FURG

Tese de Doutorado

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO UTILIZANDO AREIA COMO SUPORTE SÓLIDO NA MSPD PARA EXTRAÇÃO MULTICLASSES DE AGROTÓXICOS POR GC-MS E LC-MS/MS EM FRUTAS E HORTALIÇAS

Elisane Odriosolla dos Santos

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2017

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO UTILIZANDO AREIA COMO SUPORTE SÓLIDO NA MSPD PARA EXTRAÇÃO MULTICLASSES DE AGROTÓXICOS POR GC-MS E LC-MS/MS EM FRUTAS E HORTALIÇAS

por

ELISANE ODRIOSOLLA DOS SANTOS

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

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2017

AGRADECIMENTOS

Ao professor Ednei Gilberto Primel pela oportunidade, pela orientação, apoio, incentivo e confiança. Minha eterna admiração pelo seu profissionalismo e comprometimento.

À professora Eliana Badiale Furlong pela disponibilidade, incentivo, amizade, confiança e pelos ensinamentos que permitiram que eu evoluísse como pessoa e profissionalmente. Muito obrigada!!

Aos professores Osmar Prestes, Bruno Meira, Eliana Furlong e Manoel Martins pela disposição em participar na qualificação e na defesa da tese e pelas valiosas sugestões na finalização deste estudo.

Ao meu filho Isaac, meu anjo que dá sentido a minha vida, desculpa a ausência, você é meu tudo te amo muito, muito, muito!!! Ao meu marido Seiber, pelo apoio, força, incentivo, compreensão e companheirismo de todas as horas. Sem você nada disso seria possível!!

Aos meus pais, Edelcir e Vanilda os quais não tenho palavras para agradecer todo apoio e amor, vocês são muito especiais sem vocês eu não seria nada. Obrigada pela vida, educação, princípios que me fez chegar até aqui.

À minha irmã Liliane pela amizade, carinho, apoio e incentivo e pelo cuidado com o Isaac quando estive longe. Muito obrigada por tudo, não tenho palavras para agradecer!!!. Às minhas sobrinhas amadas Mônica e Gabriela que trazem leveza e alegria para a minha vida.

À todos os meus amigos que sempre me proporcionam momentos de descontração e torcem por mim. Em especial, a Dani, Renata e Carina, as quais tornaram todos os momentos mais alegres e agradáveis. Muito obrigada pelo incentivo e amizade sincera!!!

À minha amiga Maristela pela amizade, companheirismo, apoio e pelas muitas conversas. Foi muito bom te reencontrar!!!

À Liziane por toda sua ajuda, ensinamentos, disponibilidade, solidariedade e acolhimento. Muito obrigada!!!

À Renata pelos ensinamentos, companheirismo, apoio e amizade. Valeu Re!

À minha amiga Julia pelo incentivo, amizade, apoio constante e momentos de descontração.

À Ana Victoria (Paraguaya) e Sónia pelos momentos alegres de descontração multilíngue!!!

À Gabi e Karina poder contar com a alegria de vocês e pelo companheirismo. Tenho um grande carinho por vocês!!

À Liziara pela acolhida, por compartilhar teus conhecimentos, pelo apoio e incentivo.

À Sergiane pelos ensinamentos e pela ajuda dada durante a realização deste trabalho.

À Ana Carla pelo companheirismo, carinho e amizade!

À Joana pela amizade, companheirismo, estando sempre disposta a ajudar. És muito especial!

Aos meus amigos e colegas do LACOM com quem trabalhei, durante estes quase cinco anos. Convivi com diversas pessoas então agradeço a todos, sem exceção, os bons momentos, os ensinamentos compartilhados e contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Alisson, pela sua colaboração incansável nas análises no MEV.

À professora Lissa Gonçalves pela carinhosa acolhida, amizade e solidariedade. À professora Sandra Freire pela co-orientação e colaboração para execução das atividades em Cabo Verde. À Mara Regina Silva e Adriana Rotoli pelo cuidado e companhia agradável.

À professora Gionara Tauchen pela oportunidade em realizar o doutorado sanduiche e pela agradável companhia. À Capes pelo apoio financeiro para realização do doutorado sanduiche.

Às famílias de agricultores que me receberam de forma afetuosa e contribuíram para o andamento do trabalho.

À Deus por não me deixar desistir, me dando forças para enfrentar os obstáculos.

"Precisamos dar um sentido humano às nossas construções. E, quando o amor ao dinheiro, ao sucesso nos estiver deixando cegos, saibamos fazer pausas para olhar os lírios do campo e as aves do céu."

Érico Veríssimo

RESUMO

Título: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO UTILIZANDO AREIA COMO SUPORTE SÓLIDO NA MSPD PARA DETERMINAÇÃO DE MULTICLASSES DE AGROTÓXICOS POR GC-MS E LC-MS/MS EM FRUTAS E HORTALIÇAS

Autor: Elisane Odriosolla dos Santos
Orientador: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel
Co-orientador: Eliana Badiale Furlong

Os agrotóxicos têm sido amplamente utilizados na agricultura para assegurar alta produtividade e garantir a qualidade na produção de alimentos, porém o seu uso indiscriminado têm resultado frequentemente na ocorrência de resíduos tóxicos em frutas e hortaliças. O controle de resíduos de agrotóxicos em alimentos torna-se necessário em concordância com a legislação e garantia da segurança dos alimentos para a população, para isso torna-se necessário dispor de métodos analíticos eficientes para verificar a presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos. A dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês matrix solid phase dispersion) é uma técnica de preparo de amostra rápida e eficiente que permite a extração dos analitos presentes em diferentes matrizes. Neste trabalho foi avaliada a MSPD modificada usando adsorvente natural e solvente de baixa toxicidade para extração de multiclasses de agrotóxicos em amostras de frutas e hortaliças de forma a obter um método de baixo custo e com menor geração de resíduos, empregando determinação por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial. Nas condições otimizadas (1 g de areia; 5 mL de acetato de etila e 20 mg de carvão ativo e 10 minutos em banho ultrassônico) as recuperações variaram entre 55 e 140 % com RSD inferior a 22 %. Os limites de quantificação do método variaram entre 0,005 e 0,5 mg kg^{-1} para todos os analitos em couve, tomate e cenoura. As curvas analíticas apresentaram valores de coeficiente de correlação superiores a 0,99 e percentual de resíduos inferiores a 20 %. Tomate foi a matriz que apresentou maior efeito matriz e limites de quantificação. As amostras de morango apresentaram maior contaminação entre as matrizes avaliadas, sendo encontrados tiametoxam, captan, clorpirifós, dimetoato em concentração que variaram de 0,01 a 0,06 mg kg^{-1}, em uma amostra de tomate foi encontrado acefato e tebuconazol, nas concentrações de 0,45 e 0,3 mg kg^{-1}, respectivamente. Quando comparado com os métodos de referência e com outros trabalhos publicados na literatura, o método proposto possibilitou a análise de multiclasses de agrotóxicos em diversas matrizes de alimentos, proporcionando redução no custo das análises com o uso de um suporte sólido natural, diminuição dos resíduos gerados e o risco para a saúde do analista, devido à baixa toxicidade do solvente selecionado.

Palavras-chave: multimatriz, multirresíduo, MSPD, LC-MS/MS, GC-MS.

ABSTRACT

Title: DEVELOPMENT OF METHOD USING SEA SAND AS SOLID SUPPORT IN MSPD FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDES MULTICLASS BY GC-MS AND LC-MS/MS IN FRUITS AND VEGETABLES

Author: Elisane Odriosolla dos Santos, M.Sc.

Advisor: Ednei Gilberto Primel, Ph.D

Co-advisor: Eliana Badiale Furlong, Ph.D

Pesticides have been widely used in agriculture to ensure high productivity and ensure quality in food production, but their indiscriminate use has resulted in the occurrence of toxic residues in fruits and vegetables. The control of residues of pesticides in food becomes necessary in accordance with the legislation and guarantee of food safety for a population, to make it necessary to have efficient analytical methods to verify the presence of pesticide residues in food. MSPD is a rapid and efficient sample preparation technique that allows the extraction of the analytes present in different matrices. In this work the modified MSPD was evaluated using natural adsorbent and low toxicity solvent for extraction of multiclasses of pesticides in fruit and vegetable samples in order to obtain a low cost and less waste generation, employing determination by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography coupled mass spectrometry tandem (LC-MS/MS). Under optimized conditions (1.0 g of sea sand, 5 mL of ethyl acetate, 20 mg of activated charcoal and 10 minutes in ultrasonic bath) recoveries varied between 55 and 140 % with RSD lower than 22 %. The quantification limits of the method ranged from 0.005 to 0.5 mg kg^{-1} for all analytes in kale, tomato and carrot. The analytical curves showed values of correlation coefficient higher than 0.99, percentage of residues of 20 %. Tomato was a matrix that presented higher matrix effect and limits of quantification. As strawberry samples showed higher contamination among evaluated matrices, being thiamethoxam, captan, chlorpyriphos, dimethoate, in a sample of tomato was found acephate and tebuconazole, at concentrations of 0.45 and 0.3 mg kg^{-1}, respectively. When compared to the official methods and other studies published in the literature, the proposed method presented for the application of multiclass analysis of pesticides in several food matrices, proving a cost reduction with the use of a natural solid support, reduction of waste generated and the risk to the health of the analyst, due to the low toxicity of selected solvent.

