzidas são Santa Cruz e Longa Vida, ambas para o consumo *in natura*, destinado ao mercado interno. O oeste Catarinense detem 64% da produção estadual, seguido da região da Grande Florianópolis 15% e da região Serrana 12%. O Vale do Itajaí, Norte Catarinense e Sul Catarinense representam juntos os outros 8% (EPAGRI/CEPA, 2011).

O tomate é um fruto de vida útil limitada e um curto período natural de maturação (CHANFORAN et al., 2012). Devido à sua

percebibilidade natural, o cultivo exige grandes quantidades de adubos químicos e defensivos agrícolas, chegando a se fazer, normalmente, pulverizações a cada três dias, desde a emergência das plantas até a colheita. Estes agrotóxicos quando utilizados de modo inadequado, tem como consequência a contaminação do fruto, da planta e do solo, este último, podendo contaminar as culturas posteriores (SARAIVA, 2004; LATORRACA et al., 2008).

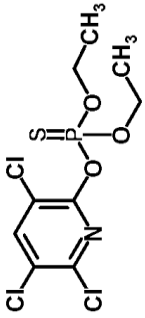
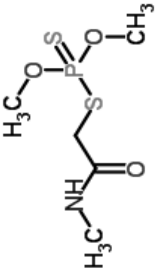
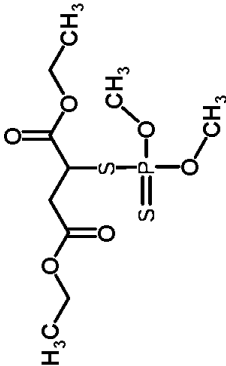
Segundo o PARA 2011/2012 os seguintes agrotóxicos foram encontrados acima dos LMR em amostras de tomates no Brasil: deltametrina, esfenvalerato e permetrina; e os agrotóxicos não-autorizados: endossulfam, imazalil, clorpirifós, metamidofós e fenvalerato (ANVISA, 2015).

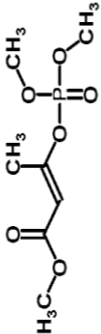
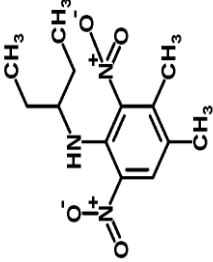
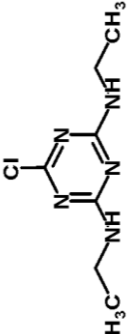
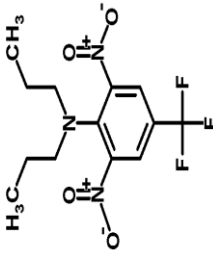
## 1.2 Agrotóxicos estudados

Os agrotóxicos selecionados para este trabalho pertencem aos grupos químicos dos organofosforados (clorpirifós, dimetoato, malationa e mevinfós), dinitroanilinas (pendimetalina e trifluralina) e triazinas (simazina) (Tabela 1).

Os compostos deste grupo possuem em sua estrutura um átomo central de fósforo pentavalente ligado a um átomo de oxigênio ou enxofre, por uma dupla ligação (GALLI et al., 2006). Aqueles que possuem a ligação  $P=S$  convertem-se dentro do organismo em moléculas correspondentes com uma ligação  $P=O$ . Estas moléculas são mais tóxicas, porém, têm menor estabilidade e capacidade de penetração nos tecidos. No meio ambiente, o oxigênio do ar altera as ligações  $P=S$  para  $P=O$  e as moléculas de água provocam o rompimento da dupla ligação, dando lugar a substância atóxicas como ácido-fosfórico, seus íons e álcoois (BAIRD, 2002; PEREIRA, 2014).

Tabela 1 - Informações gerais dos agrotóxicos estudados

Agrotóxico (CAS) <sup>a</sup>	Grupo Químico	Classes	Fórmula Química/(PM) <sup>b</sup>	Estrutura Química
Clorpirifós (2921-88-2)	Organofosforado	Inseticida Formicida Acaricida	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ (350,58)	
Dimetoato (60-51-5)	Organofosforado	Inseticida Acaricida	$C_5H_{12}NO_3PS_2$ (229,20)	
Malationa (121-75-5)	Organofosforado	Inseticida Acaricida	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$ (330,36)	

Mevinfós (26718-65-0)	Organofosforado	Inseticida Acaricida	$C_7H_{13}O_6P$ (224,14)	
Pendimetalina (40487-42-1)	Dinitroanilina	Herbicida	$C_{13}H_{19}N_3O_4$ (281,31)	
Simazina (122-34-9)	Triazina	Herbicida	$C_7H_{12}ClN_5$ (201,66)	
Trifluralina (1582-09-8)	Dinitroanilina	Herbicida	$C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$ (335,28)	

<sup>a</sup> Número de Registro no Chemical Abstracts Service; <sup>b</sup> Massa molecular ( $g\ mol^{-1}$ ).  
Fonte: ANVISA, 2015a.

Os nitroagrotóxicos são compostos que apresentam em sua estrutura o grupo nitro e, normalmente, são muito tóxicos. Os principais nitroagrotóxicos são divididos em quatro grupos básicos: nitroorganofosforados, derivados de nitrofenol, derivados de **dinitroanilinas** e nitroorganoclorados (GARRIDO et al., 2004). Os herbicidas do grupo das dinitroanilinas, em geral, são sensíveis a radiação ultravioleta, possuem volatilidade mediana e são pouco lixiviáveis (DEUBER, 1992). A alta persistência no solo como consequência da sua baixa mobilidade, é a principal característica destes compostos (CALDERON et al., 1999). A trifluralina é um exemplo de dinitroanilina, empregada em alimentos como cenoura, abóbora e tomate (GALLI et al., 2006).

As **triazinas** compreendem cerca de 30% da produção mundial de agrotóxicos (GALLI et al., 2006). Estes são amplamente conhecidos pelo uso no controle de ervas daninhas, em razão da sua capacidade em inibir a fotossíntese (COLLA et al., 2008). Os herbicidas triazínicos possuem um anel heterocíclico de seis membros onde os átomos de C e N são simetricamente localizados e os substituintes das posições 2, 4 e 6, constituem o diferencial entre as várias formulações disponíveis comercialmente. Durante a determinação cromatográfica, as triazinas apresentam um ou mais picos, referentes à redução das formas mono- e di- protonadas. Estes picos podem ser utilizados para a detecção do composto em diferentes amostras (GALLI et al., 2006).

Dentre as triazinas mais utilizadas para uso em alimentos está a simazina (2 cloro-4,6 bis-etilamina-1,3,5 triazina), utilizada desde 1955 como controlador da germinação de pestes nas culturas de milho, soja, batata, alho, entre outras. A simazina tem se acumulado extensivamente no ambiente em virtude de seu uso por mais de 60 anos e de sua estrutura dificilmente biodegradável (KODAMA et al., 2001).

## 2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS

Nos últimos anos, a preocupação com a segurança alimentar, provocou um rápido desenvolvimento de métodos analíticos, necessários para a determinação de resíduos de agrotóxicos em produtos agrícolas (HOGENDOORN, ZOONEN, 2000; LUTHJE, 2005). A complexidade da matriz desses produtos e as concentrações muito pequenas do analito, exigiram etapas prévias de preparo e concentração das amostras (PIZZUTTI, 2007), antes de serem levadas a separação cromatográfica e determinação (PICÓ et al., 2004).

O preparo da amostra é uma das etapas mais críticas da análise química e consiste na extração e no isolamento dos analitos de interesse, deixando-os livres de interferentes (LANÇAS, 2004). A maioria dos métodos de extração convencionais envolve grandes quantidades de solventes orgânicos, sozinhos ou misturados com água, pelo uso de homogeneizadores, misturadores ou sonificadores. Além disso, são procedimentos caros e laboriosos, que demandam tempo, grande custo de material e geram uma enorme quantidade de resíduos tóxicos (LEHOTAY, 2002; KUMAY et al., 2010).

De acordo com Hercegová et al. (2007), um método de preparo de amostra deve incluir classes diferentes de compostos em um mesmo ensaio, recuperações próximas a 100% de um grande número de resíduos, remover os possíveis interferentes da amostra, possuir boa precisão e robustez, baixo custo, rapidez, facilidade de execução e segurança (utilizar pequenos volumes de solventes de baixa toxicidade).

Métodos de extração recentes como o QuEChERS (ANASTASSIADES et al., 2003), microextração em fase sólida (SPME) (LAMBROPOULO et al., 2007), extração com fluido supercrítico (NORMAN, PANTON, 2001), extração assistida por microondas (MAE) (CHEN et al., 2002), extração com líquido pressurizado (PLE) (KUMAR et al., 2010), dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) (LOPEZ, DÓREA, 2003) e extração por sorção em barra de agitação (COSTA, 2007), possuem uma série de vantagens, como a redução do tempo de extração, diminuição total ou parcial do uso de solventes orgânicos e eficiência elevada (PRESTES et al., 2009; KUMAR et al., 2010).

## 2.1 Método QuEChERS

O método QuEChERS (do inglês, *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) é um dos mais recentes métodos de extração de multirresíduos de agrotóxicos que vêm sendo pesquisado e aprimorado atualmente. Esse método foi introduzido por Anastassiades et al. (2003) com o objetivo de gerar um procedimento moderno e dinâmico, que pudesse ser aplicado em qualquer laboratório, devido à simplificação ou corte de etapas lentas, trabalhosas e impraticáveis (PIZZUTTI et al., 2007).

Originalmente a metodologia consiste na extração inicial com acetonitrila (MASTOVSKA, LEHOTAY, 2004), seguido de partição líquido-líquido pela adição da mistura de sulfato de magnésio anidro ( $MgSO_4$ ) e cloreto de sódio ( $NaCl$ ), e da etapa de purificação, onde o

extrato é misturado com uma quantidade de sorvente (Extração em Fase Sólida Dispersiva (d-SPE)). O uso da mistura de  $MgSO_4$  e  $NaCl$  facilita a remoção de uma quantidade significativa de componentes polares da matriz (SCHENCK et al., 2002) e a detecção e quantificação final do analito, que pode então ser feita por cromatografia gasosa (GC) ou cromatografia líquida (LC).

Segundo Wilkowska, Biziuk, (2011) e Bragança et al. (2012) nos estudos iniciais de desenvolvimento do QuEChERS original, um número limitado de agrotóxicos foram avaliados por Anastassiades et al. (2003) e Lehotay et al. (2005), com excelentes resultados. No entanto, experimentos posteriores mostraram que dependendo do pH da matriz alguns agrotóxicos possuíam menor estabilidade resultando em diminuição do percentual de recuperação destes compostos. Os autores perceberam que ao realizar a extração em pH 5 obtinham o equilíbrio ideal para alcançar recuperações aceitáveis de todos os agrotóxicos (LEHOTAY et al., 2010). A partir disso, duas novas versões de QuEChERS foram publicadas, o método da AOAC 2007.01, no qual uma solução de ácido acético 1% e acetato de sódio anidro ( $CH_3COONa$ ) são adicionados ao solvente de extração acetonitrila (AOAC, 2007), e o método da Norma Européia EN 15662 que inclui o cloreto de sódio ( $NaCl$ ) e tampão citrato em solvente acetonitrila (EN 15662, 2007).

As vantagens do método e suas variações incluem rapidez (6 a 12 extrações podem ser preparadas num período de 20 a 30 minutos), simplicidade (pode ser executado por uma única pessoa sem necessidade de formação técnica), confiabilidade (alcança recuperações elevadas, superiores a 85%, e resultados muito precisos), robustez (cobre um amplo espectro de agrotóxicos extraídos, incluindo agrotóxicos com carácter ácido, básico e aqueles muito polares), baixo custo (ocupa pouco espaço de bancada podendo ser realizado em laboratórios pequenos, utilizando poucos equipamentos, vidrarias e reagentes baratos), e baixo consumo de solventes e geração de resíduos (SCHENCK, HOBBS, 2004; PIZZUTTI et al., 2007; PAREJA et al., 2011; LEHOTAY, 2011).

Apesar de ter sido desenvolvido para extração de agrotóxicos em frutas e vegetais, a metodologia QuEChERS tem evoluído para um modelo flexível com utilização em diversas áreas de pesquisa e aplicação em diferentes compostos (LEHOTAY et al., 2010). Além da análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (SCHENCK, HOBBS, 2004; LEHOTAY et al., 2005; DIEZ et al., 2006; LOOSER et al., 2006; GARCIA-REYES et al., 2007; LESUEUR et al., 2008; KOESUKWIWAT et al., 2008; LI et al., 2009, CIESLIK et al., 2011;

GILBERT-LÓPEZ et al., 2010; MASTOVSKA et al., 2010; JEONG et al., 2012) o conceito QuEChERS foi utilizado para hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (RAMALHOSA et al., 2009), resíduos de drogas veterinárias (STUBBINGS, BIGWOOD, 2009; KEEGAN et al., 2009), drogas no sangue (PLOSSL et al., 2006), poluentes do solo (PINTO et al., 2010), tabaco (LEE et al., 2008), entre outros.

### 2.3 Microextração em Fase Sólida (SPME)

A microextração em fase sólida (SPME) foi primeiramente relatada por Arthur e Pawliszyn em 1990 (ARTHUR, PAWLISZYN, 1990). Introduzido para análise de compostos relativamente voláteis na área ambiental, o método vem sendo empregado com sucesso em uma grande variedade de matrizes: gasosas, líquidas ou sólidas, e para a análise de compostos voláteis e não-voláteis com aplicações na área da físico-química, ambiental, farmacêutica, forense e em alimentos (PAWLISZYN, 1999; GONZÁLEZ-BARREIRO et al., 2000; LAMBROPOULOU et al., 2002; CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2003; KOMATSU et al., 2004).

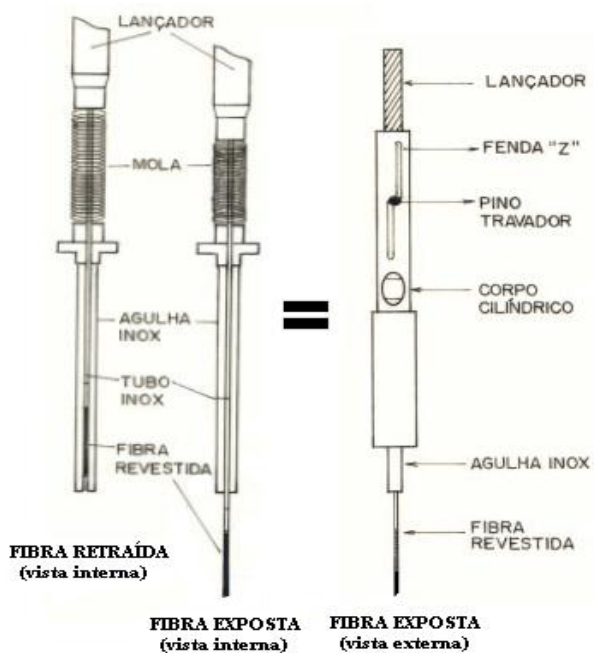
Na sua forma original, o método SPME baseia-se em dois estágios de separação: a partição dos analitos entre a matrix da amostra e um polímero de revestimento, e posterior dessorção térmica dentro do instrumento de análise (BELTRAN, 2000). Para tanto, um bastão de fibra óptica, de sílica fundida, recoberta com um filme fino de um polímero ou de um adsorvente sólido, é empregado. Esta fibra óptica atua como fase extratora, sendo acondicionada dentro de uma agulha de microseringa, para a extração dos analitos (Figura 2). A microseringa é usada para possibilitar a introdução da fibra no cromatógrafo, e protegê-la enquanto não estiver em uso (LANÇAS, 2008).

A extração pode ser feita por imersão direta, mergulhando a fibra diretamente na amostra e permitindo que ocorra a partição dos analitos entre a matriz e a fibra (sistema duas fases), ou através da técnica de “*headspace*”, na qual a amostra é freqüentemente aquecida e a fibra entra em contato com o vapor, componentes voláteis, em equilíbrio com a amostra (sistema três fases) (PAWLISZYN, 1997). Após a extração, a fibra contendo os analitos é retirada da amostra e inserida no injetor de um cromatógrafo a gás (Figura 3), onde os analitos são termicamente dessorvidos sob o fluxo do gás de arraste e carregados para a coluna cromatográfica (HERNANDO, 2002; QUINTEIRO et al, 2003), ou em um cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC, do inglês *High-performance liquid chromatography*), no qual os analitos são



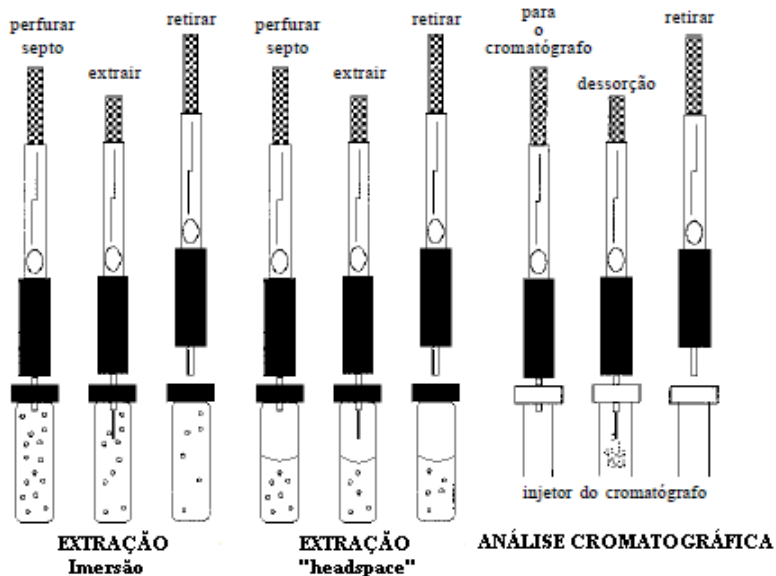
dessorvidos pela fase móvel (NEGRÃO, ALPENDURADA, 1998; LORD, PAULISZYN, 2000).

Figura 1 - Dispositivo da fibra de SPME



Fonte: VALENTE, AUGUSTO (2000), QUINTEIRO et al. (2003).

Figura 2 - Processo de SPME, pela técnica de imersão direta, headspace, e dessorção do material extraído pela análise em CG



Fonte: VALENTE, AUGUSTO (2000).

Apesar de estar disponível comercialmente, a técnica de SPME ainda continua em fase de desenvolvimento. Segundo Beltran (2000), Casas et al. (2006) e Olivares (2006) no desenvolvimento de processos específicos de extração de agrotóxicos utilizando a SPME é necessário a otimização de diferentes tipos de variáveis tanto do estágio de partição quanto do estágio de dessorção, como: tipo de revestimento da fibra, tempo de extração, agitação, pH, concentração de sal, temperatura e tempo de dessorção. Essas variáveis são alteradas conforme o tipo de agrotóxico estudado e a amostra da qual se quer extraí-lo.

As primeiras fibras desenvolvidas para utilização em SPME foram as revestidas com Polidimetilsiloxano (PDMS) e Poliacrilato (PA) (BELTRAN, 2000). Atualmente existem inúmeros revestimentos comercialmente disponíveis, cobrindo uma ampla gama de polaridades, diversas espessuras e temperaturas de dessorção. A escolha vai depender da natureza química do composto em estudo, além de sua polaridade e volatilidade (MESTER et al. 2001). São exemplos de fibras: PDMS (apolar, 100, 30 e 7  $\mu\text{m}$  de espessura), PA (polar, 85  $\mu\text{m}$  de espessura), Carbowax-Polietileno Glicol (PEG) (polar, 60  $\mu\text{m}$  de espessura),

Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS/DVB) (polar, 65 e 60 µm de espessura), Carboxen-PDMS (CAR/PDMS) (75 e 85 µm de espessura), Carbowax-resina template (CW/TPR) (polar, 50 µm de espessura) e Divinilbenzeno-carboxen-PDMS (DVB/CAR/PDMS) (ampla faixa de polaridade, 30 e 50 µm de espessura) (SIGMA-ALDRICH, 2012).

O tempo de extração está relacionado com o período necessário para que seja estabelecido o equilíbrio dos analitos entre as fases de recobrimento da fibra (estacionária) e a amostra. Sendo a SPME um processo de partição, a quantidade máxima a ser extraída será atingida quando o equilíbrio for estabelecido. Para os compostos que possuem coeficientes de partição menor, o tempo para alcançar tal equilíbrio é mais longo e a agitação constante da amostra faz-se necessária. A agitação incrementa a taxa de transferência de massa e abrevia o tempo de extração. A otimização destes parâmetros é de fundamental importância para assegurar a boa reprodutibilidade do método (ALPENDURADA, 2000).