Keywords: Multimatrices, multiresidue, MSPD, LC-MS/MS, GC-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição percentual dos ingredientes ativos de agrotóxicos mais comercializados, por classes de uso - Brasil – 2012. 25
Figura 2 – Número de publicações usando a palavra-chave MSPD, desde o seu desenvolvimento 44
Figura 3 - Imagem do google earth para os pontos de coleta das amostras de morango, tomate, couve, alface e pimentão utilizadas na aplicabilidade (marcados). 60
Figura 4 - Esquema da MSPD avaliada 73
Figura 5 - Locais de coletas das areias no sul do Brasil 76
Figura 6 - Cromatograma dos íons totais (TIC) obtido por GC-MS da mistura de 27 agrotóxicos na concentração de 1 mg L^{-1} em acetonitrila 84
Figura 7 - Efeito da temperatura de injeção nas áreas dos picos dos 27 agrotóxicos na concentração de 1 mg L^{-1}. (Condição do GC-MS: temperatura da interface 280 ºC, temperatura da fonte de íons: 300 ºC). 86
Figura 8 - Efeito da temperatura da interface nas áreas dos picos dos 27 agrotóxicos na concentração de 1 mg L^{-1}. (Condição do GC-MS: temperatura de injeção 300 ºC, temperatura da fonte de íons: 300 ºC) 88
Figura 9- Efeito da temperatura da fonte de íons nas áreas dos picos dos 27 agrotóxicos na concentração de 1 mg L^{-1}. (Condição do GC-MS: temperatura de injeção 300 ºC, temperatura da interface: 300 ºC) 90
Figura 10 - Cromatograma no modo SRM obtido por LC-MS/MS da mistura de 10 agrotóxicos na concentração de 1 mg L^{-1} em acetato de etila 92
Figura 11 – Recuperação dos analitos na concentração de 0,1 mg kg^{-1} utilizando diferentes suportes sólidos convencionais na etapa de dispersão na VA-MSPD. (Condição de extração: 0,5 g de amostra fortificada com a mistura de 27 padrões na concentração 0,1 mg kg^{-1}, 1 g de suporte sólido, maceração 5 min., 10 mL de acetonitrila, 1 g de sulfato de sódio, 20 mg de carvão ativo, vortex 1 min., centrifugação 10179 $_{x}$g). Barras de erro indicam desvio padrão relativo (n=3). 96
Figura 12 – Recuperação dos analitos na concentração de 0,1 mg kg^{-1} utilizando diferentes suportes sólidos de obtidos de fonte natural na etapa de dispersão na VA-

MSPD. (Condição de extração: 0,5 g de amostra fortificada com a mistura de 27 padrões na concentração 0,1 mg kg^{-1}, 1 g de suporte sólido, maceração 5 min., 10 mL de acetonitrila, 1 g de sulfato de sódio, 20 mg de carvão ativo, vortex 1 min., centrifugação 10179 $_x$g). Barras de erro indicam desvio padrão relativo (n=3). 97
Figura 13 - Número de analitos que apresentaram valores de recuperação <70 %, entre 70-120 % e >120 %, após extração por MSPD com diferentes suportes sólidos (condição de extração: 0,5 g de amostra fortificada com a mistura de 27 padrões na concentração 0,1 mg kg^{-1}, 1 g de suporte sólido, maceração 5 min., 10 mL de acetonitrila, 1 g de sulfato de sódio, 20 mg de carvão ativo, vortex 1 min., centrifugação 10179 $_x$g) (n=3). 98
Figura 14 - Recuperação dos analitos na concentração de 0,1 mg kg^{-1} utilizando diferentes solventes. (Condição de extração: 0,5 g de amostra fortificada com a mistura de 27 padrões na concentração 0,1 mg kg^{-1}, 1 g de areia, maceração 5 min., 10 mL de solvente, 1 g de sulfato de sódio, 20 mg de carvão ativo, vortex 1 min., centrifugação 10179 $_x$ g). Barras de erro indicam desvio padrão relativo (n=3). 101
Figura 15 - Recuperação dos analitos na concentração de 0,1 mg kg^{-1} utilizando diferentes sais e ausência de sal. (Condição de extração: 0,5 g de amostra fortificada com a mistura de 27 padrões na concentração 0,1 mg kg^{-1}, 1 g de areia, maceração 5 min., 10 mL de acetato de etila, 1,0 g de sal, 20 mg de carvão ativo, vortex 1 min., centrifugação 10179 $_x$g). Barras de erro indicam desvio padrão relativo (n=3). 104
Figura 16 - Recuperação dos analitos na concentração de 0,1 mg kg^{-1} utilizando diferentes equipamentos auxiliares na extração. (Condição de extração: 0,5 g de amostra fortificada com a mistura de 27 padrões na concentração 0,1 mg kg^{-1}, 1 g de areia, maceração 5 min., 10 mL de acetato de etila, 20 mg de carvão ativo, vortex 1 min., banho ultrassônico 10 min, sonda de ultrassom 1 min, centrifugação 10179 $_x$g). Barras de erro indicam desvio padrão relativo (n=3). 107
Figura 17 - Efeitos significativos ($p \leq 0,05$) nas recuperações obtidas para MSPD através do planejamento experimental 2^3. 109
Figura 18 - Recuperação dos analitos utilizando suporte sólido com diferentes tamanhos de partícula. (Condição de extração: 0,5 g de amostra fortificada com a mistura de 27 padrões na concentração 0,1 mg kg^{-1}, 1 g de areia, maceração 5 min.,

5 mL de acetato de etila, 20 mg de carvão ativo, banho ultrassônico 10 min., centrifugação 10179 xg). Barras de erro indicam desvio padrão relativo (n=3). 112
Figura 19 - Imagem por MEV da areia de Bojuru aumento de (a)100X e (b)500X..113
Figura 20 - Imagem por MEV da areia de Bojuru com tamanho de partícula de: (a) 0,090-0,106 mm e (b) 0,180- 0,212 mm (aumento de 100x) 114
Figura 21 - Recuperação dos analitos utilizando areia coletadas em diferentes locais. (Condição de extração: 0,5 g de amostra fortificada com a mistura de 27 padrões na concentração 0,1 mg kg^{-1}, 1 g de areia, maceração 5 min., 5 mL de acetato de etila, 20 mg de carvão ativo, banho ultrassônico 10 min., centrifugação 10179 xg). Barras de erro indicam desvio padrão relativo (n=3). 116
Figura 22 - Imagem por MEV da areia coletada na (a) localidade da Quitéria e (b)da praia do Cassino (aumento de 100x) 117
Figura 23 - Imagem por MEV da areia coletada em Bojuru, partículas contendo: (a) silício, (b) ferro, (c) zircônio, (d) titânio e (e) mistura de sílica, ferro, titânio e zircônio 119
Figura 24 – Fluxograma do método desenvolvido.....120
Figura 25 - Efeito matriz (%) nas matrizes de estudo para couve, tomate e cenoura por GC-MS e LC-MS/MS.....128
Figura 26 - Cromatograma dos íons totais da areia de Bojuru 154
Figura 27 - Cromatograma dos íons totais da areia da praia do Cassino 154
Figura 28 - Cromatograma dos íons totais da areia da localidade da Quitéria.....155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vendas por classes de usos dos produtos formulados – 2014. 24
Tabela 2 - Limites máximos de resíduos de agrotóxicos para couve, em mg kg^{-1} 28
Tabela 3 - Trabalhos empregando MSPD em alimentos.....40
Tabela 4 - Revisão bibliográfica dos métodos empregando MSPD com areia como suporte sólido. 48
Tabela 5 - Vantagens e desvantagens de alguns solventes utilizados para extração na MSPD.....53
Tabela 6 - Vantagens e desvantagens da MSPD assistida por vortex, banho ultrassônico e sonda de ultrassom em relação à MSPD original.....56
Tabela 7 – Estrutura química, classe, grupo químico, modo de ação, log Kow e número CAS dos agrotóxicos e selecionados para estudo. 62
Tabela 8 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 + 3 pontos centrais com valores codificados e valores reais (em parênteses).....75
Tabela 9 - Analitos, tempo de retenção e íons monitorados por GC-MS 83
Tabela 10 - Agrotóxicos quantificados por LC-MS/MS, modo de ionização, transições, energia do cone e voltagem de colisão.....92
Tabela 11 - Condições de eluição empregadas no modo gradiente 92
Tabela 12 - Análise EDX da areia de Bojuru com tamanho de partícula de 0,090-0,106 e 0,180-0,212 mm (% atômico). 115
Tabela 13 – Distribuição granulométrica das areias em estudo (em % mássico). ..117
Tabela 14 - Análise EDX da areia da praia do Cassino e da Quitéria (% atômico). 118
Tabela 15 – Curvas no solvente e nos extratos de couve, tomate e cenoura obtidas por GC-MS e LC-MS/MS.....122
Tabela 16 - Limites de Quantificação do instrumento (em mg L^{-1}) e do método para as amostras de couve, cenoura e tomate (em mg kg^{-1}) por GC-MS e LC-MS/MS*.125
Tabela 17 – Recuperações (R) e desvio padrão relativo (RSD) para as amostras de couve fortificadas em diferentes níveis por GC-MS e LC-MS/MS*.....130
Tabela 18 - Recuperações (R) e desvio padrão relativo para amostras de cenoura e tomate por GC-MS e LC-MS/MS*. 132
Tabela 19 - Resultados da aplicabilidade do método em amostras de frutas e hortaliças.....134

Tabela 20 - Comparação entre as técnicas de preparo de amostra oficiais e a proposta neste trabalho.....135

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C18, Sílica modificada com hidrocarboneto linear C_{18}, octadecilsilano

CAS, do ingês *Chemical Abstract Service*

dSPE, extração em fase sólida dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*

EI, ionização por elétrons, do inglês *Electron Ionization*

EM, efeito matriz

ESI, ionização por eletrospray, do inglês *electrospray ionization*

EPA, Agência de Proteção Ambiental, do inglês *Environmental Protection Agency*

FAO, Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FDA, do inglês *Food and Drug Administration*

GC: cromatografia gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

GC-ECD: cromatografia gasosa acoplada ao detector de captura de elétrons, do inglês *gas chromatogrpahy with electron capture detector*

GC-MS, cromatografia a gás acoplado ao espectrômetro de massa, do inglês *gas chromatography with mass spectrometry detector*

GC-NPD: cromatografia gasosa acoplada ao detector nitrogênio-fósforo, do inglês *gas chromatogrpahy with nitrogen–phosphorus detector*

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

K_{OW}, coeficiente de partição octanol-água, do inglês *octanol/water partition coeficient*

LC: cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *liquid chromatography*

LC-DAD: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos, do inglês *high pressure liquid chromtography with diode array detector*

LC-MS/MS, cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa em série, do inglês *liquid chromatography tandem mass spectrometry*

LC-TOF-MS: cromatografia líquida acoplada ao detector por tempo de voo, do inglês *liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry*

LMR, limite máximo de resíduo

LOQ, limite de quantificação, do inglês, *limit of quantification*

MSPD, dispersão da matriz em fase sólida, do inglês matrix solid-phase dispersion

m/z, razão massa-por-carga

OMS, Organização Mundial da Saúde

pK_a, potencial de dissociação ácida

PSA, amina primária e secundária, do inglês *primary secondary amine*

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

R^2, coeficiente de determinação

RSD, Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

s, estimativa do desvio padrão absoluto

SIM, monitoramento do íon selecionado, do inglês .

SPE, extração em fase sólida, do inglês *solid phase extraction*

SPME, microextração em fase sólida, do inglês *solid phase microextraction*

SRM, monitoramento de reações selecionadas, do inglês *selected reaction monitoring*

SSDM, método de ruptura da areia do mar, *sea sand disruption method*

TIC, Cromatograma de Íon Total, do inglês *Total Ion Cromatogram*

t_R, tempo de retenção

UA-MSPD, dispersão da matriz em fase sólida assistida por ultrasom, do inglês *ultrasound-assisted matrix solid phase dispersion*

VA-MSPD, dispersão da matriz em fase sólida assistida por ultrassom, do inglês *ultrasound-assisted matrix solid phase dispersion*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19
2 HIPÓTESE DA TESE 21
3 OBJETIVOS 22
4 REVISÃO DA LITERATURA 23
4.1 Contaminação de alimentos por agrotóxicos 23
4.2 Regulamentações para uso de agrotóxicos 26
4.3 Agrotóxicos 29
4.3.1 Inseticidas 29
4.3.1.1 Organofosforados 30
4.3.1.2 Piretróides 31
4.3.1.3 Carbamatos 33
4.3.1.4 Neonicotinoides 33
4.3.2 Herbicidas 34
4.3.3 Fungicidas 34
4.4 Técnicas de preparo de amostras 35
4.4.1 MSPD 36
4.4.1.1 Suportes sólidos 44
4.4.1.1.1 Suportes sólidos convencionais 45
4.4.1.1.2 Suportes sólidos de fontes naturais 46
4.4.1.2 Solventes 52
4.4.1.3 Modificações na MSPD 53
5 MATERIAIS E MÉTODOS 57
5.1 Instrumentação 57
5.2 Reagentes, solventes e materiais 58
5.3 Seleção das matrizes vegetais 59
5.4 Amostragem das matrizes vegetais 60
5.5 Processamento prévio da amostra 60
5.6 Seleção dos analitos 61
5.7 Preparo das soluções analíticas 70
5.8 Seleção das condições de separação dos analitos no sistema GC-MS 70
5.8.1 Programação da temperatura do forno 71

5.8.2 Avaliação das temperaturas do injetor, interface e fonte de íons 71
5.9 Seleção das condições de separação em LC-MS/MS 71
5.9.1 Condições do espectrômetro de massas 72
5.10 Seleção das variáveis qualitativas na MSPD 72
5.10.1 Escolha do suporte sólido.....73
5.10.2 Escolha do solvente.....73
5.10.3 Efeito da adição de sais.....74
5.10.4 Modificações da MSPD.....74
5.11 Otimização da MSPD.....74
5.12 Avaliação da eficiência da MSPD utilizando areias coletadas em diferentes locais 75
5.13 Efeito da granulometria da areia utilizada na MSPD.....76
5.14 Caracterização das areias utilizadas na MSPD 76
5.15 Validação 76
5.15.1 Linearidade.....77
5.15.2 Limite de quantificação 78
5.15.3 Efeito matriz.....78
5.15.4 Repetibilidade e precisão intermediária.....79
5.15.5 Exatidão.....79
5.15.6 Robustez.....80
5.15.7 Aplicabilidade.....81
6 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS 82
6.1 Avaliação da separação cromatográfica por GC-MS 82
6.2 Seleção dos parâmetros do GC-MS 85
6.3 Avaliação da separação cromatográfica por LC-MS/MS.....91
6.4 Seleção das variáveis qualitativas na MSPD 93
6.4.1 Seleção do suporte sólido 93
6.4.2 Seleção do solvente 99
6.4.3 Seleção de sais 103
6.4.4 Modificações da MSPD 105
6.5 Otimização da MSPD.....108
6.6 Avaliação da composição e da granulometria da areia.....111

6.7 Validação do método proposto 120
6.7.1 Linearidade.....121
6.7.2 Limite de quantificação.....125
6.7.3 Efeito matriz 126
6.7.4 Exatidão e precisão.....129
6.7.5 Robustez 131
6.7.6 Aplicabilidade 133
6.8 Comparação entre as técnicas de preparo de amostra 134
7 CONCLUSÕES.....136
8 TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS 137
9 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS 138
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....139
APÊNDICE A - Cromatogramas.....154
APÊNDICE B – Questionário 156
APÊNDICE C – Programa de pró-mobilidade CAPES/AULP 158

1 INTRODUÇÃO

Frutas e hortaliças são importantes componentes de uma dieta saudável e seu consumo em quantidade adequada pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares, crônico-degenerativas e alguns tipos de câncer. No entanto, estes alimentos estão entre os principais veículos de compostos tóxicos que conferem risco de danos à saúde pública. Entre estes compostos estão os agrotóxicos, os quais vêm sendo detectados em amostras de alimentos de origem vegetal em todo o mundo. O uso correto destes propicia a alta disponibilidade de alimentos para a população, pois protegem as culturas de pragas, porém o uso indiscriminado na agricultura pode contaminar o solo, a água e os alimentos (ANDRADE *et al*., 2011).

A preocupação com a presença de resíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos se dá pelos efeitos adversos a saúde humana. Assim, o monitoramento de destes resíduos em alimentos é uma prioridade de programas e políticas para a garantia da segurança dos alimentos para a população, uma vez que pragas de insetos causam uma perda anual média de 7,7 % na produção brasileira, o que representa uma redução de aproximadamente 25 milhões de toneladas de alimentos (OERKE, 2006; OLIVEIRA *et al*., 2014).

As vendas anuais de agrotóxicos e afins no Brasil, entre os anos de 2000 e 2012, tiveram um crescimento de 194,1 %, segundo o IBAMA (2012). Os agrotóxicos utilizados na agricultura incluem principalmente compostos organofosforados, carbamatos e piretróides que são conhecidos por serem perigosos para o sistema nervoso e o sistema reprodutivo, podendo resultar em paralisia e morte (LU *et al*., 2013).

A determinação dos resíduos de agrotóxicos nos alimentos, água e solo representa um mecanismo para a proteção da saúde humana e para fins comerciais e de controle de qualidade de produtos alimentícios. Apesar da análise de rastreamento de agrotóxicos ser realizada desde a década de 70, ainda permanece um desafio, pois diferentes classes químicas podem estar presentes em baixas concentrações em matrizes complexas. Portanto, o desenvolvimento de métodos analíticos multirresíduos que gerem resultados robustos e confiáveis com menores limites de detecção são muito importantes para a implementação de medidas de

controle e monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos (CORREIA *et al*., 2016).

Diferentes métodos para a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos foram propostos em muitos países em todo o mundo há vários anos (ANASTASSIADES *et al*., 2003a). No entanto, amostras como frutas e hortaliças são matrizes complexas e uma ampla multiplicidade de agrotóxicos com uma grande variedade de propriedades físico-químicas pode ser encontrada nestas matrizes, assim, ainda não há um método perfeitamente adequado para a determinação simultânea de multiclasses de agrotóxicos nestes tipos de matrizes.

A determinação de multirresíduos de agrotóxicos em matrizes complexas requer que o procedimento de preparo da amostra seja seguido por um método analítico que deve ser capaz de detectar e deve ser seletivo o suficiente para quantificar vários compostos em baixas concentrações. Assim, é de extrema importância que seja adotado um procedimento de análise rápido, eficiente, de baixo custo, substituindo reagentes tóxicos, miniaturizando métodos, permitindo reduzir drasticamente a quantidade de reagentes consumidos e os resíduos gerados (FERNANDEZ-ALBA e BARCELÓ, 2005; ARMENTA *et al*., 2008).

Uma etapa importante para a determinação de resíduos de agrotóxicos em frutas e hortaliças é o preparo da amostra que visa separar e concentrar os analitos presentes nestas matrizes complexas. O uso de suportes sólidos alternativos renováveis de baixo custo têm tornado a MSPD uma técnica de preparo de amostra ainda mais atrativa (HERTZOG *et al*., 2015).

A eficiência e seletividade na MSPD estão relacionadas a diversos fatores, tais como: o estado físico da amostra, a concentração do analito presente na amostra e propriedades relativas dos analitos, as interferências da amostra, a combinação adequada de sorvente, entre outras variáveis (RUBERT *et al*., 2011). Diversos materiais como terra diatomácea, sílica, alumina neutra e C18 tem sido estudados quanto a sua aplicação como sorventes na extração de agrotóxicos polares em amostras de plantas (CAPRIOTTI *et al*., 2015). Alguns destes suportes possuem um custo elevado e apresentam risco a saúde do analista, como fibrose pulmonar, câncer, tuberculose pulmonar (SIGMA-ALDRICH, 2017).

A areia é um suporte sólido abundante, natural, de baixo custo, ambientalmente mais amigável que os tradicionais. Além disso, devido às diferenças na natureza química dos materiais abrasivos, os analitos podem interagir com materiais como C18, no entanto a interação com materiais de areia do mar, que são compostos principalmente de silicatos inertes e óxidos inertes ocorre provavelmente de forma mais fraca (MANHITA *et al*., 2006).

2 HIPÓTESE DA TESE

O presente estudo pretende demonstrar a viabilidade da MSPD para extração de analitos multiclasses em matrizes vegetais de alimentos. Assim como comprovar a hipótese de que materiais alternativos naturais, como areia, quitina, quitosana e celite podem ser utilizados como suporte sólido na MSPD para análise de resíduos de multiclasses de agrotóxicos em diversas matrizes como frutas e hortaliças, com eficiência igual ou superior aos materiais convencionais.

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolver e validar um método de preparo de amostra por MSPD utilizando areia como suporte sólido para a determinação de multiclasses de agrotóxicos em diferentes matrizes como amostras de frutas e hortaliças por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS), visando reduzir custos e menor exposição do analista a solventes tóxicos.

Para desenvolver e validar o método foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Selecionar os agrotóxicos de acordo com sua utilização em culturas produzidas no município de Rio Grande;
- Estabelecer os melhores parâmetros para a análise empregando LC-MS/MS e GC-MS;
- Propor modificações na MSPD priorizando o emprego de quantidades reduzidas de solventes de baixa toxicidade e utilização de novos suportes sólidos naturais como areia, quitina, quitosana e celite de forma a obter um método eficiente e de baixo custo;
- Demonstrar a aplicabilidade da técnica MSPD na extração multiclasses de agrotóxicos em frutas e hortaliças produzidas na região de Rio Grande
- Disponibilizar dados que possibilitem a tomada de decisões na adequação da legislação brasileira;
- Fornecer aos produtores rurais do município de Rio Grande os resultados das análises de agrotóxicos nas amostras de frutas e hortaliças coletadas.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Contaminação de alimentos por agrotóxicos

No Brasil, assim como em outros países em desenvolvimento, a partir da década de 60, um modelo agrícola foi implementado num processo conhecido como Revolução Verde. A Revolução Verde foi um movimento agrícola mundial que começou no México em 1944 com um objetivo primário de aumentar a produção de grãos no mundo devido à escassez no fornecimento de alimentos. A Revolução Verde envolveu o uso de agrotóxicos, e após o seu sucesso no México se espalhou pelo mundo (TANO, 2011).