O pH da amostra, assim como o teor de sal, é crucial para um bom resultado na SPME. Isto é explicado teoricamente pelo equilíbrio da extração estar correlacionado com o equilíbrio ácido-base. Assim compostos básicos poderão ser melhor extraídos em soluções básicas, enquanto compostos ácidos devem ser extraídos em soluções ácidas (ULRICH, 2000). A adição de sais, como cloreto de sódio (NaCl) ou sulfato de sódio, aumenta a força iônica da amostra submetida a extração. Isto faz com que a solubilidade dos compostos orgânicos diminua, aumentando o coeficiente de partição. A ocorrência do *salting-out* pode interferir também no efeito do pH sobre a extração da amostra (ALPENDURADA, 2000). No entanto, altas concentrações de sal podem resultar em efeitos negativos para a estabilidade da fibra, dependendo do tipo de revestimento utilizado (BELTRAN, 2000), não sendo recomendado a adição de mais de 10% de NaCl (ULRICH, 2000).

Aguirre-González et al. (2011) indicaram o efeito da temperatura sobre a extração dos analitos. Segundo estes, aumentando a temperatura da amostra, aumenta-se também o coeficiente de dissociação dos analitos, e dessa forma diminui-se o tempo para que o equilíbrio entre as fases seja atingido. Porém, neste processo o coeficiente de distribuição revestimento/amostra também diminui, o que dependendo do grau do aumento dessa temperatura, pode resultar numa diminuição da quantidade de analito extraído ao alcançar o equilíbrio, caracterizando perda de sensibilidade.

Estudos utilizando SPME para a extração de agrotóxicos em alimentos, mostram a alta seletividade, sensibilidade, precisão e

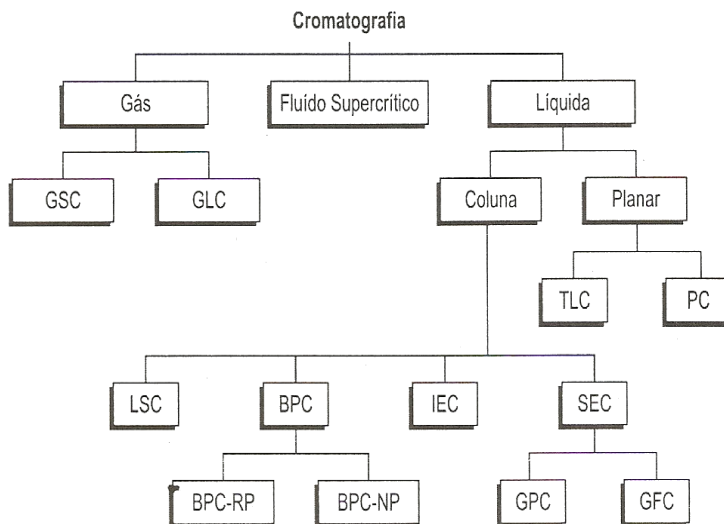
recuperação do método para amostras de sucos de frutas e vegetais (FILHO et al., 2010). A adaptação da metodologia, que inicialmente era empregada apenas em matrizes líquidas, vem permitindo a aplicação da técnica com eficiência também em alimentos sólidos, sem etapas de purificação e tratamentos adicionais (BEYER, BIZIUK, 2008).

### 3 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

A cromatografia é uma técnica de separação física, fundamentada na migração dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis: *fase estacionária* e *fase móvel*. Nesta, um fluído insolúvel percola através da fase estacionária, de grande área superficial, ocorrendo a separação (LANÇAS, 2004; HARRIS, 2003). A grande variedade de combinações entre as fases torna a cromatografia extremamente versátil e de grande aplicação, podendo ser utilizada para a identificação, purificação e separação de compostos (COLLINS et al. 1993).

As técnicas cromatográficas podem ser classificadas quanto ao mecanismo de separação, a fase utilizada e ao tipo de superfície na qual a separação ocorre (LANÇAS, 2004). A classificação mais popular no momento, de acordo com a natureza física da fase móvel é apresentada na Figura 4, onde: GSC (Gas Solid Chromatography) – Cromatografia gás-sólido, GLC (Gas Liquid Chromatography) – Cromatografia gás-líquido, LSC (Liquid Solid Chromatography) – Cromatografia líquido-sólido, BPC (Bonded Phase Chromatography) – Cromatografia de fase ligada, BPC-RP (Reverse Bonded Phase Chromatography) - Cromatografia de fase reversa, BPC-NP (Normal Bonded Phase Chromatography) – Cromatografia de fase normal, IEC (Ion Exchange Chromatography) – Cromatografia de troca iônica, SEC (Size-Exclusion Chromatography) – Cromatografia de exclusão molecular, GPC (Gel Permeation Chromatography) - Cromatografia de permeação em gel, GFC (Gel Filtration Chromatography) – Cromatografia de filtração em gel, TLC (Thin Layer Chromatography) – Cromatografia em camada delgada e PC (Paper Chromatography) – Cromatografia em papel.

Figura 3 - Classificação das técnicas cromatográficas de acordo com a natureza física da fase móvel.



Fonte: LANÇAS (2008).

Segundo Hernandez et al. (2006), Romero-Gonzales et al. (2006) e Lanças (2008) a cromatografia gasosa vem sendo utilizada desde os anos 70 para a análise de compostos voláteis, de baixa e média polaridade, e termicamente estáveis nas temperaturas empregadas nas análises. Além de possuir um alto poder de resolução o método é muito atrativo devido à possibilidade de detecção em escala de nano a picogramas.

Na cromatografia gasosa a separação dos componentes da amostra ocorre através de uma fase gasosa móvel sobre um sorvente estacionário. A técnica pode ser dividida em duas categorias principais: cromatografia gás-líquido, neste caso, ocorre a partição de uma amostra entre uma fase gasosa móvel e uma camada delgada de líquido não-volátil que recobre um suporte inerte, e a cromatografia gás-sólido que emprega um sólido com grande área superficial como fase estacionária.

Um sistema cromatográfico a gás é formado pelas seguintes unidades fundamentais: gás de arraste, injetor, coluna, forno, detector e registrador. O gás de arraste tem como função levar as moléculas da amostra a ser separada do ponto de injeção até o detector, passando pela coluna onde irá ocorrer a separação. A coluna consiste de um tubo longo que contém a fase estacionária, nesta a natureza do tubo e do suporte

sólido, o tipo e a quantidade da fase líquida, o método de recheio, o comprimento e a temperatura são de total importância para se ter a resolução desejada (COLLINS et al., 1997; AQUINO NETO, NUNES, 2003).

O detector é o principal responsável pela quantidade mínima da substância a ser detectada, eles transformam variações na composição do gás de arraste em sinais elétricos (PERES, 2002). Atualmente estão disponíveis diversos tipos de detectores: por condutividade térmica, ionização de chama, captura de elétrons, nitrogênio-fósforo, fotométrico de chama, condutividade eletrolítica, micro coulombimétrico, fotoionização e espectrometria de massa (COSTA, 2007).

O Detector de Captura de Elétrons (ECD) é um detector seletivo, responsável pela identificação de haletos, nitratos, nitrilas, peróxidos, anidridos e organometálicos (HARRIS, 2001). O princípio de operação deste detector está baseado no monitoramento de uma corrente elétrica gerada por elétrons emitidos por uma fonte radioativa. O gás de arraste ( $N_2$ ) passa pelo detector e é ionizado por partículas betas emitidas de uma lâmina que contém o isótopo radioativo  $^{63}Ni$ . Os elétrons produzidos neste processo são coletados em um anodo, gerando uma corrente que é amplificada por um eletrômetro, resultando a linha de base. Moléculas do analito eluído da coluna, capazes de capturar elétrons, diminuem esta corrente, gerando um sinal proporcional à sua concentração (FOWLIS, 1995). O ECD tem grande popularidade dentre os detectores devido a sua alta sensibilidade e utilidade para análise de grande quantidade de compostos. É muito utilizado para análise de resíduos de agrotóxicos (MIAO et al., 2013; SHEN et al., 2013; LIU et al., 2015; PAZ et al., 2015), poluentes gerados em processos químicos (SURMA-ZADORA, GROCHOWALSKI, 2008; BOUWMAN et al., 2015), drogas (SUCHARA et al., 2008) e outros compostos biologicamente ativos.

A cromatografia gasosa acoplada a espectrômetros de massas (MS), é uma das técnicas cromatográficas mais utilizadas (LEANDRO et al., 2005). A facilidade do acoplamento das colunas cromatográficas com estes detectores, além da disponibilidade de um banco de espectros padrões obtidos no modo de impacto de elétrons, ajudaram na disseminação da técnica de GC-MS para a análise de resíduos de agrotóxicos (PRESTES, 2007). A técnica permite que a determinação e a confirmação de um grande número de compostos sejam feitas simultaneamente, em um único instrumento e numa única corrida cromatográfica. Os baixos limites de detecção obtidos são consequência da alta seletividade (FERNANDEZ-ALBA, 2005), o que permite a

análise de resíduos de agrotóxicos a nível de traços na presença de interferentes provenientes da matriz (MARTINEZ-VIDAL, 2002).

#### 4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de um método constitui um processo contínuo de avaliação, desde a etapa de processamento, passando pelo desenvolvimento e coleta dos dados, até o monitoramento constante de sua aplicação (RIBANI et al., 2004). O objetivo é garantir que os resultados gerados possuam a confiabilidade e rastreabilidade necessária para o fim que se propõe (PRESTES, 2007).

Em geral, a validação de uma metodologia envolve a execução e interpretação de uma série de experimentos planejados, a fim de avaliar as características do método (QUEIROZ, 2001). Dessa forma, todas as variáveis devem ser consideradas, tais como a estratégia de amostragem, preparação da amostra, detecção e avaliação dos dados (ZANELLA et al., 2000).

A União Europeia formulou através da Direção Geral de Saúde e Defesa do Consumidor (DG – SANCO), um guia com procedimentos específicos para a validação de métodos de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos e ração (Document N° SANCO/12495/2011). Neste documento, a linearidade, o efeito matriz, o limite de quantificação (LOQ), a especificidade, a exatidão, a precisão e a robustez aparecem como principais parâmetros para a validação satisfatória de um novo método analítico. No entanto, o mesmo documento destaca que um número menor ou maior de parâmetros pode ser avaliado caso os dados obtidos consigam demonstrar o desempenho do método.

A **linearidade** é definida como a capacidade de um método analítico gerar resultados proporcionais à concentração da espécie em análise, dentro de uma faixa analítica especificada (CHASIN et al., 1998). Esta é determinada através das chamadas curvas de calibração, que relacionam a resposta do equipamento em função das diferentes concentrações do analito (LANÇAS, 2004). A maioria dos autores sugerem que no mínimo 5 diferentes concentrações do padrão utilizado devem compor a curva, enquanto outros propõem a utilização de no mínimo 6 concentrações diferentes para cada analito (ISO/IEC 17025, 1999; SANCO, 2011; US-FDA, 2012; ANVISA, 2003).

Para a maioria das técnicas cromatográficas, uma relação linear de primeira ordem é observada, podendo ser descrita pela equação de regressão linear  $y = ax + b$ , onde  $b$  é o coeficiente linear e  $a$  o

coeficiente angular da curva (PIMENTEL, BARROS NETO, 1996). Além dos coeficientes *a* e *b*, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação *r* e o coeficiente de determinação *r*<sup>2</sup> (RIBANI et al., 2004). Valores de *r* iguais ou superiores a 0,99 são recomendados. Os valores do coeficiente de determinação *r*<sup>2</sup> são tidos como satisfatórios a partir de 0,98 (CHASIN et al., 1998).

O **limite de detecção** (LOD) é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, dentro de um nível de confiança especificado ou que pode ser especificamente diferente do ruído. O **Limite de Quantificação** (LOQ) constitui a menor concentração da substância em análise que pode ser quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (LANÇAS, 2004; RIBANI et al., 2004). LOD e LOQ são geralmente expressos em unidades de concentração e podem ser calculados utilizando três métodos diferentes: o método visual, o método relação sinal-ruído ou o método baseado em parâmetros da curva analítica (CHASIN et al., 1998). Em técnicas analíticas de separação, como as cromatográficas e eletroforéticas, o método baseado nos parâmetros da curva analítica é o mais utilizado (RIBANI et al., 2004).

A **exatidão** de um método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. Esta é calculada como a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor aceito como verdadeiro, acrescida dos intervalos de confiança (INMETRO, 2010).

A recuperação (ou fator de recuperação) consiste na proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e quantificada (RIBANI et al., 2004). Nos ensaios de recuperação soluções do padrão analítico de interesse, de concentração conhecida, são adicionadas à matriz isenta do analito e posteriormente extraídas e quantificadas. A porcentagem de recuperação é calculada em função da quantidade de analito determinada pelo método. São aceitas recuperações na faixa de 70 % a 120 % (LANÇAS, 2004; SANCO, 2011).

A **precisão** avalia a concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra (LANÇAS, 2004), ou seja, mede o quanto os resultados se assemelham entre si (LEITE, 2002; COSTA, 2007). Pode ser medida por meio do desvio-padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV), resultante da injeção, em cromatografia, de pelo menos cinco replicatas de padrões analíticos.



Métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um RSD de 1 a 2%, enquanto que para métodos de análise de traços ou resíduos, são aceitos RSD de até 20% (RIBANI et al., 2004). A precisão pode ser determinada em termos de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local e repetições em um curto intervalo de tempo (INMETRO, 2010).

A **robustez** mede a sensibilidade que o método apresenta em face de pequenas e deliberadas variações (SOARES SOBRINHO et al., 2005). Pode-se, portanto, afirmar que um método possui uma robustez intrínseca, quando variações ocorrem sem causar alteração significativa nos resultados (RIBANI et al., 2004).

Em métodos de extração e determinação cromatográfica a robustez pode ser avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e concentração salina da amostra, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em CG, bem como o tempo de extração, agitação, etc. As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (RIBANI et al., 2004).



## **CAPÍTULO 2**

### **OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DO MÉTODO QUECHERS- CG-ECD E INVESTIGAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM MAÇÃS, MORANGOS E TOMATES PRODUZIDOS NO SUL DO BRASIL**



Artigo publicado:

LORENZ, J. G.; COSTA, L. L. F.; SUCHARA, E. A.; SANT'ANNA, E. S. Multivariate optimization of the QuEChERS-GC-ECD method and pesticide investigation residues in apples, strawberries, and tomatoes produced in Brazilian South. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 9, p. 1583-1591, 2014.

**MULTIVARIATE OPTIMIZATION OF THE QUECHERS-GC-ECD METHOD AND PESTICIDE INVESTIGATION RESIDUES IN APPLES, STRAWBERRIES, AND TOMATOES PRODUCED IN BRAZILIAN SOUTH**

*Juliana G. Lorenz<sup>a\*</sup>, Léa L. F. Costa<sup>b</sup>, Eliane A. Suchara<sup>c</sup>, Ernani S. Sant'Anna<sup>a</sup>*

*<sup>a</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos CAL/CCA, Universidade Federal de Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, CEP: 88034-001, Itacorubi, Florianópolis, SC, Brazil.*

*<sup>b</sup> Laboratório Central de Saúde Pública LACEN, Secretária de Estado da Saúde de Santa Catarina, Avenida Rio Branco, 152, CEP: 88015-201, Florianópolis, SC, Brazil.*

*<sup>c</sup> Universidade Federal do Mato Grosso, Rodovia MT 100, Km 3,5, CEP: 79698-000, Barra do Garça, Mato Grosso, MT, Brazil.*

Culturas como maçã, morango e tomate estão entre os alimentos de maior contaminação por uso de pesticidas no Brasil. Pensando nisso, a otimização multivariada do método QuEChERS, acoplado ao GC-ECD, foi proposta a fim de investigar os níveis de resíduos dos pesticidas clorpirifós, dimetoato, malationa, mevinfós, pendimetalina, simazina e trifluralina em maçãs, morangos e tomates produzidos no Estado de Santa Catarina, sul do Brasil. O processo envolveu os planejamentos fatorial completo 2<sup>4</sup> e Doehlert seguido de validação do método modificado e aplicação em 91 amostras coletadas durante os anos de 2010 e 2011. As modificações realizadas no método proporcionaram aumento de detectabilidade e valores satisfatórios de linearidade, precisão e exatidão. Nas amostras, resíduos de pelo menos um pesticida ( $\geq$  LOQ) foram encontrados em 8 (27.6%) amostras de maçãs, 12 (40.0%) morangos e 17 (53.1%) tomates. Os resultados

indicaram a necessidade de monitoramento contínuo para o uso destes pesticidas em frutas e vegetais.

Apple, strawberry and tomato are among the foods with higher contamination for pesticide use in Brazil. Thereby, a multivariate optimization of the QuEChERS method coupled to GC-ECD was proposed to investigate the level of pesticides residues clorpyrifos, dimethoate, malathion, mevinphos, pendimethalin, simazine and trifluralin in apple, strawberries and tomatoes produced in Santa Catarina state, South of Brazil. The process involved a two-level full factorial and Doehlert designs followed by validation of the modified method and its application in 91 samples collected during the years 2010 and 2011. Modifications in the method provided increased detectability and satisfactory values of linearity, accuracy and precision. In samples, residues of at least one pesticide ( $\geq$  LOQ) were found in 8 (27.6%) apple, 12 (40.0%) strawberry and 17 (53.1%) tomato samples. The results indicated the necessity of continuous monitoring and strict regulation for pesticide use in fruits and vegetables.

**Keywords:** pesticides; QuEChERS; multivariate optimization; fruits; Brazil.

## 1 INTRODUCTION

Brazil is one of the main food producers and exporters in the world.<sup>1</sup> The South Brazilian region for instance, constitutes a great hortifruticulture center, being the state of Santa Catarina a leader in apple cropping.<sup>2</sup> Nevertheless, the great production of fruits and vegetables is strongly related to the excessive use of pesticide. According to data from Brazilian National Monitoring Program for Pesticide Residues in Food,<sup>3</sup> pesticides such as chlorpyrifos, dimethoate, malathion and mevinphos are frequently used in fruit and vegetable growing, without necessarily being authorized for use in some cultures. Furthermore, residues of some other non-recommended and restricted use pesticides can also be found in these foods from indirect sources, such as adjacent crops, soil, and irrigation waters.<sup>4-6</sup> As a way to control the use of such compounds and to improve the quality of the products for local consumption and export, the development of modern, specific, and sensitive methods is necessary to detect pesticides in food.<sup>7</sup>

The QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method, developed originally by Anastassiades *et al.*,<sup>8</sup> has been

used for extraction of pesticide residue in a wide range of foods and other agricultural products.<sup>9,10</sup> Characteristics such as low consumption of reagents, generation of small amounts of waste, simplicity of the operations, low cost of analysis, and efficient removal of matrix components and high recoveries of the analysed compounds, are responsible for the popularity of this method<sup>10-14</sup>.

Despite of all the advantages, important variables that help increasing the efficiency of extraction can still be enhanced in QuEChERS, including: sample quantity, solvent volume, pH and temperature of extraction. In the original method, the ratio of sample quantity/solvent volume (1:1) result in a low pre-concentration of compounds in the extracts, and can lead to higher detection limits, i.e. lower sensitivity. According to some researchers this ratio is the principal disadvantage of the QuEChERS compared to other extraction methods.<sup>15-17</sup> In addition, the pH and temperature effects on the recovery of pesticides, especially those sensitive to basic pH and thermolabile, must also be considered.<sup>18-20</sup> The optimization of such variables is necessary for improving the method sensitivity by increasing detection and recovery levels.

Various analytical methods including gas chromatography (GC) and liquid chromatography (LC) coupled with various detectors have been developed for the determination of pesticides.<sup>21</sup> The most frequently used technique is gas chromatography (GC) especially coupled with electron capture detector (ECD), nitrogen phosphorus detector (NPD), flame photometric detector (FPD) and mass spectrometry (MS).<sup>15,21</sup> Among them, ECD is commonly used for the determination of organochlorine and pyrethroid pesticides, however research using this detector for multiresidue determinations show excellent results. In the literature variations of the QuEChERS method using GC-CD analysis are described for different pesticides residues in foods,<sup>22,23,24,25</sup> including apples, strawberries and tomatoes.<sup>26,27</sup> These studies, the ratio of sample quantity/solvent volume was not modified.

Univariate methods of optimization neglect the interaction between the variables, therefore the obtained results do not necessarily correspond to the conditions which lead to the perfect optimum. In chemical systems, the variables are often strongly correlated, interacting through mechanisms which provide synergistic and antagonistic effects. If such fact is ignored, the optimization process has little value.<sup>28,29</sup> The multivariate optimization includes factorial designs and response surface methods, which are used to evaluate the main and interactive effects of variables in relation to analytical response.<sup>30</sup> Furthermore, it reduces the

number of necessary experiments to provide sufficient information for statistically acceptable results.<sup>31</sup>

In the present study, a multivariate optimization of the QuEChERS method coupled to GC-ECD was proposed to evaluate important variables of the extraction process and investigate the levels of pesticides residues of chlorpyrifos, dimethoate, malathion, mevinphos, pendimethalin, simazine and trifluralin in apples, strawberries and tomatoes grown and commercialized in the State of Santa Catarina, South Brazil. A multivariate optimization process was used, followed by validation of the modified methodology and application in real samples.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Sample

Apples, strawberries, and tomatoes were weekly collected between September 2010 and April 2011, at the Supply Center of Santa Catarina State (CEASA), Brazil. The collections were made randomly, without preference of size, type or color. A minimum of 1 kg of each sample was collected per collection day.<sup>32</sup> The samples were packed into sealed plastic sacks, transported to the laboratory and immediately conditioned at  $-18 \pm 2$  ° C until the analysis.

Samples with no pesticide residues were purchased at local organic products shop and used for the optimization and validation assay. Analyzes were carried out to confirmation of the absence of pesticides in such samples (data not shown).

### 2.2 Reagents and Standards

Water was purified through a Milli-Q system from Millipore®. Anhydrous magnesium sulphate p.a. and sodium chloride p.a. were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The PSA (primary and secondary amine) sorbent was obtained from Varian (Varian, Harbor City, CA). Glacial acetic acid p.a. and solvents acetonitrile, toluene and methanol, all high performance liquid chromatography grades were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

The pesticide analytical standards of chlorpyrifos, dimethoate, malathion, mevinphos, pendimethalin, simazine and trifluralin, all with purity higher than 98.0%, were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA), as well as Tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate



(TDCPP) used internal standard. Individual pesticide stock solutions ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) were prepared in toluene. Intermediate solutions ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) of each pesticide were obtained by dilution of the stock standard solutions in methanol. Two mixed work solutions were prepared, one by the mixture of intermediate standard solutions of chlorpyrifos, dimethoate, malathion, and mevinphos (Mix 1), and the other by mixture of pendimethalin, simazine and trifluralin (Mix 2). The pesticides were grouped in each mix according to their physicochemical properties. Such solutions were diluted successively in methanol and added into varied concentrations in samples submitted to tests of optimization and validation. All solutions were stored in amber bottles and kept at  $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ , protected from light.

### 2.3 Instrumentation

The analysis were carried out in a gas chromatograph CP-3800 (Varian, USA) equipped with electron capture detector (ECD). The capillary column used was CP SIL 8CB ( $50 \text{ m} \times 0.53 \text{ mm}$ ,  $5.0 \mu\text{m}$  film thickness) (Varian, USA). The injections were carried out manually in splitless mode with the injector at  $220^\circ\text{C}$ . Nitrogen (99,999%) was used as the carried gas at a flow rate of  $1 \text{ mL min}^{-1}$  at the initial temperature of column oven. The temperature program of the chromatographic column used was:  $90^\circ\text{C}$  (1 min), heating up to  $210^\circ\text{C}$  to  $30^\circ\text{C min}^{-1}$  (6 min), and  $5^\circ\text{C min}^{-1}$  up to  $250^\circ\text{C}$  (2 min); with analysis time of 25 min. The detector temperature was  $300^\circ\text{C}$ . The data were obtained using the software Star Chromatography Workstation 6.2 version.

### 2.4 Extraction process – QuEChERS method

Samples of apple, strawberry and tomato were homogenized individually in a commercial blender. For each sample, a portion of 18 g was weighed into a 50 mL centrifuge tube (Sarstedt AG. & Co., Germany). The internal standard was then added at  $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$  concentration. Samples destined for optimization and validation assay were fortified with work mix solutions. These were carefully mixed and left at rest for at least 30 min before the extraction. A 10 mL volume of acetonitrile was added as extraction solvent and the pH was adjusted to 5 with acetic acid. The tube was tightly capped and shaken vigorously by vortex for 1 min. Then, 1 g of sodium chloride and 4 g of magnesium sulphate anhydrous were added and the mixture was immediately

shaken for further 1 min. The extract was centrifuged at 5000 rpm for 3 min and 10 °C. After centrifugation, 1 mL of supernatant was transferred to another centrifuge tube (Eurotips Scientific) containing 50 mg of PSA and 300 mg of magnesium sulphate anhydrous. The tube was shaken in a vortex for 1 min and centrifuged again at 3000 rpm for 5 min. The final extract was stored into glass vials at  $-18 \pm 2$  °C.

The parameters sample amount (18 g), solvent volume (10 mL), pH (5) and extraction temperature (10 °C) were predetermined by optimization analyzes performed through multivariate experimental design, described in the Multivariate optimization section.

## 2.5 Multivariate optimization

Strawberry samples were used as matrix for the optimization of QuEChERS method. These were fortified with  $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$  of the internal standard and work mix solutions.

The optimization process was performed in two steps. In the first moment, the parameters sample amount, solvent volume, pH and extraction temperature were submitted to a full factorial design to evaluate which of those variables had significant effect on the efficiency of extraction of pesticide. The design was constructed based on a  $2^4$  factorial design with 3 replications of the center point to estimate the experimental error, leading to 19 experiments, carried out in random order. The variables were evaluated at three levels, coded as -1, 0 and +1: sample amount (5, 10, and 15 g), solvent volume (5, 10, and 15 mL), pH (3, 5, and 7), and extraction temperature (5, 10, and 15 °C) (Table 1). Wide ranges of variation were adopted because it is a multiresidue methodology where pesticides with different properties will be extracted simultaneously.

Secondly, the parameters that were significant (indicated by a Pareto chart) were optimized by a response surface methodology through a Doehlert matrix. The variables evaluated in this case were sample amount at five levels (10, 15, 20, 25, and 30 g) and solvent volume at three levels (0, 5, and 10 mL). A total of 9 experiments were carried out, considering 3 repetitions of the central point, in order to allow the estimation of experimental variance.

One response for each pesticide was obtained in each chromatographic run (chromatographic peak area). The geometric mean of the peak areas for the seven pesticides was used as optimization response, in order to better express a unique set of optimum conditions

for the extraction of all the analytes. The *Statistica* (version 6.0) software program was used for statistical evaluation of the data.

## 2.6 Validation of the method

The validation study of method was performed for each of the three fruits samples fortified with different concentrations of the work mix. Analytical parameters of linearity, sensitivity, accuracy and precision, were evaluated as suggested by the European Commission SANCO NCCLS guideline 12495/2011.<sup>33</sup> The linearity was analyzed using concentrations of 0.1; 1.0; 10; 100; 250; 500; 750; 1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , prepared in triplicate and randomly injected. The calibration curves were plotted as the relative peak areas (pesticide versus internal standard) as a function of the concentration ratio (pesticide concentration versus internal standard concentration). The sensitivity was expressed in terms of Limits of detection (LOD, concentration for signal/noise=3) and quantification (LOQ, concentration for signal/noise=10). The accuracy and precision were evaluated through recovery and repeatability tests, respectively. These were performed through of 5 replicates of the blank samples fortified with two different concentration levels of pesticides.

Tabela 1 - Two-level full factorial design for the screening of the significant variables

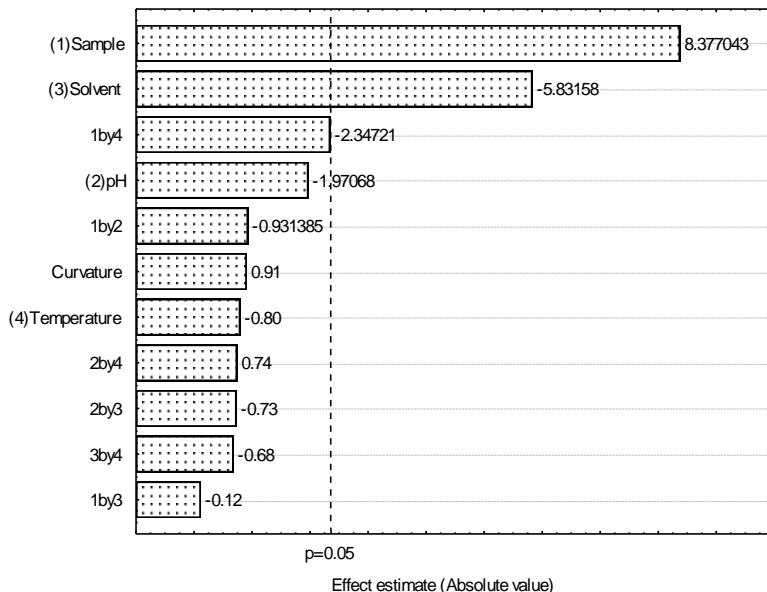
	Sample (g)	Solvent (mL)	pH	Temperature (°C)
1	5.00 (-)	5.00 (-)	3.00 (-)	5.00 (-)
2	15.00 (+)	5.00 (-)	3.00 (-)	5.00 (-)
3	5.00 (-)	5.00 (-)	3.00 (-)	5.00 (-)
4	15.00 (+)	5.00 (-)	3.00 (-)	5.00 (-)
5	5.00 (-)	15.00 (+)	7.00 (+)	5.00 (-)
6	15.00 (+)	15.00 (+)	7.00 (+)	5.00 (-)
7	5.00 (-)	15.00 (+)	7.00 (+)	5.00 (-)
8	15.00 (+)	15.00 (+)	7.00 (+)	5.00 (-)
9	10.00 (0)	10.00 (0)	5.00 (0)	10.00 (0)
10	10.00 (0)	10.00 (0)	5.00 (0)	10.00 (0)
11	10.00 (0)	10.00 (0)	5.00 (0)	10.00 (0)
12	5.00 (-)	15.00 (+)	7.00 (+)	15.00 (+)
13	15.00 (+)	15.00 (+)	7.00 (+)	15.00 (+)
14	5.00 (-)	15.00 (+)	7.00 (+)	15.00 (+)
15	15.00 (+)	15.00 (+)	7.00 (+)	15.00 (+)
16	5.00 (-)	5.00 (-)	3.00 (-)	15.00 (+)
17	15.00 (+)	5.00 (-)	3.00 (-)	15.00 (+)
18	5.00 (-)	5.00 (-)	3.00 (-)	15.00 (+)
19	15.00 (+)	5.00 (-)	3.00 (-)	15.00 (+)

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Identification of the most significant variables

A full factorial design was used to elucidate the significant effects and the interactions of the variables sample amount, solvent volume, pH and extraction temperature. The Pareto chart obtained ( $R^2 = 0.94$ ) is shown in Figure 1. The sample amount and solvent volume were the variables of relevant effect, (+) 8.37 and (-) 5.83 respectively. These variables affect directly the geometric mean of peak areas for seven pesticides. As expected, the increase of sample amount and decrease of solvent volume can result in a greater extraction of studied pesticides.<sup>34</sup> All other factors and their interactions had small effects on response and low trust level ( $p < 0.05$ ), not being considered significant.

Figura 1 - Pareto chat obtained through full factorial design using as response the geometric mean of peak areas for pesticides chlorpyrifos, dimethoate, mevinphos, malathion, pedimentalin, simazine and trifluralin. Vertical line in the chart defines 95.0% confidence level.



Based on the results provided by Pareto chart, the significant variables were studied in a second step of the optimization process, through a Doehlert matrix. In such step, the pH and the temperature were fixed at 5 and 10 °C, respectively.

The pH value was defined according to the natural pH of the fruits and vegetables, variable between 3 and 5 for apple, strawberry and the tomato.<sup>35</sup> Therefore, it was not necessary to add large quantities of acid or basic reagents. At the same time, it was considered the fact that pHs between 4 and 5 are recommended for optimal extraction of pesticides. This pH range provides superior recoveries to 70.0% for sensitive compounds in acid environment and ensures stability for those sensitive in the alkaline environment.<sup>36,18</sup>

The temperature was chosen to avoid the degradation of some pesticides more sensitive to heat, as recommended by the literature.<sup>37, 20</sup> This is because the centrifugation mechanical process and the exothermic reaction caused by addition of MgSO<sub>4</sub>, can result in increase in temperature to about 45 °C harming the extraction.<sup>38, 39</sup>

### 3.2 Doehlert design application

A Doehlert design was used to define the optimal values for variables, sample amount and solvent volume. Doehlert constitutes a uniform distribution of the experiments in a three-dimensional space. For two variables, the design consists of one central point and six additional points forming a regular hexagon situated on a circle.<sup>40, 41</sup> As variables levels depend on the design geometry, a variable is studied in five levels while the other is studied in only three levels.<sup>41</sup> Table 2 shows the Doehlert's matrix and the corresponding experimental and predicted responses.

Tabela 2 - Doehlert's matrix and the corresponding experimental and predicted responses

	Factor		Geometric mean peak area	
	Sample (g)	Solvent (g)	Experimental	Predicted
1	0.00 (20)	0.00 (5)	8884449.9	7502326.6
2	1.00 (30)	0.00 (5)	2108887.6	1916743.5
3	0.50 (25)	0.86 (10)	7125494.9	7317638.9
4	-1.00 (10)	0.00 (5)	2519468.2	2711612.3
5	-0.50 (15)	-0.86 (0)	440635.6	248491.5
6	0.50 (25)	-0.86 (0)	112511.9	304656.0
7	-0.50 (15)	0.86 (10)	8360816.4	8168672.3
8	0.00 (20)	0.00 (5)	7164588.1	7502356.6
9	0.00 (20)	0.00 (5)	6458031.7	7502356.6

The predicted values for the geometric mean peak area are close to the experimental values demonstrating that the model is possibly applicable. The response surface shown in Figure 2 was built through the experimental responses. The model was governed by the equation:

$$R = -1.93.10^7 + 2.08.10^6 x - 51881.78 x^2 + 1.80.10^6 y - 87817.89 y^2 - 9071.97 xy,$$

where  $x$  and  $y$  are the sample amount and solvent volume, respectively, and  $R$  is the geometric mean of the peak area for the seven pesticides.

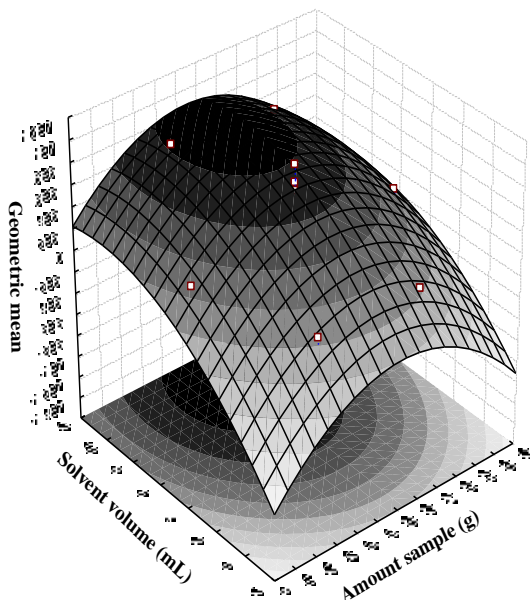


Figura 2 - Response surface graph for the geometric mean of the peak areas for pesticides chlorpyrifos, dimethoate, mevinphos, malathion, pendimethalin, simazine and trifluralin depending on the amount of sample /g vs solvent volume /mL

Analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the quality of relation between the response and the significant variables, in order to obtain the optimum extraction conditions. The results showed that the model was significant ( $F = 0.14$  and  $p < 0.05$ ) and the lack-of-fit test ( $p > 0.05$ ) indicated that the quadratic model was valid for this study. The same can be confirmed by the satisfactory determination coefficient obtained ( $R^2 = 0.96$ ), indicating that even using a variable which is not significant in the model, the results obtained are reliable.

The model equation allowed the higher point to be calculated at 19.24 g sample and 9.29 mL solvent. However, in order to facilitate homogenization of samples in extraction assays, the option was to use 18.00 g sample and 10.00 mL solvent, values that are still within the optimal region of the method (Figure 2). The extraction methodology was then defined as: 18.00 g sample, 10.00 mL solvent, pH 5.00, and temperature of 10 °C.

### 3.3 Analytical performed of the optimizes method

Good linearity range and satisfactory values of correlation coefficients ( $r$ ) were obtained for all studied pesticides. According to Table 3 the pesticides showed correlation coefficients above than 0.99. The LOD and LOQ of the method reached values considerably lower than the Maximum Residue Limits (MRL) established by the European Union<sup>42</sup> and by Brazilian Legislation.<sup>43</sup> LOD's similar, or even greater, have been reported in the literature,<sup>44-48</sup> depending on the instrumentation and analytical conditions used. According to Diez et al.<sup>16</sup> and Hiemsta et al.,<sup>34</sup> for extraction methods as the QuEChERS, an increase of sample/solvent relation leads to smaller LOD's for the same extract volume injected into the chromatographic system, which explains the results obtained.



Tabela 3 - Analytical parameters obtained for the optimized method: linear range, correlation coefficient (r), limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ)

Pesticide	Matrix	Linear range ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )	R <sup>a</sup>	LOD <sup>b</sup> ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )	LOQ <sup>c</sup> ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )
Chlorpyrifos	Apple	0.48 – 500	0.997	0.14	0.48
	Strawberry	1.64 – 1000	0.997	0.49	1.64
	Tomato	3.16 – 750	0.999	0.95	3.16
Dimethoate	Apple	5.26 – 750	0.993	1.58	5.26
	Strawberry	4.67 – 750	0.993	1.40	4.67
	Tomato	1.18 – 750	0.999	0.35	1.18
Mevinphos	Apple	1.38 – 750	0.997	0.41	1.38
	Strawberry	2.93 – 500	0.991	0.88	2.93
	Tomato	5.59 – 750	0.997	1.67	5.59
Malathion	Apple	0.79 – 1000	0.997	0.24	0.79
	Strawberry	1.76 – 750	0.996	0.53	1.76
	Tomato	0.87 – 500	0.999	0.26	0.87
Pendimethalin	Apple	2.73 – 500	0.998	0.82	2.73
	Strawberry	7.57 – 500	0.994	2.27	7.57
	Tomato	0.59 – 500	0.999	0.18	0.59
Simazine	Apple	5.02 – 250	0.995	1.51	5.02
	Strawberry	3.50 – 100	0.993	1.10	3.50
	Tomato	8.53 – 750	0.998	2.55	8.53
Trifluralin	Apple	1.31 – 500	0.997	0.39	1.31
	Strawberry	2.38-750	0.998	0.72	2.38
	Tomato	1.35 -750	0.999	0.40	1.35

All spiked samples presented satisfactory recovery rates for the target pesticides, ranging from 70.5% to 119.4% (Table 4). Approximately 93.0% achieved recoveries above 80.0%, which represents 95.0%, 97.0% and 100.0% for apple, strawberry and tomato, respectively. These recoveries indicate good accuracy of the method.

In relation to the repeatability, the relative standard deviations (RSDs) ranged from 2.2% to 16.6%. More than 60.0% of pesticides had RSDs below 10.0%, which verifies the good precision of the method.

These results show broad agreement with data from other researchers who also developed and validated different versions of QuEChERS method, for the determination of pesticides chlorpyrifos, dimethoate, mevinphos, malathion, pendimethalin, simazine and trifluralin in different fruits and vegetables. Lu et al.<sup>49</sup> modified and validated the QuEChERS method for determination of 45 pesticides of different chemical families in samples of apple, spinach and cucumber. Lesueur et al.<sup>45</sup> validated a method to analyze 105 pesticides for GC analysis and 46 for the HPLC analysis in tomato, lemon, grape and onion. Queiroz et al.<sup>48</sup> also validated a version of QuEChERS method followed by UPLC – MS/MS for detection and quantification of 29 pesticides in tomato, lettuce, apple and grape samples. The recovery's results observed in the present study are similar or even higher than those validated methods, although they have used chromatographic techniques coupled to mass spectrometry. It should be emphasized, that in those studies, the ratio sample quantity/solvent volume was not modified in validated methods. A specific evaluation of this parameter of the QuEChERS method was not found in the literature.