Em 1962, o livro Primavera Silenciosa, de Rachel Carson, alertou para os efeitos adversos da utilização dos agrotóxicos, iniciando o debate acerca das implicações da atividade humana sobre o ambiente e o custo ambiental dessa contaminação para a sociedade. A autora advertiu para o fato de que a utilização de produtos químicos, para controlar pragas e doenças, estava interferindo nas defesas naturais do meio ambiente, o seu impacto foi sentido em toda a indústria agroquímica. Assim, com a necessidade de garantir a segurança ambiental foram criadas agências reguladoras nacionais e internacionais, incluindo a Agência de Proteção Ambiental (EPA) em 1970 (CASIDA e QUISTAD, 1998; CARSON, 1962).

O padrão agrícola estabelecido tem sua base tecnológica no uso de agroquímicos (agrotóxicos, fertilizantes e corretivos), mecanização, cultivares de alto potencial de rendimento e técnicas de irrigação, visando a elevação dos índices de produtividade (TADEO *et al*., 2008). Os desenvolvimentos da síntese orgânica durante a Segunda Guerra Mundial e a consolidação do padrão tecnológico da agricultura moderna tiveram importância fundamental no desenvolvimento da indústria mundial de agrotóxicos, o que promoveu aumento significativo na produtividade agrícola (POPP *et al*., 2013).

O Brasil, um dos maiores produtores mundiais de matéria prima alimentícia, estima-se que em 2016, a safra nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas totalizou 183,9 milhões de toneladas (IBGE 2016), mais de 90 % dos agricultores

dependiam do uso de agrotóxicos (IBGE, 2006). O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos, incluindo inseticidas, fungicidas, e herbicidas. A classe de agrotóxicos mais comercializados é a de herbicidas, conforme a Tabela 1.

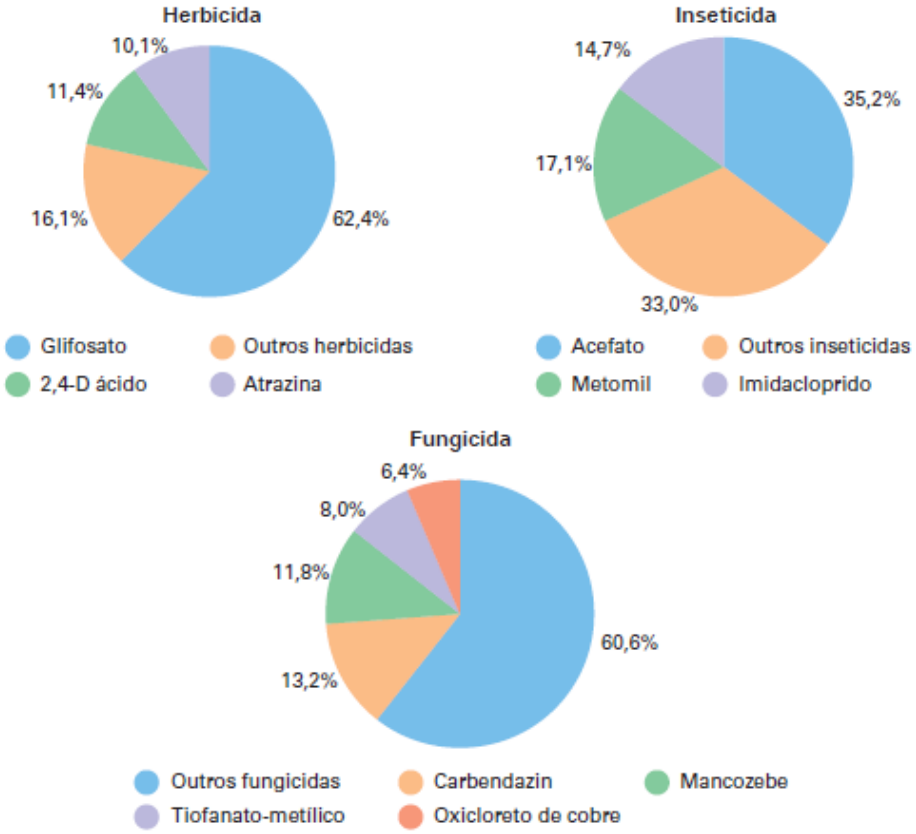
Tabela 1 - Vendas por classes de usos dos produtos formulados – 2014.

Classes de agrotóxicos	Quantidade (toneladas)	Percentual (%)
Herbicidas	294915	57,99
Inseticidas	62573	12,30
Fungicidas	53.993	10,62
Inseticidas, acaricidas	38222	7,52

Fonte: IBAMA

A Figura 1 apresenta o percentual dos ingredientes ativos mais comercializados em 2012, no Brasil. Entre os inseticidas se destacam o acefato, metomil e imidacloprido. A comercialização dos fungicidas se encontra mais distribuída entre os diversos compostos.

Figura 1 - Distribuição percentual dos ingredientes ativos de agrotóxicos mais comercializados, por classes de uso - Brasil – 2012.



Fonte: Indicadores de Desenvolvimento Sustentável (IBGE, 2015).

Os resíduos de agrotóxicos são vestígios de princípios ativos de agrotóxicos e produtos de degradação considerados de importância toxicológica que permanecem nos alimentos após a sua aplicação. As taxas de degradação de agrotóxicos dependem de muitos fatores, incluindo características do composto e condições a que está exposto (CORREIA *et al*., 2016).

Os efeitos cumulativos de baixos níveis de exposição através de resíduos de agrotóxicos nos alimentos geram debates científicos e políticos há mais de um século. A produção de respostas definitivas sobre os efeitos de uma exposição ao longo da vida e baixos níveis de concentração de agrotóxicos é extremamente difícil e limitada pelos conceitos da toxicologia e da epidemiologia (CORREIA *et al*., 2016).

Na maioria dos casos, o processamento leva a grandes reduções nos níveis de resíduos nos alimentos processados, particularmente através das operações de

lavagem, descascamento e cozimento (CORREIA *et al*., 2016). No entanto é necessário que a legislação garanta a segurança dos alimentos e do meio ambiente.

4.2 Regulamentações para uso de agrotóxicos

A regulamentação de segurança dos alimentos é um determinante crítico para os métodos analíticos, estabelecendo: os planos de amostragem e de monitoramento; definição de limites máximos de resíduos (LMR) em alimentos e limites de desempenho mínimos exigidos pelos métodos analíticos para determinação dos resíduos (MACLACHLAN e HAMILTON, 2010; MALIK *et al*., 2010).

No Brasil 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, expressa em partes (em massa) do agrotóxico, afim ou seus resíduos, por milhão de partes de alimento (em massa) (ppm ou mg kg^{-1}) (BRASIL, 2002).

A legislação relativa à segurança dos alimentos não está harmonizada no mundo. No entanto, organismos internacionais bem conhecidos, dos quais a mais representativa é a Comissão do Codex Alimentarius criada pela FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura) e pela OMS (Organização Mundial da Saúde), desenvolve normas científicas e de segurança do alimento alimentar que são uma referência no comércio internacional e um modelo para os países utilizarem na sua legislação. Como um dos maiores importadores mundiais de alimentos, a União Europeia exerce uma grande influência nos testes de segurança alimentar.

A Comunidade Europeia tem estabelecido normas mais restritivas quanto à presença de resíduos de agrotóxicos nas fórmulas infantis, a qual exige que a fórmula para lactentes não contenha níveis detectáveis de resíduos de agrotóxicos, o que significa não mais de 0,01 mg kg^{-1} e proíbe o uso de certos agrotóxicos com elevada toxicidade na produção de fórmulas infantis.

A Tabela 2 fornece uma breve visão geral da legislação de resíduos de agrotóxicos em amostra de couve de acordo com a legislação brasileira e os

organismos internacionais responsáveis pela manutenção da segurança do alimento.

Os países que exportam alimentos são obrigados a aderir aos limites de tolerância aos agrotóxicos dos países importadores. Assim pode se observar através da Tabela 2 a necessidade de uma adequação na legislação brasileira quanto aos princípios ativos utilizados e regulamentados em outros países, facilitando assim a exportação dos alimentos cultivados no país.

A ausência de legislação de agrotóxicos para as culturas com suporte fitossanitário insuficiente, como a couve, é consequência do desinteresse das empresas produtoras de agrotóxicos em registrar produtos para essas culturas de menor representatividade no mercado, pois há um custo para a inclusão de cultura nas recomendações de agrotóxicos, já que é necessária a execução de estudos de eficiência agronômica e de resíduos que permitem definir o LMR para cada inclusão (MAPA/ANVISA/IBAMA, 2015).

Tabela 2 - Limites máximos de resíduos de agrotóxicos para couve, em mg kg^{-1}

Agrotóxicos em estudo	União Europeia	ANVISA
Acefato	0,01	0,5
Azoxistrobina	6	
Bifentrina	0,05	0,02
Captan	0,02	
Carbendazim	0,1	
Carbofuran	0,002	
Carbossulfan	0,01	
Cimoxanil	0,05	
Clorantraniliprole	20	
Clorotalonil	0,01	
Clorpirifós	0,05	
B-Ciflutrina	0,3	
2,4-D	0,05	
Deltametrina	0,5	0,1
Dimetoato	0,02	
Difenoconazol	2	
Fempropatrina	0,01	
Fenoxaprope	0,1	
Fentoato		
Fipronil	0,005	
Fluazifope-p-butílico	0,2	
Flutrifol	0,01	
Imidacloprido	0,3	2
Metalaxil-M	0,2	
Metribuzin	0,1	
Permetrina	0,05	0,1
Pimetrozina	0,2	
Piraclostrobina	1,5	
Pirimetanil	0,01	
Procimidona	0,01	
Tebuconazol	0,02	
Teflutrina	0,05	
Tetraconazol	0,02	
Tiametoxam	0,2	
Tiofanato metílico	0,1	
Triazofós	0,01	

4.3 Agrotóxicos

A legislação brasileira adotou e definiu o termo agrotóxico (BRASIL, 2002). Este termo engloba as diferentes categorias de uso: inseticidas, acaricidas, nematicidas, fungicidas, bactericidas e herbicidas, uma vez que os agrotóxicos variam em identidade, propriedades físicas e químicas (TADEO *et al*., 2008). Agrotóxicos são 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 (BRASIL, 2002).

Os agrotóxicos são classificados como agrotóxicos de contato (não sistêmicos) e sistêmicos. Os agrotóxicos de contato são aqueles que não penetram de forma sensível nos tecidos das plantas e consequentemente não são transportados dentro do sistema vascular da planta. Os agrotóxicos sistêmicos são aqueles que efetivamente penetram os tecidos vegetais e se movem através do sistema vascular da planta a fim de produzir o efeito desejado (TANO, 2011).

A OMS recomenda uma classificação de agrotóxicos de acordo com a toxicidade, onde foram avaliadas toxicidades agudas orais ou dérmicas em ratos. Como uma classe, os inseticidas foram considerados os mais agudamente tóxicos (IPCS, 2005).