The QuEChERS provides several benefits compared to conventional extraction methods, such as simplicity of the steps, ease of execution and dynamism, which allow its affordable application/usage in pesticides analysis laboratories. The QuEChERS-GC-ECD method presented the same characteristics of the traditional method, but with greater sensitivity, accuracy and precision, which are important parameters for monitoring the ever smaller levels of residues in food.

Tabela 4 - Recovery and repeatability of the method for three samples evaluated

Pesticide	Conc. ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )	Recovery (%)			Repeatability (RSD %) <sup>a</sup>		
		Apple	Strawberry	Tomato	Apple	Strawberry	Tomato
Chlorpyrifos	10	87.7	107.8	117.4	9.7	8.7	8.7
	500	91.4	103.3	94.6	16.6	6.5	14.3
Dimethoate	10	70.5	110.3	103.2	8.9	7.9	12.2
	500	94.9	89.8	92.6	14.6	8.3	6.0
Mevinphos	10	78.3	114.9	119.4 85.9	15.1	11.8	4.9
	500	90.8	97.4		7.9	14.4	10.4
Malathion	10	105.6	113.2	98.1	9.5	2.2	15.0
	500	93.1	93.5	91.1	5.0	9.6	9.4
Pendimethalin	10	102.0	107.4	101.4	11.4	8.5	8.1
	500	95.4	91.0	84.8	9.7	3.3	8.5
Simazine	5	-	81.6	-	-	11.3	-
	10	92.2	-	99.7	14.6	-	12.3
Trifluralin	100	-	92.2	-	-	3.4	-
	250	110.1	-	-	12.7	-	-
Trifluralin	500	-	-	119.4	-	-	7.4
	5	-	113.1	-	-	3.1	-
Trifluralin	10	89.0	-	107.0	8.1	-	7.3
	250	-	71.9	-	-	7.5	-
500	89.1	-	84.6	8.7	-	15.1	

<sup>a</sup> Relative Standard Deviation

### 3.4 Application to real sample

The validated method was used for pesticides detection and quantification in apple, strawberry, and tomato real samples produced and commercialized in Santa Catarina State, South Brazil. A total of 91 samples were analyzed, considering 29 apples, 30 strawberries, and 32 tomatoes. Residue of at least one pesticide ( $\geq$  LOQ) was found in 8 (27.6%) apple samples, 12 (40.0%) strawberry samples, and 17 (53.1%) tomato samples. Except for the strawberries samples, most of the residue was below the MLRs stipulated by Brazilian Legislation.<sup>43</sup> The irregular samples (presence of non-authorized active ingredient or residue levels higher than the Brazilian MRL) represented 1 (12.5%), 10 (83.3%), and 6 (35.3%) of apple, strawberry and tomato positive samples, respectively.

Apples showed a lower number of residues. Only one sample presented residue (simazine) above the MRL ( $> 20 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Strawberries contained dimethoate, pendimethalin, and trifluralin at levels ranging from 10.40 - 111.90  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , none of which authorized in the country for fruit cultivation use. For the tomato, mevinphos residues were found above the MRL ( $> 200 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) in two samples. Chlorpyrifos, pendimethalin, and simazine, active non-authorized ingredients for this crop, were quantified between 19.30 - 211.50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Most of the irregularities found for the fruits under study were related to the use of non-authorized active ingredient. This fact was also reported by Ciscato et al.<sup>50</sup> In their study with export Brazilian fruit, 17.8% of the analyzed samples were contaminated by non-authorized active ingredients, while only 5.4% contained residue above the MRL. Similarly, Jardim and Caldas (2012),<sup>51</sup> based on Brazilian monitoring programs, found that approximately 72.1% of the positive fruit and vegetable samples were irregular by the presence of non-allowed ingredients. These authors justify the data in part due to the diverse agricultural population profile in the country. In many cases, the decisions on which pesticide to use depend on the costs and availability of product in agricultural properties.<sup>52</sup> Thus, a farmer will probably use a pesticide which is registered for one certain culture also in other crops grown on the same property, regardless of its registration status.<sup>51</sup>

Surveys carried out in other countries showed similar contamination percentages to those reported here. In Colombia, for example, pesticide residues were detected above the MRLs in 53.9% and 27.6% of the open field and greenhouse tomato samples

respectively, collected during the year 2011.<sup>53</sup> In Bangladesh between 2009 and 2012 pesticide waste was detected in 53.4% of the total tomato samples collected.<sup>54</sup> The analyzes of pesticides on imported apples from South America to Denmark, Estonia, Finland, Norway, and Sweden, showed 73.0% of positive samples and 12.0% samples with residues above the MRL.<sup>55</sup> Such results reflect the lack of efficient programs of guidance and awareness of farmers regarding the correct use of pesticides, such as the correct dose application, the application procedures and the appropriate interval between harvesting and pesticide treatment.

#### 1.1 4 CONCLUSIONS

The multivariate optimization of the QuEChERS method enabled the evaluation of important parameters that affect the extraction efficiency of pesticides in apple, strawberry and tomato samples. The changes applied to the methodology resulted in increased detectability and satisfactory values of linearity, accuracy and precision, when compared to other versions of QuEChERS. The analyses results performed in real samples have established the need for good preventive actions, such as orientation of the farmers and the continuous monitoring of the residues in fruit and vegetables produced in Southern Brazil.

#### Acknowledgements

The authors thank the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) for the financial support and also to Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN) by the loan of equipment.

#### 1.2 REFERENCES

1. Brooks, J.; *Food Policy* **2014**, *44*, 88.
2. Zagati, F. G.; Braga, D.; *Hortifruti Brasil* **2013**, *121*, 1.
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)* - Relatório de Atividades de 2011 e 2012, ANVISA: Brazil, 2013.
4. Sharma, D.; Nagpal, A.; Pakade, Y. B.; Katnoria, J. K.; *Talanta* **2010**, *82*, 1077.
5. Li, J.; Zhang, H.-F.; Shi, Y.-P. *Food Chem.* **2011**, *127*, 784.
6. Freitas, L. L.; Sant'Anna, E. S.; Benato, V. S.; Carasek, E.; *Int. J.*

*Environ. Anal. Chem.* **2012** 92, 313.

7. Carneiro, R. P.; Oliveira, F. A. S.; Madureira, F. D.; Silva, G.; de Souza, W. R.; Lopes, R. P.; *Food Control* **2013**, 33, 413. 392

8. Anastassiades, M.; Maštovska, K.; Lehotay, S. J.; *J. Chromatogr. A* **2003**, 1015, 163.

9. Furlani, R. P. Z.; Marcilio, K. M.; Lemea, F. M.; Tfouni, S. A. V.; *Food Chem.* **2011**, 126, 1283.

10. Cherta, L.; Beltran, J.; López, F.; Hernández, F.; *Food Anal. Methods* **2013**, 6, 1170.

11. Surma, M. K.; Sadowska-Rociek, A. B.; *Food Anal. Methods* **2014**, 7, 366.

12. Miao, Q.; Kong, W.; Yang, S.; Yang, M.; *Chemosphere* **2013**, 91, 955.

13. Zhou, L.; Liu, X.; Kanga, S.; Zhanga, F.; Pana, C.; *Food Chem.* **2013**, 138, 1355.

14. Lehotay, S. J.; *Methods Mol. Biol.* **2011**, 747, 65.

15. Zhang, Y.; Zhang, X.; Jiao, B. *Food Chem.* **2014**, 159, 367.

16. Díez, C.; Traag, W. A.; Zommer, P.; Marinero P.; Atienza, J.; *J. Chromatogr. A.* **2006**, 1131, 11.

17. Pinto, C. G.; Laespada, M. E.; Martin, S. H.; Ferreira, A. M.; Pavón, J. L.; Cordero B. M.; *Talanta* **2010**, 81, 385.

18. Prestes, O. D.; Friggi, C. A.; Adaime M. B.; Zanella, R.; *Quim. Nova* **2009**, 32, 1620.

19. Wilkowska, A.; Biziuk, M.; *Food Chem.* **2011**, 125, 803.

20. González-Curbelo, M. A.; Herrera-Herrera, A. V.; Ravelo-Pérez, L. M.; Hernández-

Borges, J.; *Trends Anal. Chem.* **2012**, 38, 32.

21. Miao, Q.; Kong, W.; Yang, S.; Yang, M.; *Chemosphere* **2013**, 91, 955.

22. Correia\_Sá, L.; Fernandes, V. C.; Calhau, C.; Domingues, V. F.; Delerue-Matos, C.; *Food Anal. Methods* **2013**, 6, 587.

23. Jean, I.-S.; Kwak, B.-M.; Ahn, J.-H.; Jeong, S.-H. *Food Chem.* **2012**, 133, 473.

24. Selvi, C.; Paramasivam, M.; Rajathi, D. S.; Chandrasekaram, S. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* **2012**, 89, 1051.

25. Barakat, A. A.; Badawy, H. M. A.; Salama, E.; Attallah, E.; Maatook, G. J.; *J. Food Agr. Environ.* **2007**, 5, 97.

26. Bakirci, G. T.; Acay, D. B. Y.; Bakirci, F.; Otles, S.; *Food Chem.* **2014**, 160, 379.

27. Fernandes, V. C.; Domingues, V. F.; Mateus, N.; Delerue-Matos, C.; *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 7582.

28. Peralta-Zamora, P. G.; Morais, J. L.; Nagata, N.; *Eng. Sanit. Ambient.* **2005**, 10, 106.
29. Casas, V.; Llompart, M.; Garcá-Jares, M.; Cela, R.; Dagnac, T.; *J. Chromatogr. A.* **2006**, 1124, 148.
30. Suchara, E. A.; Budziak, D.; Martendal, E.; Costa, L. L. F.; Carasek, E.; *Anal. Chim. Acta* **2008**, 613, 169.
31. Tarley, C. R. T.; Silveira, G.; dos Santos, W. N. L.; Matos, G. D.; da Silva, E. G. P.; Bezerra, M. A. B.; Miro, M.; Ferreira, S. L. C.; *Microchem. J.* **2009**, 92, 58.
32. Codex Alimentarius; *Methods of analysis and sampling*, Pesticides residues in food. 2nd edition, Volume 2A, Part 1, 2000.
33. European Commission; *Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*, Document SANCO/12495/2011, National Food Administration: Sweden, 2011.
34. Hiemsta, M.; Kok, A.; *J. Chromatogr. A.* **2007**, 1154, 3.
35. [www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm122561.htm](http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm122561.htm), accessed in June 2013.
36. Lehotay, S. J.; Mařtovská, K.; Lightfield, A. R.; *J. AOAC Int.* **2005**, 88, 615.
37. Fenik, J.; Tankiewicz, M.; Biziuk, M.; *Trends Anal. Chem.* **2011**, 30, 814.
38. Nguyen, T. D.; Lee, B. S.; Lee, B. R.; Lee, D. M.; Lee, G.-H.; *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2007**, 21, 3115.
39. Geis-Asteggiante, L.; Lehotay, S. J.; Heinzen, H.; *J. AOAC Int.*, **2012**, 95, 1311.
40. García-Campaña, A. M.; Rodríguez, L. C.; González, A. L.; Barrero, F. A.; Ceba, M. R.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, 348, 237. 431
41. Ferreira, S. L. C.; dos Santos, W. N. L.; Quintella, C. M.; Neto, B. B.; Bosque-Sendra, J. M.; *Talanta* **2004**, 63, 1061.
42. European Commission Decision 2005/396/EC; *Off. J. Eur. Comm.* **2005**, L70.
43. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *Monografias autorizadas de agrotóxicos*, ANVISA: Brazil, 2012.
44. Hůřková, R.; Matisová, E.; Kirchner, M.; *J. Chrom. Suppl.* **2008**, 68, 49.
45. Lesueur, C.; Knittl, P.; Gartner, M.; Mentler, A.; Fuerhacker, M.; *Food Control* **2008**, 19, 906.
46. Koesukwiwat, U.; Lehotay, S.J.; Miao, S.; Leepipatpiboon, N.; *J.*

*Chromatogr. A* **2010**, 1217, 6692.

47. Cherta, L.; Beltran, J.; López, F.; Hernández, F.; *Food Anal. Methods.* **2013**, 6, 1170.

48. Queiroz, S. C. N.; Ferracini, V. L.; Rosa, M. A.; *Quim. Nova* **2012**, 35, 185.

49. Lu, D.; Qiu, X.; Feng, C.; Jin, Y.; Lin, Y.; Xiong, L.; Wen, Y.; Wang, D.; Wang, G.; *J.Chromatogr. B* **2012**, 17, 895.

50. Ciscato, C. H. P.; Gebara, A. B.; Monteiro, S. H.; *Food Addit. Contam., Part B* **2009**, 2, 140.

51. Jardim, A. N. O.; Caldas, E. D.; *Food Control* **2012**, 25, 607.

52. Recena, M. C. P.; Caldas, E. D.; Pires, D. X.; Pontes, E. R. J. C.; *Environ. Res.* **2006**, 102, 230.

53. Bojacá, C. R.; Arias, L. A.; Ahumada, D. A.; Casilimas, H. A.; Schrevens, E.; *Food Control* **2013**, 30, 400.

54. Chowdhury, A. Z.; Fakhuddin, A. N. M.; Islam, N.; Moniruzzaman, M.; Gan, S. H.; Alam, K.; *Food Control* **2013**, 34, 457.

55. Hjorth, K.; Johansen, K.; Holen, B.; Andersson, A.; Christensen, H.B.; Siivinen, K.; Toome, M.; *Food Control* **2011**, 22, 1701.



## **CAPÍTULO 3**

### **OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DO MÉTODO SPME-HS- CG/MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM TOMATES**



## RESUMO

O aumento da variedade de agrotóxicos que podem ser utilizados para manter elevado o rendimento na produção de alimentos, leva ao desenvolvimento e o aprimoramento de métodos analíticos, buscando se obter maior sensibilidade e confiança na detecção desses resíduos. Neste trabalho, a otimização multivariada do método SPME-HS-CG/MS foi realizada para permitir a máxima extração de resíduos de agrotóxicos em tomates. Os fatores pH, concentração de sal, quantidade de solvente, temperatura e tempo de extração foram submetidos a um planejamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$  para o rastreamento das variáveis significativas. Na sequência, um planejamento Doehlert foi aplicado para determinar as condições ótimas do método. Os melhores resultados foram alcançados pela utilização da fibra PDMS 100  $\mu\text{m}$  em amostras com pH 5, concentração de sal 5%, ausência de solvente, temperatura de 60°C e tempo de extração de 25 min. O método otimizado produziu bons parâmetros analíticos de mérito com coeficiente de correlação maiores que 0,99 e Limites de detecção e de quantificação variando de 0,05 a 4,7  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 0,17 a 15,7  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Valores de recuperação entre 66,4 e 120,4% com desvio padrão relativo de 2,1 a 15,7% foram obtidos para os agrotóxicos analisados. A otimização multivariada do método proporcionou uma avaliação mais completa das suas principais variáveis possibilitando a melhora em sua eficiência e sensibilidade.

**Palavras-chave:** SPME; CG/MS; Otimização multivariada; Doehlert; agrotóxicos; tomate.

## 1 INTRODUÇÃO

O tomate (*Lycopersicon esculentum*) é um dos vegetais mais produzidos e consumidos no mundo (CLÉMENT et al., 2015; HASSAN, SHINWARI, MAHMOOD, 2015). Devido à sua perecibilidade natural, seu cultivo exige uma grande quantidade de diferentes tipos de agrotóxicos que muitas vezes são utilizados de modo inadequado (BIDARI et al., 2011; MELO et al., 2012; BOJACÁ et al., 2013). No Brasil, por exemplo, o tomate está entre as dez culturas com maior contaminação por resíduos de agrotóxicos (ANVISA, 2015). O principal problema do uso excessivo desses compostos químicos no tomate esta no fato de que o vegetal é consumido quase que diariamente pela população na sua forma crua, cozida ou processada, aumentando o risco de doenças causadas pela acumulação destas substancias nos tecidos humanos (TAN, ABDULRA'UF, 2012; ZHAO et al., 2014; ABDULRA'UF, TAN, 2015). Dessa forma, o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em tomate é fundamental e força o desenvolvimento e aprimoramento de métodos analíticos mais sensíveis e confiáveis (JARDIM et al., 2014; BESIL et al., 2015).

A Microextração em Fase Sólida (SPME) é um método de determinação de agrotóxico inovador e que apresenta como vantagem ser automatizado, miniaturizado, seguro e eficiente (FARAJZADEH, MAGADDAM, GHORBANPOUR, 2014). Este não utiliza solvente e não requer múltiplos passos para a extração, ao contrario dos outros métodos atualmente existentes menos seguros e mais trabalhosos (ABDULRA'UF, TAN, 2015). Além disso, pode ser utilizado para a extração de pequenas concentrações de agrotóxicos com diferentes propriedades químicas, tendo como resultado ótima precisão e recuperação (PRESTES, ADAIME E ZANELLA, 2011; WILKOWSKA, BIZIUK, 2011; DOS ANJOS, ANDRADE, 2015).

O processo de extração por SPME é baseado na sorção e posterior desorção dos analitos de uma fibra recoberta por um material polimérico, através das técnicas de imersão direta, ou *headspace* (HS). Na imersão direta a fibra encontra-se em contato direto com a amostra. No *headspace* a fibra é introduzida no espaço vazio do frasco de extração, sem que entre em contato direto com a amostra. Em amostras complexas como frutas e vegetais a utilização da SPME-HS apresenta vantagens como o aumento da vida útil da fibra e a eliminação de possíveis interferentes do processo (VALENTE; AGUSTO, 2000; MESTER; STURGEON; PAWLISZYN, 2001; OUYANG;

PAWLISZYN, 2008; RISTICEVIC et al., 2009; RODRIGUES et al., 2011).

A seleção da fibra e as condições de extração como temperatura, tempo, concentração de sal, pH e conteúdo de solvente influenciam na sensibilidade e na precisão das análises por SPME-HS (SUCHARA et al., 2008; MA et al, 2013). A otimização multivariada destas variáveis pode aprimorar o desempenho do método, a fim de se obter a melhor resposta possível na determinação dos resíduos. Neste tipo de otimização, as variáveis são avaliadas simultaneamente, fornecendo informações adicionais sobre o sistema, como possíveis interações (CALDAS et al., 2011). Métodos univariados de otimização negligenciam essas interações e em consequência conduzem a utilização de condições que não são as que proporcionam a melhor resposta analítica (PREU, GUYOT, PETZ, 1998; MARTENDAL, BUDZIAK, CARASEK, 2007).

Muitos são os trabalhos que relatam o SPME para a extração de pesticidas em frutas ou vegetais (SIMPLÍCIO; BOAS, 1999; VOLANTE et al., 2000; WANG et al, 2000; BLASCO et al., 2003; LAMBROPOULO, ALBANIS, 2003; FYTIANOS et al., 2006; KIN; HUAT, 2010; ABDULRA'UF; TAN, 2013). No entanto, poucos utilizam como matriz o tomate (WENNRICH; POPR; BREUSTE, 2001; NAVALÓN et al., 2002; BÉLTRAN et al., 2003; RODRIGUEZ; MAÑES; PICÓ, 2003; ABDULRA'UF; TAN, 2015). Além disso, não foram encontrados trabalhos que incluem agrotóxicos como a trifluralina e a pendimetalina na relação de analitos determinados nestas amostras. Agrotóxicos como a pendimetalina não são autorizados pela legislação brasileira para uso no cultivo de tomates (ANVISA, 2015a). No entanto, compostos não autorizados são a principal causa de irregularidades encontradas por Programas de Monitoramento de Resíduos do país, necessitando atenção especial e controle mais rigoroso (CISCATO et al., 2009; ANVISA 2015).

Considerando os dados acima, o objetivo deste estudo foi determinar as condições ótimas do método SPME-HS/CG-MS através do processo de otimização multivariada para extração de resíduos dos agrotóxicos clópirifos, dimetoato, malationa, mevinfos, pendimetalina, simazina e trifluralina em amostras de tomate.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes e Padrões analíticos

Água ultrapura utilizada na preparação das soluções foi obtida através de um Sistema Milli-Q da Millipore<sup>®</sup>. Os reagentes cloreto de sódio p.a. e ácido cético p.a. foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Tolueno, metanol e acetonitrila, todos grau HPLC, foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). Os padrões analíticos dos agrotóxicos clorpirifos, dimetoato, malationa, mevinfos, pendimetalina, simazina e trifluralina, e o padrão interno Tris (1,3-dicloro-2-propil) fosfato (TDCPP), com pureza superior a 98%, foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA).

Soluções estoques individuais dos agrotóxicos foram preparadas em tolueno na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>. Soluções intermediárias foram obtidas pela diluição em metanol das soluções estoques individuais de cada agrotóxico para uma concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>. Duas soluções de trabalho foram então preparadas pela mistura das soluções intermediárias: clorpirifos, dimetoato, malationa e mevinfos (mix 1) e pendimetalina, simazine e trifluralina (mix 2). As soluções de trabalho foram utilizadas para a fortificação das amostras nos ensaios de otimização e validação do método. Todas as soluções foram estocadas em frascos de vidro âmbar a  $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### 2.2 Instrumentação

As análises foram realizadas em um cromatógrafo gasoso, acoplado a um espectrômetro de massa Saturn 2100 (Varian, USA). A coluna capilar VF-5 MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de diâmetro) foi utilizada para a separação dos agrotóxicos. As injeções foram realizadas manualmente no modo splitless com o injetor a 250 °C. Gás hélio (99,999%) foi utilizado como gás de arraste a um fluxo constante de 1 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura do forno da coluna foi mantida a 90 °C por 1 min, em seguida foi elevada a 210 °C, com taxa de aquecimento de 30 °C min<sup>-1</sup> durante 10 min e, finalmente, foi a 250 °C, com taxa de aquecimento de 5 °C min<sup>-1</sup> por 2 min. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons (EI) com energia de ionização de 70 eV. A aquisição dos dados foi realizada no modo *full-scan* com faixa de varredura de 40-650 m/z. Os analitos foram identificados por comparação do espectro de massa obtido na análise, com o espectro de referência da livreria NIST, disponível no próprio equipamento.

## 2.3 Processo de extração – método SPME –HS

Tomates livres de resíduos de agrotóxicos foram adquiridos em lojas de produtos orgânicos e utilizados nos ensaios de otimização e validação. Análises foram previamente realizadas para confirmação da ausência de agrotóxicos nessas amostras (dados não mostrados). Os tomates foram picados e homogeneizados em liquidificador. Alíquotas de 10 mL foram transferidas para frascos de vidro âmbar próprios para SPME com capacidade de 40 mL. As amostras foram fortificadas com o padrão interno TDCPP ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e com as soluções de trabalho (mix 1 e mix 2) em concentrações variadas. Os frascos foram fechados com septo de PTFE/silicone, agitados em vortex durante 1 minuto, e mantidos a  $-18 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  por no mínimo 30 min antes da análise. O pH, a concentração de sal e a quantidade de co-solvente na amostra foram então ajustados pela adição de ácido acético, cloreto de sódio e acetonitrila p.a., respectivamente. Em seguida, a amostra foi agitada em vortex por 1 min e incubada a temperatura constante. A fibra foi inserida no septo e exposta no *headspace*. A extração foi realizada com agitação magnética de 800 rpm, por período de tempo predefinido. Após a extração, a fibra foi recolhida e introduzida ao injetor do cromatógrafo gasoso, onde foi mantida por 5 min a  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  para a dessorção térmica dos analitos retidos no seu recobrimento.

O tipo de revestimento da fibra e as variáveis pH, concentração de sal, quantidade de co-solvente, temperatura e tempo de extração foram determinadas pelas análises de otimização descritas na seção Otimização das condições de extração.

## 2.4 Otimização das condições de extração

Primeiramente três tipos de revestimento de fibra foram submetidos a experimentos univariados para selecionar aquele de melhor desempenho na extração dos agrotóxicos. Foram testadas as fibras de polidimetilsiloxano (PDMS) 100  $\mu\text{m}$ , poliacrilato (PA) 85  $\mu\text{m}$  e polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB) 65  $\mu\text{m}$  (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Antes do primeiro uso, as fibras foram condicionadas conforme instruções do fabricante. O teste foi realizado pela comparação da média total ( $n = 3$ ) obtida a partir das áreas dos picos gerados para cada agrotóxico.

A seguir foi realizada a otimização das variáveis pH, concentração de sal, quantidade de co-solvente, temperatura e tempo de extração em duas etapas: a realização da triagem para determinar quais

das variáveis possuíam efeito significativo na extração dos agrotóxicos e a definição das condições experimentais ótimas dessas variáveis. A primeira etapa foi executada através de um planejamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$  com três repetições do ponto central para verificar a variância experimental, totalizando 19 experimentos realizados em ordem aleatória. As variáveis foram analisadas em três níveis codificados como -1, 0 e +1: pH (3, 5 e 7), concentração de sal (0, 5 e 10% de cloreto de sódio), quantidade de co-solvente (0, 2,5 e 5% de acetonitrila), temperatura (20, 40 e 60 °C) e tempo de extração (10, 20 e 30 min) (Tabela 1). Os níveis foram selecionados para cobrir uma ampla faixa de condições de extração possíveis, uma vez que analitos com diferentes propriedades deveram ser extraídos simultaneamente pelo método.



Tabela 1 - Matriz do planejamento fatorial fracionado 2<sup>5-1</sup>

Nº. experimento	Co-solvente (% acetônitrila)	Sal (% NaCl)	Tempo de extração (min)	Temperatura de extração (°C)	pH
1	0 (-)	0 (-)	10 (-)	20 (-)	7 (+)
2	5 (+)	0 (-)	10 (-)	20 (-)	3 (-)
3	0 (-)	10 (+)	10 (-)	20 (-)	3 (-)
4	5 (+)	10 (+)	10 (-)	20 (-)	7 (+)
5	0 (-)	0 (-)	30 (+)	20 (-)	3 (-)
6	5 (+)	0 (-)	30 (+)	20 (-)	7 (+)
7	0 (-)	10 (+)	30 (+)	20 (-)	7 (+)
8	5 (+)	10 (+)	30 (+)	20 (-)	3 (-)
9	2,5 (0)	5 (0)	20 (0)	40 (0)	5 (0)
10	2,5 (0)	5 (0)	20 (0)	40 (0)	5 (0)
11	2,5 (0)	5 (0)	20 (0)	40 (0)	5 (0)
12	0 (-)	0 (-)	10 (-)	60 (+)	3 (-)
13	5 (+)	0 (-)	10 (-)	60 (+)	7 (+)
14	0 (-)	10 (+)	10 (-)	60 (+)	7 (+)
15	5 (+)	10 (+)	10 (-)	60 (+)	3 (-)
16	0 (-)	0 (-)	30 (+)	60 (+)	7 (+)
17	5 (+)	0 (-)	30 (+)	60 (+)	3 (-)
18	0 (-)	10 (+)	30 (+)	60 (+)	3 (-)
19	5 (+)	10 (+)	30 (+)	60 (+)	7 (+)

Na segunda etapa, os fatores significativos para a extração (indicados por um gráfico Pareto) foram otimizados pelo método de superfície de resposta através de uma matriz Doehlert. As variáveis avaliadas neste caso foram temperatura em três níveis (40, 60 e 80 °C) e tempo de extração em 5 níveis (20, 25, 30, 35 e 40 min). Um total de 9 experimentos foram realizados, considerando 3 repetições do ponto central.

Uma resposta para cada agrotóxico (área do pico cromatográfico) foi obtida em cada experimento. A média geométrica das áreas dos picos dos agrotóxicos foi utilizada como resposta da otimização. Os dados foram avaliados pelo programa *Statistica* 6.0 (Statsoft Inc, Tulsa, USA).

## 2.5 Validação do método

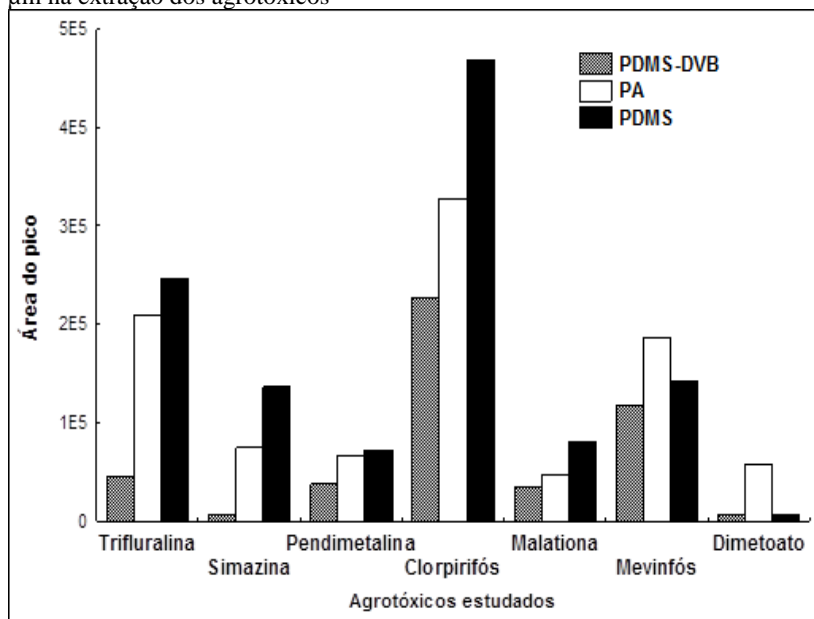
Parâmetros analíticos de linearidade, sensibilidade, exatidão e precisão foram avaliados conforme sugerido pela Comissão Europeia SANCO NCCLS documento 12495/2011. A linearidade foi analisada pela construção de curvas de calibração individuais para cada agrotóxico, a partir da fortificação das amostras em no mínimo cinco concentrações que variaram entre 0,1 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A sensibilidade foi determinada quanto aos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) através da relação sinal/ruído, sendo  $\text{LOD} = 3 \times s / b$  e  $\text{LOQ} = 10 \times s / b$ , onde  $s$  = desvio padrão do ruído de 10 repetições do branco e  $b$  = coeficiente angular da curva de calibração do agrotóxico. A exatidão e precisão foram avaliadas através dos testes de recuperação e repetibilidade, respectivamente. Amostras fortificadas em dois diferentes níveis de concentração foram utilizadas para a realização destes testes.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Escolha da fibra

Ao verificar a eficiência da extração dos pesticidas pelas fibras PDMS 100  $\mu\text{m}$  (apolar), PA 85  $\mu\text{m}$  (polar) e PDMS-DVB 65  $\mu\text{m}$  (bipolar), observou-se que a fibra PDMS apresentou os melhores resultados para a extração dos analitos (Figura 1). Dessa forma a fibra PDMS foi escolhida para dar continuidade ao estudo.

Figura 1 - Eficiência das fibras PDMS 100 µm, PA 85 µm e PDMS-DVB 65 µm na extração dos agrotóxicos



Dentre as propriedades químicas dos agrotóxicos a polaridade tem grande influência na escolha da fibra e pode ser representada pelo logaritmo do coeficiente de partição octanol-água ( $\log K_{ow}$ ). O  $\log K_{ow}$  está relacionado com a afinidade dos agrotóxicos pelas fases hidrofílicas (polar) e lipofílicas (apolar) do revestimento da fibra. De um modo geral, quanto menor o valor de  $\log K_{ow}$  mais polares são os analitos, e vice-versa (ZIMMERMANN, ENSINGER, SCHMIDT, 2006; RODRIGUES et al., 2011). Como pode ser observado na Tabela 2, os agrotóxicos analisados possuem uma variação considerável de polaridade, com o  $\log K_{ow}$  variando de 0,13 (mevinfós) para 5,3 (trifluralina). No entanto, com exceção do dimetoato e do mevinfós, a maioria dos analitos apresentam um  $\log k_{ow}$  maior do que 2 o que justifica os resultados obtidos para a fibra PDMS. O uso da fibra PDMS é frequentemente descrito na literatura para a SPME de analitos multiclasses com características semelhantes aos aqui estudados (GHAVIDEL et al., 2014; ABDULRA'UF, TAN, 2015).

Tabela 2 - Propriedades químicas dos agrotóxicos em estudo

Analito	Fórmula	PM <sup>a</sup> / g mol <sup>-1</sup>	Log K <sub>ow</sub> <sup>b</sup>	PV <sup>c</sup> / mPa 25°C
Mevinfós	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub> P	224,1	0,13	17,1
Trifluralina	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	335,3	5,3	6,1
Simazina	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>5</sub>	201,7	2,2	0,00
Dimetoato	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	229,2	0,77	1,1
Malationa	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> PS <sub>2</sub>	330,4	2,3	0,45
Clorpirifós	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	350,6	4,9	2,7
Pendimetalina	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	281,3	2,6	29,6

<sup>a</sup> Peso molecular; <sup>b</sup> Coeficiente de partição octanol-água; <sup>c</sup> Pressão de vapor a 25 °C.

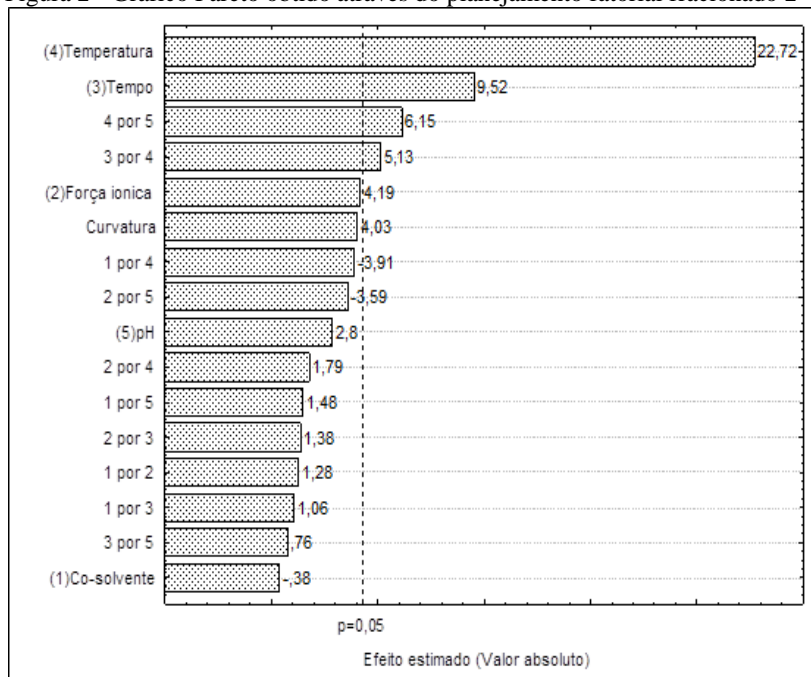
### 3.2 Identificação das variáveis significativas

O efeito das variáveis (pH, concentração de sal, quantidade de co-solvente, temperatura e tempo) e suas interações, sobre a eficiência do método de extração foi avaliado através de um planejamento fatorial fracionado 2<sup>5-1</sup>. Para a realização destes experimentos as amostras foram fortificadas com 50 µg L<sup>-1</sup> das soluções de trabalho. Os resultados estão apresentados através do gráfico de Pareto (R<sup>2</sup> = 0,99) mostrado na Figura 2. Neste gráfico o comprimento das barras horizontais é proporcional ao valor absoluto de cada efeito principal. Os efeitos em que as barras ultrapassam a linha de p=0,05 são estatisticamente significativos sobre a resposta analítica com 95% de confiança (KHODADOUST, HADJMOHAMMADI, 2011).

Valores positivos dos efeitos sugerem um aumento na resposta analítica quando a variável segue em direção ao seu nível máximo. Valores negativos indicam que uma maior resposta é obtida no nível inferior da variável. Para as interações, valores positivos indicam que a resposta aumentará se as duas variáveis forem em direção ao mesmo nível, inferior ou superior. E valores negativos indicam um aumento na resposta se as variáveis forem em direções contrárias, ou seja, uma

variável em direção ao nível superior e a outra em direção ao nível inferior (MARTENDAL, BUDZIAK, CARASEK, 2007).

Figura 2 - Gráfico Pareto obtido através do planejamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$



As variáveis temperatura e tempo de extração apresentaram efeitos significativos e positivos sobre a determinação dos agrotóxicos estudados. Da mesma forma, as interações temperatura-pH e tempo-temperatura foram significativas e positivas. O aumento dos níveis dessas variáveis resulta em um aumento significativo das áreas dos picos dos agrotóxicos, melhorando a eficiência do método de extração.

A temperatura e o tempo são os fatores mais importantes na Microextração em Fase Sólida principalmente quando a extração por *headspace* está sendo utilizada (RISTICEVIC et al., 2010). O aumento da temperatura fornece energia para que todos os compostos superem as barreiras energéticas que os ligam a matriz, aumentando a pressão de vapor para o processo de transferência de massa. Isso facilita a liberação dos analitos no *headspace* e posterior adsorção no revestimento da fibra (HAMID, BEKHIT, LAW, 2013; ABDULRA'UF, TAN, 2015).

Ao contrário da maioria das técnicas de extração de resíduos existentes, na SPME o estudo e definição do tempo de extração se faz necessário por se tratar de uma técnica não exaustiva, baseada nas condições de equilíbrio dos analitos com a fase extratora (VUCKOVIC et al., 2010). Isso significa que durante a extração as moléculas dos analitos tem de se deslocar da matriz e penetrar no recobrimento da fibra, até que se estabeleça o equilíbrio de partição entre três fases (analito, fibra e o meio que a envolve). Segundo as leis da cinética, o tempo necessário para atingir este equilíbrio é infinito e, portanto, um tempo de equilíbrio pratico deve ser considerado (VALENTE, AUGUSTO, 2000). Esse tempo depende das características físico-químicas do analito, da amostra e do polímero de revestimento da fibra (DE ALBUQUERQUE, BORTOLETO, DE OLIVEIRA, 2013).

O aumento do tempo de extração possibilita que um maior número de analitos alcance o equilíbrio entre as fases e possam ser extraídos (HAMID, BEKHIT, LAW, 2013; ABDULRA'UF, TAN, 2015). No entanto, em temperaturas muito elevadas e tempos extremamente longos, é possível que a extração dos analitos de maior peso molecular seja favorecida em detrimento à extração de compostos mais leves e que se ligam primeiro a fibra (HELENO et al., 2010). Busca-se então, um aumento do tempo e da temperatura na medida que haja boa extração dos compostos pesados sem a perda dos compostos leves.

O pH da amostra também pode facilitar a extração de analitos ácidos ou básicos, juntamente com a temperatura de extração. Compostos ácidos são melhores extraídos em pHs baixos e vice versa. Em amostras ácidas os analitos básicos permanecem em sua forma ionizada, diminuindo sua volatilidade e sua afinidade com o recobrimento da fibra. O efeito inverso ocorre em amostras básicas, onde analitos ácidos estão em sua forma ionizada. Em métodos multiresíduo, onde os agrotóxicos extraídos possuem propriedades químicas diferentes, o ajuste do pH pode beneficiar a extração de alguns agrotóxicos em detrimento de outros (GONÇALVEZ, ALPENDURADA, 2002; COSTA et al., 2008). Essa diferença pode ser amenizada com o aumento da pressão de vapor dos analitos com o auxílio da temperatura.

Como o efeito isolado do pH não foi significativo para o método em estudo, decidiu-se continuar o processo de otimização somente para as variáveis tempo e temperatura. As variáveis pH e força-iônica que não possuíram efeito significativo no método, foram fixadas no seu nível central (5 e 5%, respectivamente) a fim de trabalhar com

condições mais robustas. O co-solvente foi descartado do estudo por possuir efeito não-significativo e negativo, indicando que o aumento da resposta ocorre quando o menor nível avaliado (0%) é utilizado.

### 3.3 Aplicação da metodologia de superfície de resposta

O planejamento Doehlert foi utilizado para definir os valores ótimos das variáveis temperatura e tempo de extração. A Tabela 3 mostra a matriz, com os níveis das variáveis analisadas, e as respostas experimentais e preditas correspondentes. Os níveis das variáveis foram estipulados de acordo com a geometria do desenho experimental e com os resultados do planejamento fatorial fracionado realizado anteriormente.

Tabela 3 - Matriz Doehlert, respostas experimentais e valores preditos para os ensaios de otimização das variáveis temperatura e tempo de extração.