4.3.1 Inseticidas

Os cultivos agrícolas podem ser afetados por uma variedade de insetos causando sérios danos as plantas e consequentemente reduzindo a produtividade. Inseticidas são comumente utilizados para controle de pestes nas lavouras, também são utilizados em gado e animais domésticos e previnem a transmissão de doenças por insetos. No entanto, as exposições a inseticidas também podem ter efeitos adversos fora do alvo incluindo neurotoxicidade (ABREU-VILLAÇA e LEVIN, 2017).

Os inseticidas devem ser tóxicos para matar espécies-alvo de insetos. No entanto, eles também têm efeitos tóxicos fora do alvo que podem prejudicar outras espécies, incluindo os seres humanos. Nas últimas sete décadas, várias classes de inseticidas foram desenvolvidas, cada uma com seus próprios mecanismos de efeito e efeitos colaterais tóxicos (ABREU-VILLAÇA e LEVIN, 2017).

Em muitos agrotóxicos o alvo é sistema nervoso de insetos, devido à semelhança dos processos neuroquímicos em humanos, estes compostos também são suscetíveis de serem neurotóxicos para os seres humanos. Esta preocupação é particularmente relevante em cérebros humanos em desenvolvimento, que é inerentemente muito mais vulnerável a lesões causadas por agentes tóxicos do que o cérebro de adultos (BJØRLING-POULSEN *et al*., 2008).

4.3.1.1Organofosforados

O termo "organofosforados" é utilizado para uma grande variedade de produtos químicos que são derivados de ácidos fosfórico, fosfônico e fosfínico. Estes compostos foram utilizados inicialmente como inseticidas e agentes de guerra química no início do século XX (CAN, 2014).

Os compostos organofosforados foram sintetizados pela primeira vez nos anos 1800, no entanto, foi apenas no final de 1930 que o químico alemão Gerhard Schrader, enquanto trabalhava na Bayer, descobriu a estrutura química geral dos compostos organofosforados (CASIDA e QUISTAD, 1998; ABREU-VILLAÇA e LEVIN, 2017). Após a Segunda Guerra Mundial, o uso de organofosforados aumentou rapidamente, com o desenvolvimento de inseticidas sintéticos que efetivamente mataram insetos de forma eficiente. Desde então, centenas de organosfosforados foram sintetizados e comercializados em todo o mundo. Uma vantagem dos organofosforados quando comparados aos organoclorados é o fato de que os organofosforados não são bioacumulados. Os organofosforados foram os primeiros inseticidas sintéticos rapidamente biodegradáveis (CASIDA e DURKIN, 2013). A proibição dos compostos organoclorados nos anos 60 levou a um aumento no uso de organofosforados tanto para controle de insetos domésticos quanto uso agrícola.

A diversidade de tipos de inseticidas organofosforados os torna o grupo mais versátil, estes compostos possuem um amplo espectro e outros com ação muito específica que podem ter atividade como inseticidas sistêmicos para plantas, sementes e tratamentos do solo, bem como para animais. Em geral, eles são solúveis em água e se dissipam no solo dentro de algumas semanas após a aplicação. Devido à sua baixa persistência e alta eficácia, estes compostos são amplamente utilizados como inseticidas sistêmicos para plantas, animais e tratamentos no solo (TADEO *et al.*, 2008).

Os organosfosforados inibem irreversivelmente a acetilcolinesterase, a enzima que catalisa a decomposição da acetilcolina em acetato e colina, tanto em insetos quanto em organismos não-alvo do sistema nervoso. Quando inseticidas organofosforados estão presentes, a acetilcolinesterase é fosforilada e nesta forma não é mais hidrolisável em colina e ácido acético. O acúmulo de acetilcolina endógena é responsável pelos sinais e sintomas típicos (como efeitos muscarínicos nicotínicos) que ocorrem após a intoxicação aguda (síndrome de hiperestimulação colinérgica) (SANCHEZ-SANTED *et al.,* 2016).

Em seres humanos e outros mamíferos o envenenamento agudo resulta na acumulação de acetilcolina levando a sinais periféricos tais como aumento da sudorese salivação, broncoconstrição, miose, aumento da motilidade gastrointestinal, tremores; e efeitos no sistema nervoso central tais como tonturas, confusão e, eventualmente, convulsões e morte (COSTA, 2008; ABREU-VILLAÇA e LEVIN, 2017). É de grande importância o desenvolvimento de métodos analíticos precisos e confiáveis para análise de rotina a fim de evitar seus efeitos descontrolados sobre a poluição ambiental e a saúde humana (WANG, 2003).

4.3.1.2Piretróides

São compostos constituídos de duas estruturas básicas, um ácido e um álcool. A primeira geração de piretróides é composta de uma porção ácida, derivada do ácido crisantêmico, um anel de ciclopropano ligado a uma porção de ácido carboxílico e uma variedade de substituintes halogenados e não halogenados. Os piretróides contêm várias características comuns: uma porção ácida, um éster

central e uma porção de álcool, que se organizam em estereoisômeros de cada composto piretróide (USEPA, 2011).

Os piretróides sintéticos são um grupo de inseticidas amplamente utilizados na agricultura e saúde pública devido à sua toxicidade relativamente baixa para o homem e as espécies de mamíferos e devido à sua curta persistência ambiental (SHAFER *et al.,* 2005). O mecanismo de toxicidade dos piretróides e piretrinas está relacionado com as características estruturais comuns como a capacidade de interagir com os canais de sódio, resultando em perturbações da excitabilidade da membrana no sistema nervoso, caracterizado por duas síndromes de toxicidade diferentes (USEPA, 2011). Assim como nos insetos, os piretróides exercem nos vertebrados um efeito significativo sobre os canais de sódio, interferindo na sua abertura e fechamento, prolongando o tempo de entrada dos íons sódio para o interior da célula. Piretróides atuam nos nervos de insetos e animais superiores, induzindo um aumento transitório na permeabilidade do sódio da membrana da célula nervosa durante a excitação. Esta ação resulta em impulsos elétricos relativamente curtos e repetitivos em fibras nervosas sensoriais (CASIDA e DURKIN, 2013).

Vários piretróides têm um substituinte ciano ligado ao α-metileno do álcool, o que resulta em compostos de maior toxicidade. Os piretróides sem o substituinte α-ciano são geralmente denominados compostos tipo I e os piretróides com o substituinte α-ciano são geralmente denominado compostos tipo II (SHAFER *et al.,* 2005; WHO, 2005). Os piretróides sem um grupo alfa-ciano (tipo I) causam uma aumento da permeabilidade do canal de sódio na membrana do nervo, enquanto piretróides α-ciano (tipo II) causam um aumento de longa duração na permeabilidade de sódio da membrana nervosa durante excitação (WHO, 2005).

Os principais sintomas de intoxicação por compostos do tipo I são tremores, hiperexcitações, ataxia, convulsões e, nos casos mais graves e paralisia. Os compostos de tipo II causam principalmente hipersalivação, hipersensibilidade a estímulos externos, coreoatetose e paralisia.

Após a absorção, os piretróides são rapidamente metabolizados por espécies de mamíferos em seus ácidos inativos e componentes de álcool, que são excretados principalmente na urina (WHO, 2005). No entanto, de acordo com Abreu-Villaça e

Levin (2017), uma vez que os efeitos deletérios são identificados muito tempo após a exposição, mesmo a biotransformação em metabolitos não tóxicos e a ausência de uma bioacumulação significativa não garante a segurança a organismos não alvo.

4.3.1.3Carbamatos

Os inseticidas carbamatos são muito populares em todo o mundo, devido a pouca persistência quando comparados com organoclorados e organofosforados. Desde a década de 40, os derivados do ácido carbâmico, têm sido amplamente utilizados como fungicidas em todo o mundo. Durante a metade do século XIX, o primeiro carbamato foi extraído dos feijões Calabar (*Physostigma venenosum*) comumente encontrados na África Ocidental, porém somente a partir da década de 1960 que dezenas de carbamatos (ésteres de ácido carbâmico) foram sintetizados para uso como agrotóxicos (GUPTA, 2005).

Semelhante aos organofosforados, o modo primário de ação dos carbamatos em insetos e organismos não alvo é a inibição da enzima acetilcolinesterase, que resulta na acumulação de acetilcolina nas sinapses no sistema nervoso e toxicidade aguda. No entanto, a inibição provocada por carbamatos é rapidamente reversível e, como resultado, a intoxicação por carbamatos tende a ser menos grave do que a induzida por organofosforados (VALE e LOTTI, 2015).

A maioria dos carbamatos é facilmente absorvida após exposição oral, respiratória e entérica. Os carbamatos também podem ser absorvidos através da pele, embora a taxa de absorção seja relativamente lenta. Sendo lipofílicos, os níveis máximos destes compostos são normalmente encontrados no tecido adiposo e no cérebro. Os carbamatos são geralmente metabolizados no fígado em metabolitos menos tóxicos ou não tóxicos, no entanto, alguns dos metabolitos dos carbamatos são bastante tóxicos (GUPTA, 2005).

4.3.1.4Neonicotinoides

Entre as principais classes de inseticidas, a classe dos neocotinoides é a menos estudada, visto que foi o mais recente introduzido no mercado. Desenvolvidos para substituir organofosforados e carbamatos, os neonicotinoides

são inseticidas de amplo espectro, o que contribuiu para sua introdução bem sucedida no mercado.

O primeiro neonicotinóide lançado foi o imidacloprido em 1991 (BASS *et al*., 2015). Neonicotinoides foram desenvolvidos com a finalidade de serem específicos para insetos, no entanto neurotoxicidade em vertebrados em desenvolvimento tem sido relatada. Particularmente preocupante é o fato de que os neonicotinoides são incorporados nas estruturas das plantas o que apresenta um problema, uma vez que não podem ser removidos antes do consumo, como inseticidas de contato (ABREU-VILLAÇA e LEVIN, 2017).

4.3.2 Herbicidas

Os herbicidas foram os agrotóxicos mais intensamente utilizados (mais de 50 % do total), seguidos pelos inseticidas, fungicidas e acaricidas. Uma das principais preocupações sobre o uso de herbicidas se deve a sua toxicidade sobre organismos não alvo. Os herbicidas totais podem matar toda a vegetação, enquanto os herbicidas seletivos podem controlar as ervas daninhas sem afetar a cultura. Estas substâncias químicas podem ser aplicadas em diferentes estágios da cultura, tais como pré ou pós-emergência, e estes diferentes tratamentos serão utilizados dependendo da erva daninha necessária para ser controlada numa determinada cultura (JURADO *et al.*, 2011).

A maioria dos herbicidas recentemente desenvolvidos tem baixa toxicidade para mamíferos, em muitos casos, devido ao fato destes compostos interferirem com rotas bioquímicas inexistentes neles, como a fotossíntese, a biossíntese de aminoácidos essenciais ou de clorofila (SHANER, 2003; JURADO *et al*., 2011).

4.3.3 Fungicidas

Grande parte dos primeiros fungicidas desenvolvidos foi baseada em componentes inorgânicos como enxofre, cal, cobre e mercúrio. Subsequentemente, muitos compostos foram desenvolvidos e utilizados para controlar doenças fúngicas em plantas, sementes e produtos (CORREIA *et al.*, 2015).

A fim de estabelecer uma regulamentação adequada para o uso de muitas substâncias fungicidas comercializadas pela indústria na agricultura sustentável, os

modos de ação fungicida e os efeitos colaterais indesejáveis sobre microrganismos não fúngicos devem ser urgentemente esclarecidos.

Os modos de ação fungicida nunca foram bem classificados, sendo os efeitos colaterais destes compostos não totalmente compreendidos. A multiplicidade de ações dos fungicidas aumenta a dificuldade de avaliar os riscos associados ao uso deles que pode impactar negativamente de forma aleatória os vegetais e o ambiente (YANG *et al.*, 2011).

Embora diversos agrotóxicos atuais não sejam altamente persistentes, o principal problema é que vários agricultores não seguem as boas práticas agrícolas e utilizam em uma concentração maior do que o recomendado, ou não aguardam o intervalo de segurança. Para assegurar o cumprimento das legislações em vigor e para monitorar a presença destas substâncias nocivas em materiais comestíveis, um elevado número de pesquisas se concentra no desenvolvimento de métodos robustos que permitam a determinação de concentração de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentares (HERRERA-HERRERA, 2016).

4.4 Técnicas de preparo de amostras

O desenvolvimento, a otimização e a validação de métodos analíticos são elementos essenciais para garantir a confiabilidade analítica na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (SANTE, 2015; FAO, 2009).

Os métodos analíticos para a determinação de resíduos de agrotóxicos envolvem várias etapas de extração e limpeza para extrair os analitos e remover os compostos potencialmente interferentes que estão presentes em concentrações mais elevadas do que os resíduos de agrotóxicos. Extração em fase sólida (SPE); extração sólido-líquido (SLE); extração assistida por ultrassom (MAE); microextração em fase sólida (SPME); extração sortiva com barra de agitação (SBSE); QuEChERS; dispersão da matriz em fase sólida (MSPD); entre outros, têm sido propostos para a extração de agrotóxicos (SHENCK e LEHOTAY, 2000; LAGUNAS-ALLUÉ *et al*.,2012; GOMEZ-RÍOZ *et al*., 2017;).

Nos últimos anos tem havido uma tendência ao uso de métodos que utilizem menor quantidade de amostra, que respeitem ao meio ambiente, mais seguros, mais rápidos e menos trabalhosos (CORREIA *et al.*, 2015).

4.4.1 MSPD

A MSPD foi introduzida por Barker em 1989, para isolamento de agrotóxicos e medicamentos em suínos. Esta técnica tem sido aplicada em amostras sólidas (ALBERO *et al*., 2017; LI *et al*., 2017a), semi-sólidas (HERCEGOVÁ *et al*., 2006) e líquidas (BARFI *et al*., 2013; RADIŠIĆ *et al*., 2009) para a extração de uma variedade de analitos, como agrotóxicos, espécies de mercúrio, produtos de cuidado pessoal, dioxinas e bifenilas policloradas em diferentes matrizes, alimentos, biota e amostras ambientais (CALDAS *et al*., 2013; DUARTE *et al.*, 2013; HERTZOG *et al*., 2015; CARRO *et al*., 2017; ENRÍQUEZ-GABEIRAS *et al*., 2012; ALBERO *et al*., 2017)). A possibilidade de realizar extração e limpeza ao mesmo tempo, reduzindo a contaminação da amostra durante o processo torna a MSPD uma técnica bastante atrativa.

A MSPD é amplamente aceita, relativamente barata, ambientalmente amigável e simples comparada a outras técnicas convencionais. A simplificação do procedimento analítico e a redução da manipulação da amostra são determinantes para minimizar o risco de perda e/ou contaminação do analito, bem como a exposição do analista a produtos químicos tóxicos, eliminando a necessidade de realizar operações tipicamente associadas à análise de matrizes sólidas e/ou complexas, como a homogeneização completa da amostra, precipitação de seus componentes e ajuste de pH (CAO, *et al*., 2016; LOZOWICKA *et al*., 2016; RAMOS, 2012).

Na sua concepção original, a mistura de um material de suporte sólido de fase ligada (C18) com uma amostra biológica é vista como um abrasivo, produzindo forças de trituração e cisalhamento que induzem a ruptura da estrutura da amostra e com um solvente que auxilia na realização da interrupção e dispersão da amostra completa. Deste modo, a amostra é dispersa sobre a superfície do suporte, produzindo, através de interações hidrofóbicas e hidrofílicas dos vários componentes, uma fase única de caráter misto com a finalidade de facilitar a extração e isolar de analito (BARKER *et al*., 1989, BARKER e LONG, 1993b).

Na MSPD, a matriz é completamente dispersa na superfície do sorvente, o que resulta no aumento da área superficial da amostra exposta ao solvente de

extração. Considera-se que toda a amostra, proteínas, lipídios, tecido conjuntivo, etc., são expostos ao solvente. As forças de cisalhamento geradas pelo processo de mistura interrompem a estrutura da amostra e proporcionam um material mais finamente dividido para a extração. Alguns procedimentos utilizam abrasivos que também possuem as propriedades de um agente de secagem, tal como sulfato de sódio anidro ou sílica (BARKER *et al.*, 1993a; BOGIALLI e DI CORCIA, 2007, ZHANG *et al*., 2012). A mistura é tipicamente levada a um almofariz e pistilo de vidro ou de ágata, pois materiais porosos podem conduzir à perda de analito e/ou de amostra.

O material é transferido para uma coluna, geralmente construída a partir de uma seringa, contendo um filtro que retém toda a amostra. A amostra é então comprimida para formar um empacotamento da coluna, um disco de polietileno pode ser colocado sobre o material antes da compressão. Nesta etapa são aplicados os princípios de cromatografia, logo deve-se evitar canais na coluna e não comprimir demais ou compactar o material, esta etapa apresenta alguns inconvenientes como o fato de ser demorado e trabalhoso e, fortemente afetado pelo analista no processo de empacotamento. A adição de solvente à coluna pode ser precedida pela utilização de algum ou todo o solvente para lavar o almofariz e pistilo (CAPRIOTTI *et al.,* 2015; BOGIALLI e DI CORCIA, 2007). Muitos procedimentos MSPD também empregaram co-colunas para melhorar o fracionamento com consequente limpeza de extratos. Um material de co-coluna (Florisil, sílica, alumina, por exemplo) pode ser embalado no fundo do mesmo cartucho, contendo a mistura dispersante/matriz (BOGIALLI e DI CORCIA, 2007).

Na primeira aplicação da MSPD, 0,5 g de músculo suíno foi misturado com uma quantidade apropriada de um suporte sólido abrasivo (C18) num almofariz e pistilo de vidro para produzir um material parcialmente seco, aparentemente homogêneo e fácil de manusear, sendo transferido para uma coluna tipo cartucho de extração em fase sólida. Foram sequencialmente eluídas com quatro solventes com diferentes polaridades (hexano, benzeno, acetato de etila e metanol) a fim de remover os co-extrativos. Vários componentes não identificados atribuídos como componentes da matriz e interferentes foram detectados, demonstrando a necessidade de limpeza dos extratos antes da determinação instrumental. A MSPD

demonstrou viabilidade para o isolamento eficiente de compostos neutros e/ou moderadamente polares de matrizes complexas, porém houve a retenção irreversível de analitos polares na coluna (BARKER *et al.,* 1989; RAMOS, 2012).

De acordo com a definição dada por Barker (2000), apenas os procedimentos que utilizam sílica ou outros sorventes obtidos por modificação química da superfície da sílica como material para a dispersão devem ser referidos como MSPD. Porém, muitos autores nos últimos anos seguiram adotando o termo MSPD, mesmo quando utilizado materiais que não sejam derivados da sílica (CAPRIOTTI *et* al., 2015).

Para romper a estrutura da amostra pode ser usado um misturador mecânico ou moagem com abrasivos, tais como areia, devendo ocorrer um grau de lise celular e que pode ser aumentado pelo uso de uma etapa de sonicação, extrusão ou adição de agentes químicos (BARKER *et al*., 1993a).

De acordo com Barker e colaboradores (1993a), na MSPD o isolamento dos analitos ocorre por uma mistura de mecanismos como partição, adsorção e cromatografia de pares de íons. Estas propriedades são afetadas pelas seguintes variáveis: tipo de suporte sólido utilizado, natureza da matriz, relação entre amostra e suporte sólido, sequência do solvente de eluição, uso de modificadores de matriz, tais como ácidos, bases, sais, quelantes, conservantes ou outros modificadores, utilização de várias combinações de suporte sólido. Seja qual for o mecanismo exato, a seletividade depende estritamente da combinação sorvente/solvente utilizada. A natureza da matriz determina a intensidade das interações analito-matriz, devendo ser mais fortes em amostras sólidas e semi-sólidas do que em líquidos, este parâmetro também afeta a quantidade de interferentes potenciais e a necessidade de limpeza subsequente dos extratos (RAMOS, 2012).

A presença de componentes co-extrativos da matriz no eluato da MSPD a partir de amostras ambientais e alimentares complexas pode resultar na co-eluição dos compostos de interesse com interferentes, causando efeito matriz. O efeito de matriz pode ser evitado, ou pelo menos minimizado, pela incorporação de uma etapa de limpeza extra no preparo de amostra. Na maioria dos casos consiste numa purificação do extrato em um sorvente apropriado.

O MSPD oferece vantagens distintas em relação aos procedimentos clássicos de tratamento de amostras, requer pequenas quantidades de amostra e o consumo

de solventes tóxicos, inflamáveis e dispendiosos é substancialmente reduzido quando comparado com os métodos clássicos de extração, diminui a contaminação ambiental e aumenta a segurança do analista, o protocolo analítico é drasticamente simplificado e encurtado, aumentando o acesso a dados sobre os níveis de resíduos presentes na amostra, é apropriado para uso com muitos tipos diferentes de matrizes que podem conter resíduos de contaminantes químicos, elimina a possibilidade de formação de emulsão e melhora a eficiência de extração dos analitos, uma vez que toda a amostra é exposta ao agente de extração (BOGIALLI e DI CORCIA, 2007). No entanto apresenta como inconveniente a etapa de maceração da amostra, visto que além de laborioso resulta na baixa reprodutibilidade da técnica quando aplicado ensaios interlaboratoriais, visto que a pressão empregada na homogeneização é diferente para cada analista (DÓREA, 2015, CAPRIOTTI *et al*., 2010).