	Variáveis		Média geométrica das áreas dos picos	
	Temperatura / °C	Tempo / min	Experimental	Preditos
1	0 (60)	0 (30)	37112,2	35835,6
2	0 (60)	1 (40)	20116,6	21573,4
3	0,86 (80)	0,5 (35)	16362,8	14905,9
4	0 (60)	-1 (20)	36035,9	34579,1
5	-0,86 (40)	-0,5 (25)	14046,4	15503,2
6	-0,86 (40)	0,5 (35)	9865,7	8408,8
7	0,86 (80)	-0,5 (25)	19360,5	20817,3
8	0 (60)	0 (30)	32822,5	35835,6
9	0 (60)	0 (30)	37572,3	35835,6

As respostas experimentais obtidas foram utilizadas no cálculo do modelo de regressão, que apresentou a seguinte equação:

$$R = -188908,4 + 3827,9x - 77,6x^2 + 5755,0y - 47,5y^2 + 2,9xy,$$

onde  $x$  corresponde ao tempo,  $y$  temperatura e  $R$  a média geométrica das áreas dos picos dos agrotóxicos.

O modelo de regressão foi avaliado com o objetivo de estimar a sua capacidade preditiva, antes de ser utilizado para a determinação dos valores ótimos das variáveis. Esta avaliação foi realizada pela aplicação

da análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 4. Os resultados mostraram que todas as variáveis apresentaram efeito significativo linear (L) ou quadrático (Q). A falta de ajuste não foi observada, indicando que o modelo foi válido para este estudo. Esta afirmativa foi reforçada pelo satisfatório coeficiente de determinação obtido ( $R^2=0,97$ ) quando os valores experimentais e preditos foram comparados (Tabela 4).

**Tabela 4 - Resultados da ANOVA para o planejamento Doehlert**

	SS <sup>a</sup>	df <sup>a</sup>	MS	F	p <sup>b</sup>
<b>(1) Tempo(L)</b>	<b>1,3x10<sup>8</sup></b>	<b>1</b>	<b>1,3x10<sup>8</sup></b>	<b>18,5</b>	<b>0,05</b>
Tempo (Q)	7,2x10 <sup>7</sup>	1	7,2x10 <sup>7</sup>	10,5	0,08
(2)Temperatura(L)	3,5x10 <sup>7</sup>	1	3,5x10 <sup>7</sup>	5,1	0,15
<b>Temperatura(Q)</b>	<b>7,7x10<sup>8</sup></b>	<b>1</b>	<b>7,7x10<sup>8</sup></b>	<b>112,1</b>	<b>0,01</b>
1L por 2L	3,5x10 <sup>5</sup>	1	3,5x10 <sup>5</sup>	0,05	0,85
Falta de Ajuste	1,3x10 <sup>7</sup>	1	1,3x10 <sup>7</sup>	1,8	0,31
Erro Puro	1,4x10 <sup>7</sup>	2	6,9x10 <sup>6</sup>		
SS Total	9,7x10 <sup>8</sup>	8			

<sup>a</sup> SS = soma dos quadrados, df = graus de liberdade e MS = quadrados médios.

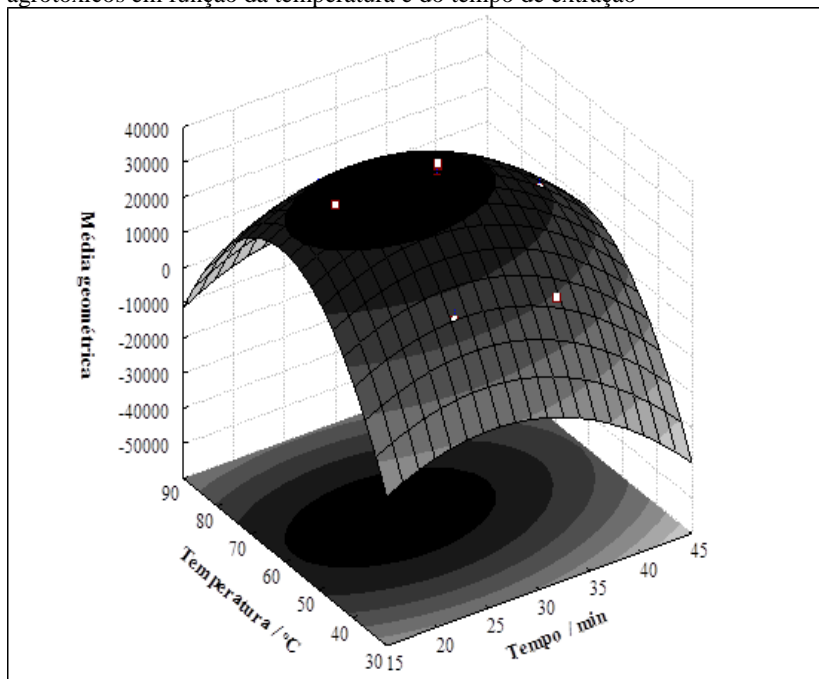
<sup>b</sup> Os fatores significativos estão marcados em negrito ( $p<0,05$ ).

Para a representação gráfica do modelo, uma superfície de resposta foi plotada afim de descrever os efeitos individuais e cumulativos das variáveis sobre a resposta (PRAKASH, TALAT, HASAN, 2009; YUCEL, GULER, 2014). A Figura 3 apresenta o gráfico de superfície de resposta para o modelo de regressão ajustado aos dados.

Os valores ideais de cada variável foram encontrados pelo ponto ótimo do modelo, uma vez que eles representam o ponto onde a média geométrica das áreas dos picos dos agrotóxicos é máxima. Analisando a equação do modelo os valores das variáveis no ponto ótimo foram calculados em temperatura 61,4 °C e tempo 25,8 min. Portanto, as condições ótimas do método para a extração simultânea dos agrotóxicos ficaram definidas como: **pH 5, concentração de sal 5%, quantidade de solvente 0%, temperatura 60 °C e tempo de extração 25 min.**



Figura 3 - Superfície de resposta para a média geométrica da área dos picos dos agrotóxicos em função da temperatura e do tempo de extração



### 3.4 Performance analítica do método

O método otimizado foi validado para confirmar suas características de desempenho e sua adequação para a análise dos agrotóxicos em amostras de tomate. Como mostrado na Tabela 5, as curvas de calibração obtidas foram lineares para o intervalo de concentrações testado, com coeficientes de correlação ( $r$ ) maiores do que 0,99 para todos os agrotóxicos. Os valores para LOD e LOQ do método foram inferiores aos LMR permitidos tanto pela Legislação Brasileira (ANVISA, 2015) como pela Comissão Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2015). Dentre os analitos, o dimetoato apresentou limites elevados ( $\text{LOD} = 4,70 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $\text{LOQ} = 15,68 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em comparação aos dos demais agrotóxicos, o que pode ser explicado pela pouca afinidade deste agrotóxico pelo revestimento da fibra PDMS  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  otimizada para o estudo (Figura 1).

Tabela 5 - Parâmetros analíticos do método: faixa linear, coeficiente de correlação (r), Limite de Detecção (LOD), Limite de Quantificação (LOQ) e Limites Máximos de Resíduos (LMR) permitidos pela legislação

Analito	Faixa linear / $\mu\text{g L}^{-1}$	R	LOD / $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ / $\mu\text{g L}^{-1}$	LMR / $\mu\text{g L}^{-1}$ ANVISA <sup>a</sup> U.E. <sup>b</sup>	
Clorpirifós	0,17 – 100	0,997	0,05	0,17	500	500
Dimetoato	15,7 – 150	0,994	4,7	15,7	1000	20
Mevinfós	1,8 – 150	0,995	0,54	1,8	200	10
Malationa	0,36 – 150	0,995	0,11	0,36	3000	20
Pendimetalina	0,30 – 100	0,992	0,09	0,30	NA	50
Simazina	2,2 – 200	0,998	0,66	2,2	NA	10
Trifluralina	0,23 – 100	0,996	0,07	0,23	50	500

<sup>a</sup> ANVISA, 2015a; <sup>b</sup> European Commission, 2015. NA - não autorizado.

A exatidão e a precisão do método otimizado também foram avaliados. A Tabela 6 apresenta os resultados de recuperação e repetibilidade obtido para os agrotóxicos. Segundo documento da Comissão Europeia SANCO 12495/2011 são consideráveis aceitáveis intervalos de recuperação entre 70 e 120% e repetibilidade com desvio padrão relativo (DPR) de até 20%. Com exceção do mevinfós, que apresentou uma recuperação inferior a 70% no menor nível de concentração analisado, todos os agrotóxicos apresentaram boa recuperação e repetibilidade. No caso do mevinfós, a baixa recuperação (66,4%) pode ser compensada pela boa repetibilidade (5,7%) encontrada na mesma concentração, o que permite a quantificação satisfatória do analito (SANCHEZ-ORTEGA et al., 2005; PICÓ et al., 2007).

Os resultados obtidos para LOD e LOQ no presente estudo, foram menores do que os encontrados na literatura para agrotóxicos extraídos a partir de variações do método SPME-HS em amostras de tomate. Os valores de recuperação e repetibilidade foram pouco maiores ou similares aos alcançados pelos mesmos autores (RAVELO-PÉREZ et al., 2008; CHAI, TAN, 2009; ABDULRA'UF, TAN, 2015).

O método SPME-HS-CG/MS apresentou portanto excelentes parâmetros analíticos de desempenho, podendo ser aplicado em amostras de tomate com eficiência, segurança e confiabilidade nos resultados.

Tabela 6 - Recuperação e repetibilidade do método

Analito	Concentração / $\mu\text{g Kg}^{-1}$	Recuperação / %	Repetibilidade RSD / %
Clorpirifós	1	89,3	9,9
	100	98,4	2,1
Dimetoato	100	109,1	5,5
Mevinfós	5	66,4	5,7
	100	106,3	8,3
Malationa	1	91,7	8,4
	100	119,3	15,7
Pendimetalina	1	120,4	12,9
	100	101,6	10,9
Simazina	5	81,4	9,5
	100	107,1	15,2
Trifluralina	1	109,1	13,1
	100	103,2	2,2

#### 4 CONCLUSÃO

O método SPME-HS-CG/MS foi otimizado e validado com sucesso para a extração dos agrotóxicos clorpirifos, dimetoato, malationa, mevinfos, pendimetalina, simazina e trifluralina em amostras de tomate. A otimização multivariada permitiu uma melhor avaliação e ajuste das principais variáveis de extração. Os baixos valores de LOQ's obtidos, aliados a uma recuperação satisfatória e precisa, principalmente nos menores níveis de concentração, demonstraram uma melhora na sensibilidade do método quando comparado a outros estudos presentes na literatura. O SPME-HS-CG/MS mostrou ser um processo de extração, detecção e quantificação simples, fácil, seguro e eficiente. Estudos futuros podem ser focados na aplicação do método e no aumento da variedade de analitos quantificados em diversos tipos de matrizes de frutas e vegetais.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos QuEChERS-CG/ECD e SPME-HS-CG/MS foram otimizados e validados com sucesso para a extração dos agrotóxicos clorpirifos, dimetoato, malationa, mevinfós, simazina, pendimetalina e trifluralina em amostras de maçã, morango e/ou tomate. O processo de otimização multivariada mostrou ser eficaz para a avaliação e desenvolvimento dos métodos.

No método QuEChERS-CG/ECD as variáveis que apresentaram influência significativa na resposta analítica foram a quantidade de amostra e o volume de solvente. O aumento da relação 1:1 entre estas variáveis possibilitou uma melhor pré-concentração dos analitos, resultando em excelentes valores de linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão para todos os agrotóxicos.

No método SPME-HS-CG/MS a fibra PDMS 100  $\mu\text{m}$  foi definida por ser a mais eficiente para a extração da maioria dos analitos, mesmo não sendo a fibra ideal para os agrotóxicos mevinfós e dimetoato. Na otimização multivariada as variáveis temperatura e tempo de extração apresentaram influência significativa e foram ajustadas. O método SPME-HS-CG/MS foi validado para a matriz tomate e também apresentou linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão satisfatórios.

Apesar dos dois métodos obedecerem princípios diferentes para a extração de resíduos, uma breve comparação entre eles pode ser realizada. O método QuEChERS, apresenta como vantagens ser mais barato, simples e robusto do que o método SPME. Em contrapartida, o método SPME, é menos trabalhoso e mais seguro, uma vez que não envolve grande manipulação da amostra e não utiliza solventes.

Dentre as principais desvantagens dos métodos pode-se citar a baixa pré-concentração dos analitos durante a extração pelo método QuEChERS, e a falta de robustez do método SPME. No presente estudo, a baixa pré-concentração dos analitos nos extratos foi melhorada através da otimização multivariada do método QuEChERS-CG/ECD. No entanto esta ainda é pequena quando comparada com outros métodos de extração. O solvente utilizado como meio extrator no método QuEChERS provoca a diluição dos analitos nas amostras diminuindo o seu enriquecimento.

A robustez é um parametro importante para qualquer método analítico. Esta pode ser facilmente visualizada a partir dos resultados obtidos nos processos de otimização multivariada. No método QuEChERS-CG/ECD a ausência de interação significativa entre as

variáveis indicou que o método é bastante robusto. Assim uma pequena alteração em uma ou algumas das suas variáveis, não causaria mudança significativa nas respostas analíticas. O mesmo não foi verificado para o método SPME-HS-CG/MS, que apresentou interações significativas entre as variáveis testadas, mostrando ser menos robusto.

Quanto aos resultados obtidos pelos ensaios de validação, os dois métodos apresentaram valores de precisão e exatidão similares para todos os agrotóxicos estudados. A faixa de recuperação para o método QuEChERS-CG/ECD variou de 84,6-119,4% e para o método SPME-HS-CG/MS entre 81,4-120,4%, com exceção do mevinfós. Ambos os métodos apresentaram excelente desempenho analítico e podem ser utilizados com confiança em amostras e analitos semelhantes aos que foram validados.

Com base no exposto acima, pode-se afirmar que a escolha entre os métodos QuEChERS-CG/ECD e SPME-HS-CG/MS vai depender da estrutura, rotina e necessidade de cada laboratório em particular. No entanto, de um modo geral, recomendaria a utilização do método QuEChERS, por ser um método inovador devido a sua simplicidade, economia e robustez, podendo se adequar a praticamente qualquer laboratório de análise de resíduos em alimentos.

A aplicação do método QuEChERS-CG/ECD em 91 amostras de maçãs, morangos e tomates coletadas no Estado de Santa Catarina apontou a presença de resíduos de agrotóxicos como indicado na Tabela 1. As amostras irregulares correspondem a presença de resíduos em quantidades superiores ao LMRs e/ou não autorizados pela legislação para a cultura.

Tabela 1 - Resumo dos resultados da análise de resíduos nas amostras de maçã, morango e tomate

	<i>Maçã</i>	<i>Morango</i>	<i>Tomate</i>
Coletadas	29	30	32
Contaminadas	8	12	17
Irregulares	1	10	6

A maior parte das irregularidades encontradas nessas amostras estavam relacionadas com a utilização de analitos não autorizados. Tal problema pode ser solucionado com boas ações preventivas e de fiscalização em relação ao correto uso dos agrotóxicos não só na região sul, mas também em todo o país.

## REFERÊNCIAS

ABDULRA'UF, L. B., TAN, G. H. Multivariate study of parameters in the determination of pesticide residues in apple by headspace solid phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry using experimental factorial design. **Food Chemistry**, v. 141, p. 4344-4348, 2013.

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

AGUIRRE-GONZÁLEZ, M., TABORDA-OCAMPO, G., DUSSAN-LUBERT, C., NERIN, C., ROSERO-MOREANO, M. Optimization of the HS-SPME technique by using response surface methodology for evaluating chlorine disinfection by-products by GC in drinking water. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 12, p. 2330-2336, 2011.

ALPENDURADA, M. de F. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 889, n. 1-2, p. 3-14, 2000.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANDEF. Associação Nacional de Defesa Vegetal. Tecnologia em primeiro lugar. **Defesa Vegetal**, 2009.

ANJOS, J.P., JAILSON, B.A. Simultaneous determination of pesticide multiresidues in white wine and rosé wine by SDME/CG-MS. **Microchemical Journal**, v. 120, p. 69-76, 2015.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Agricultor não tem acesso a 50% dos agrotóxicos registrados.** 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+im+prensa/menu+-+noticias+anos/2012+noticias/agricultor+nao+tem+acesso+a+50+dos+a+grotoxicos+registrados>. Acesso em julho de 2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografias Autorizadas.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agr+otoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agro+toxicos/Monografias>. Acesso em abril de 2015a.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos - PARA.** 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agr+otoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>. Acesso em fevereiro de 2015.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Diário Oficial da União, Brasília, 2003.

AOAC. Association of Analytical Communities. Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate. **Official methods of analysis 2007.01,** 2007.

AQUINO NETO, F. R., NUNES, D. S. S. Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins. **Rio de Janeiro: Interciência,** p. 64-8, 2003.

ARAUJO, J. A., LIMA, S., J., MOREIRA, C. J., JACOB, C. S., SOARES, O. M., MONTEIRO, M. C. M. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência e Saúde Coletiva,** v. 12, n. 1, p. 115-130, 2007.



ARTHUR, C. L., PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145-2148, 1990.

BAIRD, C. Química Ambiental - 2ª ed. **Boolman**, 2002.

BASTOS L. H. P., CARDOSO M. H. W. M., NÓBREGA A. W., JACOB S. DO C., Possíveis fontes de contaminação do alimento leite, por agrotóxicos, e estudos de monitoramento de seus resíduos: uma revisão nacional. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 19, n.1, p. 51-60, 2011.

BELTRAN, J., LÓPEZ, F. J., HERNÁNDEZ, F. SOLID-PHASE MICROEXTRACTION IN PESTICIDE RESIDUE ANALYSIS. **JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A**, V. 885 N. 1-2, P. 389-404, 2000.

BELTRÁN, J., PERUGA, A., PITARCH, E., LÓPEZ, F. J., HERNÁNDEZ, F. Application of solid-phase microextraction for the determination of pyrethroid residues in vegetable samples by GC-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 4, p. 502-511, 2003.

BERBARI, S. A. G., NOGUEIRA, J. N. N., CAMPOS, S. D. S. Efeito de diferentes tratamentos pré-congelamento sobre a qualidade do morango variedade chandler congelado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 1, 1998.

BESIL, N., UCLÉS, S., MEZCÚA, M., HEINZEN, H., FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Negative chemical ionization gas chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry and automated accurate mass data processing for determination of pesticides in fruit and vegetables. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, p. 1-17, 2015.

BEYER, A., BIZIUK, M. Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 669-680, 2008.

BHUSHAN, S., KALIA, K., SHARMA, M., SINGH, B., AHUJA, P. S., Processing of apple pomace for bioactive molecules. **Critical Review Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 285–296, 2008.

BIDARI, A., GANJALI, M. R., NOROUZI, P., HOSSEINI, M. R. M., ASSADI, Y. Sample preparation method for the analysis of some organophosphorus pesticides residues in tomato by ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1840-1844, 2011.

BLASCO, C., FONT, G., MAÑES, J., PICÓ, Y. Solid-phase microextraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry to determine postharvest fungicides in fruits. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 14, p. 3606-3615, 2003.

BOJACÁ, C. R., ARIAS, L. A., AHUMADA, D. A., CASILIMAS, H. A., SCHREVEENS, E. Evaluation of pesticide residues in open field and greenhouse tomatoes from Colombia. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 400-403, 2013.

BOMBARDI, L. M. A intoxicação por agrotóxicos no Brasil e a violação dos direitos humanos. In: Merlino, T; Mendonça, ML. (Org.). **Direitos Humanos no Brasil 2011: Relatório**. São Paulo: Rede Social de Justiça e Direitos Humanos, p. 71-82. 2011.

BOTTON, M., NAKANO, O., KOVALESKI, A. Controle químico da lagarta-enroladeira (*bonagota cranaodes* meyrick) na cultura da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 11, 2000.

BOUWMAN, H., GOVENDER, D., UNDERHILL, L., POLDER, A. Chlorinated, brominated and fluorinated organic pollutants in African Penguin eggs: 30 years since the previous assessment. **Chemosphere**, v. 126, p. 1-10, 2015.