Pode-se observar na revisão da Tabela 3, os trabalhos que utilizam a MSPD para extração de compostos em alimento estão limitados apenas a um grupo de compostos com polaridades semelhantes ou estruturas similares ou a um determinado grupo de matrizes, sendo este o primeiro trabalho que faz o uso da MSPD para extração de multiclasses de agrotóxicos em variados tipos de amostras.

Tabela 3 - Trabalhos empregando MSPD em alimentos.

Matriz	Preparo de amostra	Analito	Suporte sólido	Solvente	Sorvente	Técnica de determinação	Referência
Cenoura, cebola, tomate e alface	UA-MSPD	17 contaminantes emergentes	Florisil, sulfato de magnésio	Acetato de etila:metanol		GC-MS/MS	Albero *et al.,* 2017
Batata, alface, brocoli, abóbora, alho, vagem, algas, funcho e cogumelo	MSPD	Metrafenona	Alumina:sílica	Diclorometano		LC-UV	Li *et al.,* 2017a
Peixe	MSPD	12 agrotóxicos organoclorados e 7 bifenilas policloradas	Alumina	Hexano:dicloro metano	Alumina	GC-MS	Li *et al.,* 2017b
Mexilhão	MSPD	9 bifenilas policloradas	Florisil e sulfato de sódio	Hexano	Florisil	GC-ECD e GC-MS/MS	Carro *et al*., 2017
Beterraba e melaço de beterraba	MSPD	171 agrotóxicos	Florisil	Hexano: acetona	Sulfato de magnésio e silica	GC-MS/MS e LC/MS/MS	Łozowicka *et al*., 2016
Peixe, lula e camarão	VA-MSPD	3 compostos fenólicos halogenados	Florisil e sulfato de sódio	Acetonitrila	C18	GC-MS	Chen *et al.,* 2016

Matriz	Preparo de amostra	Analito	Suporte sólido	Solvente	Sorvente	Técnica de determinação	Referência
Peixe	VA-MSPD	15 medicamentos	Terra diatomácea e sulfato de sódio	Metanol		LC-MS/MS	Hertzog et al., 2015
Peixe	VA-MSPD	Hg^{2+} e CH_3Hg^+	Sílica	HCl diluído		GC-MS	Duarte *et al.,* 2013
Morango, framboesa, cereja, pêssego, damasco, maçã, laranja, e tangerina	MSPD	15 agrotóxicos	Terra diatomácea	Diclorometano		LC-MS/MS	Radišič *et al.,* 2013
Cranberry	MSPD	3 flavonas	C18	Metanol		LC-DAD e LC-MS	Linkevičiūtė *et al*., 2013
Uva	MSPD	8 agrotóxicos	C18	Diclorometano : Acetato de etila	Sílica	GC-MS	Lagunas-Allué *et al*., 2012
Brócolis, couve de Bruxelas, couve-flor e repolho chinês	MSPD	130 agrotóxicos	Florisil	Hexano: acetona	Sulfato de sódio e sílica	GC-ECD/NPD	Łozowicka *et al*., 2012
Óleo de palma	MSPD	7 agrotóxicos	PSA	Acetonitrila		LC-TOF-MS	Sobhanzadeh *et al*., 2011

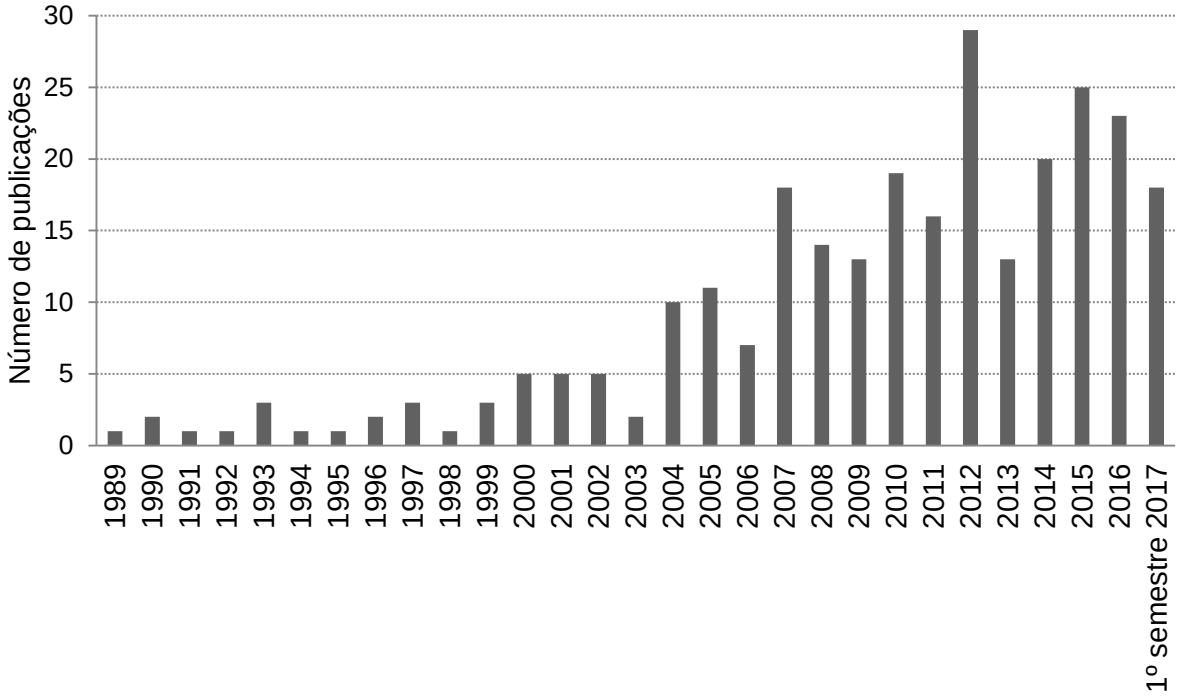
Matriz	Preparo de amostra	Analito	Suporte sólido	Solvente	Sorvente	Técnica de determinação	Referência
Maçã, uva, banana, morango, tomate, repolho, espinafre e colza	MSPD	9 agrotóxicos organofosforados	Nanotubos de carbono	Acetona: Acetato de etila		LC-MS/MS	Guan *et al*., 2011
Manga e mamão	MSPD	7 agrotóxicos	Sílica	Acetato de etila:diclorometano		GC-MS	Navickiene *et al*., 2010
Uva	MSPD	346 agrotóxicos	Sulfato de magnésio e cloreto de sódio	Acetonitrila	PSA	GC-MS	Lian *et al*., 2010
Alface	MSPD	6 agrotóxicos	Sílica	Acetonitrila	Carvão ativado	GC-MS	Silva *et al*., 2010
Azeitona	MSPD	105 agrotóxicos	Aminopropil	Acetonitrila:éter de petróleo	Florisil	LC-MS	Gilbert-López *et al*., 2010
Maçã, batata	MSPD	31 agrotóxicos	Nanotubos de carbono	Acetona: hexano	Sulfato de sódio e Florisil	GC-MS	Fang *et al*., 2009

Matriz	Preparo de amostra	Analito	Suporte sólido	Solvente	Sorvente	Técnica de determinação	Referência
Tomate	UA-MSPD	4 agrotóxicos	Florisil	Acetato de etila	Sulfato de sódio e sílica	GC-ECD	Pinho *et al*., 2009
Maçã, manga, mamão, banana, abacaxi e melão	MSPD	5 agrotóxicos	C18	Acetato de etila	Sílica	GC-ECD	Freitas e Lanças, 2009

UA-MSPD: dispersão da matriz em fase sólida assistida por ultrassom; GC-ECD: cromatografia gasosa acoplada ao detector de captura de elétrons, do inglês *gas chromatogrpahy with electron capture detector*; LC-DAD: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos, do inglês *high pressure liquid chromtography with diode array detector;* LC-TOF-MS: cromatografia líquida acoplada ao detector por tempo de voo, do inglês *liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry*. GC-NPD: cromatografia gasosa acoplada ao detector nitrogênio-fósforo, do inglês *gas chromatogrpahy with nitrogen–phosphorus detector.*

A MSPD tem sido bastante utilizada desde seu desenvolvimento até o presente momento. Pode-se observar pela Figura 2 que é crescente o número de publicações utilizando MSPD no preparo de amostra.

Figura 2 – Número de publicações usando a palavra-chave MSPD, desde o seu desenvolvimento



Fonte: www.scencedirect.com; data da pesquisa 22.06.17.

4.4.1.1Suportes sólidos

O suporte sólido tem o papel abrasivo: as forças de cisalhamento de mistura com um almofariz e pistilo ou outro dispositivo mecânico rompem a parede celular da amostra (BARKER, 2000).

Na MSPD, a natureza dos sorventes é um parâmetro importante que afeta a eficiência da extração, o dispersante é utilizado como não só um suporte sólido para romper e dispersar a amostra, mas também um material que promove a separação por adsorção. No entanto, devido à falta de seletividade dos dispersantes comuns e fraca capacidade de adsorção dos interferentes (C18, sílica, terra diatomácea, alumina e florisil), o maior desafio da MSPD consiste em extrair analitos de amostras complexas (WANG *et al.,* 2014; PENG *et al*., 2016).

4.4.1.1.1Suportes sólidos convencionais

Os materiais inorgânicos de fase normal, como sílica, o Florisil e a alumina, rompem a estrutura da amostra de um modo semelhante aos suportes de fase reversa. Entretanto, os componentes são retidos por adsorção e, assim, a ruptura celular e a interação química dos analitos com a superfície sólida são mais fracas do que aquelas com suportes de fase reversa, como C18, assim a escolha do sorvente e do solvente está interligada, uma vez que a eluição do analito é principalmente governada pela sua solubilidade no solvente utilizado para extração. A mesma consideração aplica-se aos métodos nos quais um suporte sólido inerte é usado como dispersante de matriz (CAPRIOTTI *et al*., 2015).

O primeiro suporte sólido utilizado por Barker (1989) na MSPD foi C18, porém diversos suportes sólidos vem sendo utilizados na MSPD, e cada vez mais tem sido desenvolvidos suportes sólidos poliméricos com diversas formas, como os nanotubos de carbono.

C18 foi o primeiro suporte sólido utilizado na MSPD para dispersão de agrotóxicos da classe dos organofosforados, e medicamentos das classes dos benzimidazóis e B-lactâmicos em tecido suíno (BARKER *et al.*, 1989). Sua performance tornou o C18 um dos suportes sólidos mais utilizado atualmente para remoção de compostos lipofílicos (LI *et al*., 2017a; IPARRAGUIRRE *et al*., 2014; MOLINER-MARTÍNEZ *et al*., 2012).