BRAGANÇA, I., PLÁCIDO, A., PAÍGA, P., DOMINGUES, V.F., DELERUE-MATOS, C. QuEChERS: A new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. **Science of the Total Environment**, v. 433, n. 1 p. 281-289, 2012.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 janeiro 2002. Disponível em: <http://www.inpev.org.br/responsabilidades/legislacao/images/Decreto.PDF>. Acesso em fevereiro de 2012.

BRASIL. Portaria Normativa IBAMA nº 84, de 15 de outubro de 1996. Estabelece procedimentos a serem adotados junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, para efeito de registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental – (ppa) de agrotóxicos, seus componentes e afins. **DOU Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 de outubro de 1996. Disponível em: [http://servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/Portaria\\_84.pdf](http://servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/Portaria_84.pdf). Acesso em fevereiro de 2012.

BRDE. Banco Regional de Desenvolvimento do Extremo Sul. **Cadeia produtiva da maçã no Brasil: limitações e potencialidades**. Porto Alegre: BRDE, 2011, 44 p.

BRUGNARA, E. C., VERONA, L. A. F., ANTUNES, L. E. C., SCWENGBER, J. E., COLI, M. P. Morango. In: EPAGRI. Avaliação de cultivares para o Estado de Santa Catarina 2013-2014. **Boletim Técnico - EPAGRI**, n. 162, 2013.

CALDAS, L. F. S., FRANCISCO, B. B. A., NETTO, A. D. P., CASSELLA, R. J. Multivariate optimization of a spectrophotometric method for copper determination in Brazilian sugar-cane spirits using the Doehlert design. **Microchemical Journal**, v. 99, p.118-124, 2011.

CALDERÓN, M. J., HERMOSÍN, M. C., CORNEJO, J., MORENO, F. Movilidad de trifluralina en laboreo tradicional y de conservación. **Estudios de la Zona No Saturada del Suelo**, ICIA, Tenerife, Spain, p. 83-88, 1999.

CAMARGO FILHO, W. P. de; CAMARGO, F. P. de. Análise da produção de morango dos Estados de São Paulo e Minas Gerais e do

Mercado da CEAGESP. Informações Econômicas, v. 39, n. 5, p. 42-50, 2009.

CAMPBELL, J. K., CANENE-ADAMS, K., LINDSHIELD, B. L., BOILEAU, T. W. M., CLINTON, S. K., ERDMAN, J. W. J. R. Tomato phytochemicals and prostate cancer risk. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 3486S–3492S, 2004.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R., GARCÍA-HERMIDA, C., RODRÍGUEZ-GONZALO, E., SORIANO-BRAVO, F. E., HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. Determination of herbicides, including thermally labile phenylureas, by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, n.1–2, p. 1–12, 2003.

CARNEIRO F. F., PIGNATI W., RIGOTTO R. M., AUGUSTO L. G. S., RIZOLLO A., MULLER N. M. et al. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: ABRASCO; 2012.

CARVALHO, S. P. de. **Boletim do Morango: Cultivo Convencional Segurança Alimentar; Cultivo Orgânico**. Belo Horizonte (MG): FAEMG, 2006. 159 p.

CASAS, V., LLOMPART, M., GARCÍA-JARES, M., CELA, R., DAGNAC, T. Multivariate optimization of the factors influencing the solid-phase microextraction of pyrethroid pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1124, n. 1–2, p. 148-156, 2006.

CEN. European Committee for Standardization. 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 EN 15662 Method**, 2007.

CHAI, M. K., TAN, G. H. Validation of a headspace solid-phase microextraction procedure with gas chromatography-electron capture detection of pesticide residues in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 117, p. 561-567, 2009.

CHANFORAN, C., LOONIS, M., MORA, N., CARIS-VEYRAT, C., DUFOUR, C. The impact of industrial processing on health-beneficial tomato microconstituents. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1786-1795, 2012.

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

CHEN, C., QIAN, Y., CHEN, Q., TAO, C., LI, C., LI, Y. Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from Xiamen, China. **Food Control**, v. 22, p. 1114 – 1120, 2011.

CIEŚLIK, E., SADOWSKA-ROCIK, A., RUIZ, J. M. M., SURMA-ZADORA, M. Evaluation of QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in selected groups of fruits. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 773-778, 2011.

CISCATO, C. H. P., BERTONI GEBARA, A., HENRIQUE MONTEIRO, S. Pesticide residue monitoring of Brazilian fruit for export 2006–2007. **Food Additives and Contaminants**, v. 2, n. 2, p. 140-145, 2009.

CLÉMENT, A., BACON, R., SIROIS, S., DORAIS, M. Mature-ripe tomato spectral classification according to lycopene content and fruit type by visible, NIR reflectance and intrinsic fluorescence. **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, v. 1, p.1-10, 2015.

COCCO, C. **Qualidade fisiológica das mudas na produção de frutas do morangueiro.** Santa Maria: UFSM. 2010, 48 p.

COLLA, L. M., PRIMAZ, A. L., LIMA, M., BERTOLIN, T. E., COSTA, J. A. V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciências Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 809-813, 2008.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 5ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993, p.13.

COLOSIO, C., TIRMANI, M., BRAMBILLA, G., COLOMBI, A., MORETTO, A. Neurobehavioural effects of pesticides with special focus on organophosphorus compounds: which is the real size of the problem? **NeuroToxicology**, v. 30, p. 1155-1161, 2009.

COSTA, L. L. F. **Desenvolvimento de métodos analíticos baseados em SPME para a determinação de herbicidas (alaclor, atrazina, propanil e pendimetalina) em águas superficiais**. Florianópolis: UFSC. 2007, 123 p.

COSTA, L. L. F., SANT'ANA, E. S., SUCHARA, E. A., BENATO, V. S., CARASEK, E. Determinação de herbicidas usados no cultivo de arroz irrigado na região sul do estado de Santa Catarina através da SPME-GC-ECD. **Química Nova**, v. 31, p. 79-83, 2008.

COSTA, M. A., TORNISIELO, V. L., OLIVEIRA, J. J. V. Prochloraz Residue Levels in Apple. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 5, p. 61-65, 2002.

DAMALAS, C. A. Pesticide Drift: Seeking Reliable Environmental Indicators of Exposure Assessment. **Environmental Indicators**, p. 251-261, 2014.

DAROLT, M. R. 2001. Morango: sistema orgânico apresenta viabilidade técnica, econômica e ecológica. Disponível em <http://www.planetaorganico.com.br/darmorang.htm>. Acesso em maio de 2011.

DE ALBUQUERQUE, N. C. P., BORTOLETO, M. A., DE OLIVEIRA, A. R. M. Análise enantiosseletiva de fármacos e metabólitos em matrizes biológicas empregando técnicas miniaturizadas de preparação de amostras. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n.3, 214-228, 2013.

DEGANI, A. L. G., CASS, Q. B., VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21-25, 1998.

DEUBER, R. **Botânica das plantas daninhas**. Ciência das plantas daninhas. Jaboticabal: FUNEP, 1992

DÍEZ, C., TRAAG, W. A., ZOMMER, P., MARINERO, P., ATIENZA, J. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1131, n. 1–2, p. 11-23, 2006.

DIMETRY, N. Z. Prospects of botanical pesticides for the future in integrated pest management programme (IPM) with special reference to neem uses in Egypt. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 45, n. 10, p. 1138-1161, 2012.

DOS ANJOS, J. P., DE ANDRADE, J. B. Simultaneous determination of pesticide multiresidues in white wine and rosé wine by SDME/GC-MS. **Microchemical Journal**, v. 120, p. 69-76, 2015.

DOS SANTOS, V. M. R., DONNICI, C. L., DA COSTA, J. B. N., CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 159-170, 2007.

ENNACIRI, K., BAÇAOU, A., SERGENT, M., YAACOUBI, A. Application of fractional factorial and Doehlert designs for optimizing the preparation of activated carbons from Argan shells. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 139, p. 48-57, 2014.

EUROPEAN COMMISSION. EU-MRLs pesticide database. [http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm?event=homepage&CFID=7762246&CFTOKEN=97628658&jsessionid=0804f27660424c677743TR](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=homepage&CFID=7762246&CFTOKEN=97628658&jsessionid=0804f27660424c677743TR), Acesso em abril de 2015.

EUROPEAN COMMISSION. Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed. **Document SANCO/12495/2011**, National Food Administration: Sweden, 2011.

FARAJZADEH, M. A., MOGADDAM, M. R. A., GHORBANPOUR, H. Development of a new microextraction method based on elevated temperature dispersive liquid–liquid microextraction for determination of triazole pesticides residues in honey by gas chromatography-nitrogen phosphorus detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1347, p. 8-16, 2014.

FARIAS, R. M., BARRETO, C. F., ZANDÓNA, R. R., ROSADO, J. P., MARTINS, C. R. Comportamento do consumidor de frutas na região da fronteira oeste do Rio Grande Do Sul com Argentina e Uruguai. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 4, 2014.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. **Chromatographic - mass spectrometry food analysis for trace determination of pesticide residues**. Amsterdam: Elsevier, 2005.

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

FOWLIS I. A. **Gás Chromatography**. 2. ed. Universal Greenwich, UK. 1995. 258p.

FYTIANOS, K., RAIKOS, N., THEODORIDIS, G., VELINOVA, Z., TSOUKALI, H. Solid phase microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in fruits. **Chemosphere**, v. 65, p. 2090-2095, 2006.

GALLI, A., SOUZA, D., GARBELLINI, G. S., COUTINHO, C. F. B., MAZO, L. H., AVACA, L. A., MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de agrotóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.

GARCÍA-REYES, J. F., FERRER, C., GÓMEZ-RAMOS, M. J., FERNÁNDEZ-ALBA, A. R., MOLINA-DÍAZ, A. Determination of pesticide residues in olive oil and olives. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.26, n.3, p.239-251, 2007.



GARRIDO, E. M., DELERUE-MATOS, C., LIMA, J. L. F. C., BRETT, A. M. O. Electrochemical methods in pesticides control. **Analytical letters**, v. 37, n. 9, p. 1755-1791, 2004.

GENIUS, J. S., Toxic causes of mental illness are over looked. **NeuroToxicology**, v. 29, p. 1147-1149, 2008.

GHAVIDEL, F., SHAHTAHERI, S. J., JAZANI, R. K., TORABBEIGI, M., FROUSHANI, A., KHADEM, M. Optimization of solid phase microextraction procedure followed by gas chromatography with electron capture detector for pesticides butachlor and chlorpyrifos. **American Journal of Analytical Chemistry**, v .5, 2014.

GILBERT-LÓPEZ, B., GARCÍA-REYES, J. F. LOZANO, A., FERNÁNDEZ-ALBA, A. R., MOLINA-DÍAZ, A. Large-scale pesticide testing in olives by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry using two sample preparation methods based on matrix solid-phase dispersion and QuEChERS. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 39, p. 6022-6035, 2010.

GONÇALVES, C., ALPENDURADA, M. F. Multiresidue method for the simultaneous determination of four groups of pesticides in ground and drinking waters, using solid-phase microextraction–gas chromatography with electron-capture and thermionic specific detection. **Journal of Chromatography A**, v. 968, n. 1, p. 177-190, 2002.

GONÇALVES, C., ALPENDURADA, M. F. Multiresidue method for the simultaneous determination of four groups of pesticides in ground and drinking waters, using solid-phase microextraction–gas chromatography with electron-capture and thermionic specific detection. **Journal of Chromatography A**, v. 968, p. 177-190, 2002.

GONZÁLEZ-BARREIRO, C., LORES, M., CASAIS, M. C., CELA, R. Optimisation of alachlor solid-phase microextraction from water samples using experimental design. **Journal of Chromatography A**, v. 896, p. 373-379, 2000.

**HANOT, V., GOSCINNY, S. 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, V. 1384, P. 53-66, 2015.**

HASSAN, M., SHINWARI, Z. K., MAHMOOD, T. In silico analysis, mapping of regulatory elements and corresponding protein-dna interaction in ATP $\beta$  gene promoter from different tomato varieties. **Pak. J. Bot.**, v. 47, n. 3, p. 1075-1086, 2015.

HELENO, F. F., LIMA, A. C., AFONSO, R. J. C. F, COUTRIM, M. X. Otimização e validação de métodos analíticos para determinação de BTEX em água utilizando extração por *headspace* e microextração em fase sólida. **Química Nova**, v. 33, p. 329-336, 2010.

HERCEGOVÁ, A., DOMOTOROVÁ, M., MATISOVÁ, E. Sample Preparation Methods in the Analysis of Pesticide Residues in Baby Food with Subsequent. Chromatographic Determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 54-73, 2007.

HERNÁNDEZ, F., POZO, O. J., SANCHO, J. V., BIJLSMA, L., BARREDA, M., PITARCH, E. Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, n. 2, p. 242-252, 2006.

HERNANDO, A. M. P. **Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental.** Universitat Rovira i Virgili, 2002.

HOGENDOORN, E., VAN ZONEN, P. Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 892, n. 1, p. 435-453, 2000.

HUSKOVÁ, R., MATISOVÁ, E., KIRCHNER, M. Fast GC–MS Pesticide Multiresidue Analysis of Apples. **Chromatographia Supplement**, v. 68, p. 49–55, 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário do Brasil, 2006**. Disponível em [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso julho de 2012.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008**, 3. ed., 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS - IBRAF. Estatísticas sobre frutas frescas e processadas. Disponível em <http://www.ibraf.org.br/>. Acesso em dezembro de 2011.

JARDIM, A. N. O., CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food e results from 2001 to 2010. **Food Control**, v. 25, p. 607-616, 2012.

JARDIM, A. N. O., MELLO, D. C., GOES, F. C. S., FROTA, E. F., CALDAS, E. D. Pesticide residues in cashew apple, guava, kaki and peach: GC- $\mu$ ECD, GC-FPD and LC-MS/MS multiresidue method validation, analysis and cumulative acute risk assessment. **Food Chemistry**, v. 164, p. 195-204, 2014.

JARDIM, I. C. S. F., ANDRADE, J. A., QUEIROZ, S. C. N. Residues of pesticides in food: a global environmental preoccupation - Focussing on apples. **Química Nova**, v. 32, n. 4, 2009.

JARDIM, O. N. A., CALDAS, D. E. Exposição humana a substâncias Químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. **Química nova**, v. 32, n. 7, p. 1898-1909, 2009.

JEONG, I. S., KWAK, B. M., AHN, J. H., JEONG, S. H. Determination of pesticide residues in milk using a QuEChERS-based method developed by response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 473-481, 2012.

JOBIM, C. F. P., NUNES, N. L., GIUGLIANI, R., CRUZ, M. B. I. Existe uma associação entre mortalidade por câncer e uso de agrotóxicos? Uma contribuição ao debate. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 15, n. 1, p. 277-288, 2010.

KEEGAN, J., WHELAN, M., DANAHER, M., CROOKS, S., SAYERS, R., ANASTASIO, A. Benzimidazole carbamate residues in milk: Detection by Surface Plasmon Resonance-biosensor, using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method for extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 654, n. 2, p. 111–119, 2009.

KHODADOUST, S., HADJMOHAMMADI, M. Determination of N-methylcarbamate insecticides in water samples using dispersive liquid–liquid microextraction and HPLC with the aid of experimental design and desirability function. **Analytica Chimica Acta**, v. 699, p. 113-119, 2011.

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**, v. 123, p. 760-764, 2010.

KODAMA, T., DING, L., YOSHIDA, M., YAJIMA, M. Biodegradation of an s-triazine herbicide, simazine. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 11, n. 4/6, p. 1073-1078, 2001.

KOESUKWIWAT, U., SANGUANKAEW, K., LEEPIPATPIBOON, N. Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 626, n. 1, p. 10–20, 2008.

KOMATSU, E., VAZ, J. M. Otimização dos parâmetros de extração para determinação multiresíduo de agrotóxicos em amostras de água empregando Microextração em Fase Sólida. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 720-724, 2004.

KOVALESKI, A., RIBEIRO, L. G., Manejo de pragas na produção integrada de maçãs. In: PROTAS, J. F. S.; SANHUEZA, R. M. V. **Produção integrada de frutas: o caso da maçã no Brasil**. Bento Gonçalves : Embrapa Uva e Vinho, p. 61-76, 2003.

LACASAÑA, M., LOPES-FLORES, I., RODRIGUEZ-BARRANCO, M., AGUILLAR-GARDUÑO, C., MUÑOZ-BLANCO, J., PÉREZ-MÉNDEZ, O. Association between organophosphate pesticides

exposure and thyroid hormones in floriculture workers. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 243, p. 19-26, 2010.

LAMBROPOULO, D. A., KONSTANTINOY, I. K., ALBANIS, T. A. Recent developments in headspace microextraction techniques for the analysis of environmental contaminants in different matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, n. 1-2, p. 70-96, 2007.

LAMBROPOULOU, D. A., SAKKAS, V. A., HELA, G. D., ALBANIS, T. A. Application of solid-phase microextraction in the monitoring of priority pesticides in the Kalamas River (N.W. Greece). **Journal of Chromatography A**, v. 963, n. 1-2, p. 107-116, 2002.

LAMBROPOULOU, D. A., ALBANIS, T. A. Headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography–mass spectrometry for the rapid screening of organophosphorus insecticide residues in strawberries and cherries. **Journal Chromatography A**, v. 993, p. 197, 2003.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise.** 6. ed. São Carlos: Rima Editora, 2004. v. 6. 62 p.

LATORRACA, A., MARQUES, G. J. G., SOUSA, K. V., FORNÉS, N. S. Agrotóxicos utilizados na produção do tomate em Goiânia e Goianópolis e efeitos na saúde humana. **Comun. Ciênc. Saúde**, v. 19, n. 4, p. 365-374, 2008.

LEANDRO, C. C., FUSSELL, R. J., KEELY, B. J. Determination of priority pesticides in baby foods by gas chromatography tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, n. 2, p. 207-212, 2005.

LEE, J.-M., PARK, J.-W., JANG, G.-C., HWANG, K.-J. Comparative study of pesticide multi-residue extraction in tobacco for gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, n. 1–2, p. 25–33, 2008.

LEHOTAY, S. Determination of pesticide residues in nonfatty foods by supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass

spectrometry: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 5, p. 1148-66, 2002.

LEHOTAY, S. J. QuEChERS sample preparation approach for mass spectrometric analysis of pesticide residues in foods. **Methods Molecular Biology**, v.747, p.65 – 91, 2011.

LEHOTAY, S. J., DE KOK, A., HIEMSTRA, M., VAN BODEGRAVEN, P. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. **Journal AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 595-614, 2005.

LEHOTAY, S. J., SON, K. A., KWON, H., KOESUKWIWAT, U., FU, W., MASTOVSKA, K., HOH, E., TPIBOON N. L. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2548-2560, 2010.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**, 4. ed., Editora Átomo: Campinas, 2002.

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

LI, J., ZHANG, H.-F., SHI, Y.-P. Monitoring multi-class pesticide residues in fresh grape by hollow fibre sorptive extraction combined with gas chromatography–mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 784-790, 2011.

LI, L., LI, W., QIN, D., JIANG, S., LIU, F. Application of graphitized carbon black to the QuEChERS method for pesticide multiresidue analysis in spinach. **Journal of AOAC International**, v. 92, n. 2, p. 538–547, 2009.

LIU, H., KONG, W., GONG, B. MIAO, Q., QI, Y., YANG, M. Rapid analysis of multi-pesticides in *Morinda officinalis* by GC–ECD with

accelerated solvent extraction assisted matrix solid phase dispersion and positive confirmation by GC–MS. **Journal of Chromatography B**, v. 974, p. 65-74, 2015.

LOOSER, N., KOSTELAC, D., SCHERBAUM, E., ANASTASSIADES, M., ZIPPER, H. Pesticide residues in strawberries sampled from the Market of the Federal State of Baden-Wurttemberg in the period between 2002 and 2005. **Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 1, p. 135–141, 2006.

LOPES, W. G. L., DÓREA, H. S. Determinação de agrotóxicos em feijão por dispersão da matriz em fase sólida (DMFS). **Agrotóxicos: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p.73-82, 2003.

LORD, H., PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. **Journal of Chromatography A**, v. 885, n. 1-2, p. 153-193, 2000.

MA, Q. L., HAMID, N., BEKHIT, A. E. D., ROBERTSON, J., LAW, T. F. Optimization of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) for gas chromatography mass spectrometry (GC–MS) analysis of aroma compounds in cooked beef using response surface methodology. **Microchemical Journal**, v. 111, p. 16-24, 2013.

MAHAWAR, M., SINGH, A., JALGAONKAR, K. Utility of apple pomace as a substrate for various products: A review. **Food and Bioproducts Processing**, *In Press*, 2012.

MANZONI, C. G., GRÜTZMACHER, A. D., GIOLO, F. P., HÄRTER, W. R., MÜLLER, C. Seletividade de agrotóxicos usados na produção integrada de maçã para adultos de *Trichogramma pretiosum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 10, p. 1461-1467, 2006.

MARASCHIN, L. **Avaliação do grau de contaminação por agrotóxicos na água dos principais rios formadores do Pantanal Mato-Grossense**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente): Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2003.

- MARTENDAL, E., BUDZIAK, D., CARASEK, E. Application of fractional factorial experimental and Box-Behnken designs for optimization of single-drop microextraction of 2,4,6-trichloroanisole and 2,4,6-tribromoanisole from wine samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1148, p. 131-136, 2007.
- MARTINEZ-VIDAL, J. L., ARREBOLA, F. J., MATEU-SÁNCHEZ, M. Application of gas chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of pesticides in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 959, n. 1-2, p. 203-213, 2002.
- MASTOVSKA, K., DORWEILER, K. J., LEHOTAY, S. J., WEGSCHEID, J. S., SZPYLKA, K. A. Pesticide Multiresidue Analysis in Cereal Grains Using Modified QuEChERS Method Combined with Automated Direct Sample Introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 5959-5972, 2010.
- MASTOVSKA, K., LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, n. 2, p. 259-272, 2004.
- MCKINLAY, R., PLANT, J. A., BELL, J. N., VOULVOULIS, N. Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment. **Environment International**, v. 34, p. 168-183, 2008.
- MELO, A., CUNHA, S. C., MANSILHA, C., AGUIAR, A., PINHO, O., FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Monitoring pesticide residues in greenhouse tomato by combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas-chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1071-1077, 2012.
- MELO, P. C. T., VILELA, N. J. Desempenho da cadeia agroindustrial brasileira do tomate na década de 90. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 154-160, 2004.



MESTER Z., STURGEON, R., PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. **Spectrochim. Acta B**, v. 56, p. 233–260, 2001.

MIAO, Q., KONG, W., YANG, S., YANG, M. Rapid analysis of multi-pesticide residues in lotus seeds by a modified QuEChERS-based extraction and GC–ECD. **Chemosphere**, v. 91, p. 955-962, 2013.

MONTEIRO, D. B., BRAGA, J. M. F., ALBUQUERQUE, M. M., STRATTMANN, R., SILVA, K. E. R., ROLIM NETO, P. J. Desenvolvimento e validação do método analítico de doseamento da matéria-prima lamivudina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, n. 4, p. 120-3, 2006.

NAVALÓN, A., PRIETO, A., ARAUJO, L., VILCHEZ J.L. Determination of pyrimethanil and kresoxim-methyl in green groceries by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal Chromatography A**, v. 975, p. 355-360, 2002.

NEGRÃO, M. R., ALPENDURADA, M. F. Solvent-free method for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in waste water by solid-phase microextraction–high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 823, n. 1–2, p. 211-218, 1998.

NOGUEIRA, A., SANTOS, L. D., WIECHETECK, F. V. B., GUYOT, S., WOSIACKI, G. Efeito do processamento no teor de compostos fenólicos no suco da maçã. **Ciências Agrárias e Engenharia**, v. 9, n. 3, p.7-14, 2003.

OLIVEIRA, J. J. V., TOLEDO, M. C. F. Resíduos de agrotóxicos em morangos. **Agrotóxicos**, v. 5, p. 95-110, 1995.

OUYANG, G., PAWLISZYN J. A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 627, p. 184–197, 2008

OUYANG, G., PAWLISZYN, J. SPME in environmental analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n. 4, p. 1059-1073, 2006.

OZCAN, M. M., HACISEFEROGULLARI, H. The Strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 3, p. 1022-1028, 2007.

PAREJA, L., CESIO, V., HEINZEN, H., FERNENDEZ-ALBA, A. R. Evaluation of various QuEChERS based methods for the analysis of herbicides and other commonly used pesticides in polished rice by LC-MS/MS. **Talanta**, v. 83, p. 1613-1622, 2011.

PAWLISZYN, J. **Solid Phase Microextraction—Theory and Practice**, WileyVCH, New York, 1997.

PAZ, M., SÁ, L.C., BECKER, H., LONGHINOTTI, E., DOMINGUES, V. F., MATOS, C. D. Validation of QuEChERS method for organochlorine pesticides analysis in tamarind (*Tamarindus indica*) products: Peel, fruit and commercial pulp. **Food Control**, v. 54, p. 374-382, 2015.

PEREIRA, C. **Estudo de fotodegradação do agrotóxico clorpirifós**. Florianópolis: UFSC. 2014.

PERES, F., MOREIRA, J. C. **É veneno ou remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. 384p.

PICÓ, Y., FERNÁNDEZ, M., RUIZ, M. J., FONT, G. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 70, n. 2, p.117-131, 2007.

PIMENTEL, M. F., NETO, B. B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v.19, n.3, p.268-277, 1996.

PINTO, C. G., LAESPADA, M. E., MARTIN, S. H., FERREIRA, A. M., PAVÓN, J. L., CORDERO, B. M. Simplified QuEChERS approach

for the extraction of chlorinated compounds from soil samples. **Talanta**, v. 81, n. 1–2, p. 385–391, 2010.

PIZZUTTI, I. R. **Validação de métodos multirresíduos de extração e desenvolvimento de métodos de purificação por GPC para análise de resíduos de agrotóxicos em soja utilizando GC-MS, GC-MS/MS e LC-MS/MS**. Santa Maria: UFSM. 2006, 329 p.

PIZZUTTI, I. R., KOK, A., ZANELLA, R., ADAIME, M. B., HIEMSTRA, M., WICKERT, C., PRESTES, O. D. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. **Journal of Chromatography A**, v. 1142, n. 2, p.123-136, 2007.

PLOSSL, F., GIERA, M., BRACHER, F. Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood. **Journal of Chromatography A**, v. 1135, n. 1, p. 19–26, 2006.

PRAKASH, O., TALAT, M., HASAN, S. H. Response surface design for the optimization of enzymatic detection of mercury in aqueous solution using immobilized urease from vegetable waste. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 265–271, 2009.

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

PRESTES, O. D. **Desenvolvimento e validação de método multirresíduos para determinação de agrotóxicos em arroz polido utilizando método QuEChERS modificado, clean-up dispersivo e GC-MS (NCI-SIM)**. Santa Maria: UFSM. 2007, 117 p.

PRESTES, O. D., FRIGGI, C. A., ADAIME, M. B., ZANELLA, R. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos por métodos

cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

PREU, M., GUYOT, D., PETZ, M. Development of a gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimisation of the derivatisation reactions. **Journal of Chromatography A**, v. 818, p. 95–108, 1998.

PROTZEK, E. C., DE FREITAS, R. J. S., WASCZYNSKJ, N. Aproveitamento do bagaço de maçã na elaboração de biscoitos ricos em fibra alimentar. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos – CEPPA**, v. 16, n. 2, p. 263-275, 1998.

QUINTEIRO, L. M. C., NOBRE, A. L. R., FERREIRA, A. B. B., GODOY, R. L. O., CASTRO, I. M. Microextração em fase sólida: fundamentos e aplicações em análise de alimentos. **B. CEPPA**, v. 21, n. 1, p. 1-30, 2003.

RAMALHOSA, M. J., PAÍGA, P., MORAIS, S., DELERUE-MATOS, C., OLIVEIRA, M. B. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: Evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction method. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 20, p. 3529–3538, 2009.

RAVELO-PÉREZ, R. M., HERNÁNDEZ-BORGES, R., BORGES-MIQUEL, T. M., RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Pesticide analysis in tomatoes by solid-phase microextraction and micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1185, p. 151-154, 2008.

REETZ, E. R., KIST, B. B., DOS SANTOS, C. E., CARVALHO, C., DRUM, M. Anuário brasileiro da fruticultura. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2015. 104 p.

REIS FILHO, J. S. **Agrotóxicos na cultura do tomateiro (Lycopersicon esculentum): causa do uso intensivo**. Universidade Federal de Goiás, 2002.

REISSER JUNIOR, C., ANTUNES, L. E. C., ALDRICH, M., VIGNOLO, G. Panorama do cultivo de morangos no Brasil. **Campo e Negócio – Hortifruti**, dezembro, 2014.

RHODEN, K. K. **Desenvolvimento e validação de método multirresíduo, empregando GC-ECD e GC-MS, para a investigação de agrotóxicos em morango, maçã e uva**. Santa Maria: UFSM. 2005, 109 p.

RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RIBAS, P. P., MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e ensino. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 149-158, 2009.

RIPLEY, B. D., LISSEMORE, L. I., LEISHMAN, P. D., DENOMMÉ, M. A., RITTER, L. Pesticide residues on fruits and vegetables from Ontario, Canada, 1991–1995. **Journal of AOAC International**, v. 83, n.1, p.196-213, 2000.

RISTICEVIC, S., NIRI, V. H., VUCKOVIC, D., PAWLISZYN, J. Recent developments in solid-phase microextraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 781-795, 2009.

RISTICEVIC, S., LORD, H., GÓRECKI, T., ARTHUR, C. L., PAWLISZYN, J. Protocol for solid-phase microextraction method development. **Nature Protocols**, v. 5, p. 122-139, 2010.

ROCHA, T. M., GONÇALVES, E. C. B. de A., FARIA, M. V. de C. Lavagem e sanitização em maçã (*malus domestica* borkh.) cultivar royal gala: avaliação na redução de agrotóxicos organofosforados. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 4, p. 659-665, 2010.

RODRIGUES, F. de M., MESQUITA, P. R. R., OLIVEIRA, L. S., OLIVEIRA, F. S., FILHO, A. M., PEREIRA, P. A. de P., ANDRADE, J. B. Development of a headspace solid-phase microextraction/gas chromatography–mass spectrometry method for determination of

organophosphorus pesticide residues in cow milk. **Microchemical Journal**, v. 98, p. 56-61, 2011.

RODRÍGUEZ, R., MAÑES, J., PICO, Y. Off-line solid-phase microextraction and capillary electrophoresis mass spectrometry to determine acidic pesticides in fruits. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 3, p. 452-459, 2003.

ROSSA, P. N., SÁ, E. M. F., BURIN, V. M., BORDIGNON-LUIZ, M. T. Optimization of microbial transglutaminase activity in ice cream using response surface methodology. **Food Science and Technology**, v. 4, p. 29–34, 2011.

SANCHES, S. M., SILVA, C. H. T. P., CAMPOS, S. X., VIEIRA, E. M. Agrotóxicos e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Agrotóxicos: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, p. 53-58, 2003.

SANCHEZ-ORTEGA, A., SAMPEDRO, M. C., UNCETA, N., GOICOLEA, M. A., BARRIO, R. J. Solid-phase micro-extraction coupled with high performance liquid chromatography using on-line diode-array and electrochemical detection for the determination of fenitrothion and its main metabolites in environmental water samples. **Journal Chromatography A**, v. 1094, p. 70-76, 2005.

SANTOS, A. M., MEDEIROS, A. R. M. **Morango** – Produção. Brasília: EMBRAPA CLIMA TEMPERADO (Pelotas, RS), 2003. 81p.

SANTOS, J. P., WAMSER, A. F. Fruit bagging effect on the damage caused by biotics and abiotics factors in an organic apple orchard. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, 2006.

SARAIVA, M. A. R. **Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e hidroponia**. Lavras: UFLA, 2004. 400p.

SATO, G. S., ASSUMPCÃO, R. Pólos de produção do morango. **Informações econômicas**, v. 32, n. 11, 2002.

SCHENCK, F. J., CALLERY, P., GANNETT, P. M., DAFT, J. R., LEHOTAY, S. J. Comparison of Magnesium Sulfate and Sodium Sulfate for Removal of Water from Pesticide Extracts of Foods. **Journal AOAC International**, v. 85, n. 5, p. 1177-1180, 2002.

SCHENCK, F. J., HOBBS, J. E. Evaluation of Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) Approach to Pesticide Residue Analysis. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 73, n. 1, p. 24-30, 2004.

SECEX. Secretaria de Comércio Exterior. Sistema de análise das informações de comércio exterior via internet. Disponível em: <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/alice.asp>2010. Acesso em maio de 2010.

SHARMA, D., NAGPAL, A., PAKADE, Y. B., KATNORIA, J. K. Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruit and vegetables: A review. **Talanta**, v. 82, n. 4, p. 1077-1089, 2010.

SHEN, Z., HE, Z., WANG, P., ZHOU, Z., SUN, M., LI, J., LIU, D. Low-density magneto fluid dispersive liquid-liquid microextraction for the fast determination of organochlorine pesticides in water samples by GC-ECD. **Analytica Chimica Acta**, v. 793, p. 37-43, 2013.

SIMPLÍCIO, A. L., BOAS, L.V. Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. **Journal Chromatography A**, v. 833 p. 35-42, 1999.

SINDAG, 2010. In: Situação do mercado de agrotóxicos no mundo e no Brasil, Campanha nacional contra o uso de agrotóxicos e pela vida, 2012, São Paulo.

SINGH, S. B., MUKHERJEE, I., MAISNAM, J. Determination of Pesticide Residues in Integrated Pest Management and Nonintegrated Pest Management Samples of Apple (*Malus pumila* Mill.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 11277-11283, 2009.

SÍNTESE ANUAL DA AGRICULTURA DE SANTA CATARINA  
2010-2011. Florianópolis: EPAGRI/CEPA, 2011. 184p.

SRIVASTAVA, A. K., TRIVEDI, P., SRIVASTAVA, M. K.,  
LOHANI, M. Monitoring of pesticide residues in market basket  
samples of vegetable from Lucknow City, India: QuEChERS method.  
**Environmental Monitoring and Assessment**, 2010.

SOARES SOBRINHO, J. L. et al. Validação de metodologias analíticas  
no mercado farmacêutico: Caso paracetamol. **Controle de  
Contaminação**, v.1, n. 73, p. 35-41, 2005.

STEPAN, R., TICHA, J., HAJŠLOVA, J. Baby food production chain:  
Pesticide residues in fresh apples and products. **Food Additives and  
Contaminants**, v. 22, n. 12, p. 1231-1242, 2005.

STUBBINGS, G., BIGWOOD, T. The development and validation of a  
multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-  
MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in  
animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective,  
Rugged and Safe) approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 637, n. 1-2, p.  
68-78, 2009.

SUCHARA, E. A., BUDZIAK, D., MARTENDAL, E., COSTA, L. L.,  
CARASEK, E. A combination of statistical and analytical evaluation  
methods as a new optimization strategy for the quantification of  
pharmaceutical residues in sewage effluent. **Analytica Chimica Acta**,  
v. 613, n. 2, p. 169-176, 2008.

SURMA-ZADORA, M., GROCHOWALSKI, A. Using a membrane  
technique (SPM) for high fat food sample preparation in the  
determination of chlorinated persistent organic pollutants by a GC/ECD  
method. **Food Chemistry**, v. 111, p. 230-235, 2008.

TAN, G. H., ABDULRA'UF, L. B. Recent developments and  
applications of microextraction techniques for the analysis of pesticide  
residues in fruits and vegetables. **Pesticides-Recent Trends in  
Pesticide Residue Assay**, p. 171-190, 2012.



TEIXEIRA, L. J. Q., PEREIRA, J. M. A, T. K., SILVA, N. M., REIS, F. P. Hábitos de consumo de frutas entre estudantes da Universidade Federal de Viçosa. **Ceres**, v.53, n. 307, p. 366-373, 2006.

THEISEN, G. O mercado de agroquímicos. XV Encontro Nacional sobre Metodologias e Gestão de Laboratório – XV MET, Embrapa Clima Temperado, 2010. Disponível em [www.cpact.embrapa.br/eventos/2010/met/palestras/28/281010\\_Paine13\\_Giovani\\_THEISEN.pdf](http://www.cpact.embrapa.br/eventos/2010/met/palestras/28/281010_Paine13_Giovani_THEISEN.pdf). Acesso em março de 2012.

THEOPHILO, C. F., POLI, M. F. P., CUERVO, M. R. M., MILANEZ, J. F., MELGAREJO, L., PIZZATO, A. C. Agrotóxicos permitidos no cultivo das frutas e verduras mais consumidas pela população brasileira e algumas de suas implicações na saúde. **Revista da Graduação**, v. 7, n. 1, 2014.

TICHA, J., HAJŠLOVA, J., JECH, M., HONZICEK, J., LACINA, O., KOHOUTKOVA, J., KOCOUREK, V., LANSKY, M., KLOUTVOROVA, J., FALTA, V. Changes of pesticide residues in apples during cold storage. **Food Control**, v. 19, n. 3, p. 247-256, 2008.

TOMLIN, C. D. S. **The pesticide manual: a world compendium**. 12 ed. Surrey: British. Crop Protection. Council, 2000, 1250 p.

UENO, B. Manejo Integrado de Doenças do Morango. **Palestras do 2º Simpósio Nacional do Morango**, v. 1, p.70-79, 2004.

ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 902, n. 1, p. 167-194, 2000.

VALENTE, A. L. P., AUGUSTO, F. SPME, Solid Phase Microextraction. **Química Nova**, v.23, n.4, 2000.

VIEIRA, L. M., JUNIOR, R. G. Boletim da Maçã. **EPAGRI/CEPA**, v. 1, 2014.

VOLANTE, M., PONTELLO, M., VALOTI, L., CATTANEO, M., BIANCHI, M., COLZANI, L. Application of solid phase

micro-extraction (SPME) to the analysis of pesticide residues in vegetables. **Pest Management Science**, v. 56, p. 618-636, 2000.

VUCKOVIC, D., ZHANG, X., CUDJOE, E., PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction in bioanalysis: New devices and directions. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4041-4060, 2010.

WAISSMANN, W. Agrotóxicos e doenças não transmissíveis. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 12, p. 15-24, 2007.

WANG, Z., HENNION, B., URRUTY, L., MONTURY, M. Solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography: a complementary technique to solid-phase microextraction-gas chromatography for the analysis of pesticide residues in strawberries. **Food Additives & Contaminants**, v. 17, n. 11, p. 915-923, 2000.

WENNRICH, L., POPP, P., BREUSTE, J. Determination of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in fruit and vegetables using subcritical water extraction combined with sorptive enrichment and GC-MS. **Chromatographia**, v. 53, p. 380-386, 2001.

WILKOWSKA, A., BIZIUK, B. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS Methodology. **Food Chemistry**, v. 125, p. 803-812, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. OMS.

<http://www.who.int/topics/pesticides/en/>. Acessado em fevereiro de 2015.

YÜCEL, E., GÜLER, N., YÜCEL, Y. Optimization of deposition conditions of CdS thin films using response surface methodology. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 589, p. 207-212, 2014.

ZANELLA, R., PRIMEL, E. G., GONÇALVES, F. F., MARTINS, A. F. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of clomazone residues in surface water. **Journal of Chromatography A**, v. 904, n. 2, p. 257-262, 2000.

ZAWIYAH, S., CHE MAN, Y. B., NAZIMAH, S. A. H., CHIN, C. K., TSUKAMOTO, I., HAMANYZA, A. H., NORHAIZAN, I.

Determination of organochlorine and pyrethroid pesticides in fruit and vegetables using SAX/PSA clean-up column. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 98-103, 2007.

ZHANG, Y., ZHANG, X., JIAO, B. Determination of ten pyrethroids in various fruit juices: Comparison of dispersive liquid–liquid microextraction sample preparation and QuEChERS method combined with dispersive liquid–liquid microextraction. **Food Chemistry**, v. 159, p.367-373, 2014.

ZHAO, P., *et al.* Rapid multiplug filtration cleanup with multiple-walled carbon nanotubes and gas chromatography–triple-quadruple mass spectrometry detection for 186 pesticide residues in tomato and tomato products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 17, p. 3710-3725, 2014.

ZIMMERMANN, T., ENSINGER, W. J., SCHMIDT, T. C. Depletion solid-phase microextraction for the evaluation of fiber-sample partition coefficients of pesticides. Journal of Chromatography A, v. 1102, p. 51-59, 2006.