Em C18, os componentes da amostra distribuem-se sobre a superfície com base nas suas polaridades relativas: os componentes não polares dispersam-se na fase orgânica com base nos seus coeficientes de distribuição. As moléculas mais pequenas e altamente polares se associam com silanóis na superfície e dentro dos poros da partícula de sílica e as moléculas maiores e menos polares distribuem-se através da superfície bifásica (BARKER, 2000).

A sílica pode ser utilizada como sorvente sem modificação química, porém sua utilização com derivação e a ligação de porções orgânicas na sua superfície produzem uma variedade de fases estacionárias com diferentes propriedades de retenção.

A amina primária e secundária (PSA) é um sorvente com capacidade de remoção de diversos componentes tais como ácidos orgânicos, proporciona alta retenção de ácidos graxos livres e outros compostos de matrizes polares, alguns pigmentos polares e açúcares em extratos de frutas e hortaliças (CHENG *et al*., 2017).

Um grande número de sorventes utilizados são feitos a partir de materiais inorgânicos tais como sílica hidratada, Florisil e óxidos metálicos hidratados, tais como óxido de alumínio, óxido de magnésio, óxido de titânio e óxido de zircônio. Estes materiais são muito porosos e possuem têm carácter fortemente polar, sendo a sílica e Florisil comumente utilizados para a retenção de compostos polares. O silicato de magnésio (Florisil) apresenta propriedades intermediárias às da alumina e da sílica.

4.4.1.1.2Suportes sólidos de fontes naturais

Uma outra tendência são os suportes sólidos alternativos, naturais e de baixo custo. A areia e a terra de diatomáceas são capazes de romper a estrutura da amostra com características cromatográficas adequadas, mas a seletividade da MSPD dependerá do solvente selecionado (CAPRIOTTI *et al*., 2015; RAMOS, 2012).

A quitina é um adsorvente utilizado em tratamento de efluentes e remoção de poluentes, é obtida a partir de exoesqueletos de crustáceos após tratamentos de desmineralização e desproteinização. No entanto, uma das limitações na utilização deste biopolímero é a sua insolubilidade em água. A quitosana é o mais importante derivado solúvel em água, sendo obtido pela desacetilação da quitina e é o único polissacárido catiônico natural conhecido (HAMED *et al.,* 2016). A quitina e quitosana são compostos de fonte natural, sendo ainda pouco estudados quanto a sua utilização como suportes sólidos (PENG *et al*., 2016).

O carvão ativo é obtido por oxidação de material orgânico à baixa temperatura. Terras diatomáceas são formadas por esqueletos silicosos de diatomáceas aquáticas transformadas geologicamente em um material poroso.

Dióxido de zircônio é um óxido anfótero em diferentes valores de pH, a sua superfície pode ser um ter um ácido ou uma base de Brönsted, possui capacidade de adsorção foi muito maior do que outros óxidos metálicos (óxido de zircônio e

dióxido de titânio). No pH ácido, a superfície está carregada positivamente se comporta como um ácido, em pH elevado, a superfície é negativo e a zircônia tem uma carga carácter básico. Estudos sobre a adsorção de ácido cítrico sugere a grande importância da interação eletrostática com um mecanismo de adsorção. A adsorção também é mais forte quando a molécula contém uma ligação dupla ou um grupo hidroxila na posição α (LOZANO *et al*., 2014).

A areia é um suporte sólido com composição mista, variando dependendo da sua origem. Tendo sido utilizada desde 1996 por Viana, Moltó e Font em diversas matrizes vegetais para extração de 9 agrotóxicos.

Diversos trabalhos que empregam areia na MSPD utilizam a obtida comercialmente, composta majoritariamente por sílica, no entanto, poucos trabalhos descrevem o uso de areia coletada na praia, sem composição definida e sem etapa de purificação (TEIXEIRA e COSTA, 2005; TEIXEIRA *et al*., 2006; MANHITA *et al*., 2006). A Tabela 3 apresenta trabalhos da literatura que utilizam areia como suporte sólido na MSPD. Estudos empregando areia, coletada na praia, na MSPD para extração de multiclasses de agrotóxicos em amostras complexas são inexistentes. Pode-se observar que são utilizados variados tamanhos de partícula de areia, de 0,06 a 0,85 mm para extração em matrizes de origem vegetal, animal, cosméticos e alimentos.

Tabela 4 - Revisão bibliográfica dos métodos empregando MSPD com areia como suporte sólido.

Método	Analitos	Matriz	Granulometria areia	Agente secante ou dispersante	Ref.
MSPD	Parabenos	Moluscos	0,210-0,297 mm	-	Villaverde-de-Sáa *et al*., 2016
MSPD	Óleos essenciais	Alho, raíz de gengibre, canela, anis, cominho, alecrim, tomilho, e camomila	0,4–0,6 mm	-	Wianowska e Dawidowicz, 2016
MSPD	Acrilamida	Pães e biscoitos	-	Partículas de sílica molecularmente impressas	Arabi *et al*., 2016
SSDM	Ácidos clorogênicos	Flores de sabugueiro e espinheiro branco, folhas de urtica e erva mate, erva de São João e frutos de café	0,2-0,4 mm	-	Wianowska *et al*., 2015
MSPD	Agrotóxicos	Ovos	-	Na_2SO_4	Hildmann, 2015
MSPD assistida por Soxhlet	Flavonoides	Pólen de abelha	0,65–0,85 mm	-	Ma *et al*., 2015
MSPD	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	Musgo	-	-	Concha-Grana, 2015
μMSPD	Corantes	Produtos de cuidado pessoal	0,200 mm	Na_2SO_4	Guerra *et al*., 2015

Método	Analitos	Matriz	Granulometria areia	Agente secante ou dispersante	Ref.
MSPD	Esteroides	Leite de cabra	-	Polímero molecularmente impresso e Na_2SO_4	Gañán *et al*., 2014
MSPD	Hormônios	Leite de cabra	-	Sílica híbrida mesoporosa e Na_2SO_4	Gañan *et al*. 2014.
SSDM	Óleos essenciais	Pinheiro silvestre	0,080–0,100 mm	-	Dawidowicz *et al*., 2013
MSPD	Antibióticos	Leite de ovelha	0,25–0,30 mm	Na_2SO_4	García-Mayor *et al*., 2012
SSDM	Óleos essenciais	Cipreste italiano	0,080–0,100 mm	-	Dawidowicz *et al*., 2012ª
SSDM	Óleos essenciais	Menta, salvia, manjerona, segurelha, camomila e orégano	0,080–0,100 mm	-	Dawidowicz *et al*., 2012b
MSPD	Corantes	Tomate, pimentão, cenoura e vegetais. Todos continham pimenta e outras especiarias misturadas com açúcar, amido, óleos, páprica, vinagre, alho, sal e outros.	0,25–0,30 mm	Florisil	Enríquez-Gabeiras *et al*., 2012

Método	Analitos	Matriz	Granulometria areia	Agente secante ou dispersante	Ref.
SSDM	Óleos essenciais	Pinheiro silvestre	0,080–0,100 mm	Macerado juntamente com 3 mL de solvente	Dawidowicz e Czapczynska, 2011
MSPD	Fragrâncias	Cosméticos	0,210-0,297 mm	Na_2SO_4	Sanchez-Prado *et al*., 2011
MSPD	Carbamazepina	Tipha spp.	-	-	Dordio *et al*., 2011
MSPD	Metais	Sedimento estuarino	0,062-0,21 mm	-	Martínez-Fernández *et al*., 2011
MSPD	Agrotóxicos	Arroz	-	Alumina	Tsochatzis *et al*., 2010
MSPD	Fenotiazinas	Fígado bovino	0,25-0,3 mm	C18	Quintana, 2010
MSPD	Drogas	Cabelo	-	-	Míguez-Framil *et al*., 2010
MSPD	Carbendazim	Casca de laranja	0,25–0,30 mm	C18	Pozo, Hernández; Quintana, 2010.
MSPD	Antocianinas	Groselha em pó	Areia da praia coletada em Faro Beach, Portugal.	-	Manhita *et al*., 2006
SSDM	Compostos fenólicos: flavonol, cumarina e ácido fenólico	Folhas de figueira *(Ficus carica)*	Areia da praia coletada em Faro Beach, Portugal. ≤1mm	-	Teixeira *et al*., 2006.

Método	Analitos	Matriz	Granulometria areia	Agente secante ou dispersante	Ref.
MSPD	Aminas	Tomate	0,074-0,42 mm	-	Chiacchierini *et al*., 2006
MSPD	Anatoxina-a	Peixe	0,074-0,42 mm	-	Bogialli *et al*., 2006
MSPD	Antibioticos	Leite bovino	0,074-0,42 mm	-	Bogialli *et al*., 2005
SSDM	Flavonas e xantonas	Raíz de laranjeira *M. pomifera*	Areia da praia coletada em Faro Beach, Portugal.	-	Teixeira e Costa, 2005
MSPD	Cafeína	Folhas de chá verde	-	C18	Dawidowicz e Wianowska, 2005
MSPD	Inseticidas carbamatos	Leite bovino	0,074-0,42 mm	-	Bogialli *et al*., 2004a
MSPD	Inseticidas carbamatos	Tomate, espinafre, alface, abóbora, pera e maçã	0,074-0,42 mm	-	Bogialli *et al*., 2004b
MSPD	Etileno Bisditiocarbamato	Amendoa	0,25–0,30 mm	-	Garcinuño *et al*., 2004
MSPD	Aflatoxinas	Amendoim	-	C18	Blesa *et al*., 2003
MSPD	9 Agrotóxicos	Alcachofra, vagem, alface e tomate	-	Florisil	Viana *et al*.,1996

SSDM – sea sand disruption method

As areias utilizadas na MSPD são das marcas Sigma-Aldrich, Fluka, Panreac, Scharlau e Fisher Scientific, a composição consiste em dióxido de silício (SiO_2) com elevado teor de pureza, sendo submetidas a lavagem com ácido e posterior calcinação. Alguns fabricantes informam a possibilidade de haver a presença de alguns elementos como potássio, cálcio e ferro, nas concentrações de até 500, 200 e 200 ppm respectivamente.

4.4.1.2Solventes

A natureza do solvente de eluição é importante para promover a dessorção dos analitos enquanto os demais componentes da matriz devem ficar retidos na sorvente. Os solventes são caracterizados por sua polaridade e força de eluição para um sorvente específico. O processo de partição entre a matriz e o suporte sólido, é um fator importante a ser considerado durante o desenvolvimento do método (RAMOS, 2012).

Na injeção splitless, a expansão do volume de solvente determina o volume máximo de injeção para uma dada condição de temperatura, pressão e volume do insersor. O volume de expansão do solvente deve ser tão pequeno quanto possível para permitir que o volume de injeção elevadas, sem um risco de transbordamento do insersor, o que proporciona uma elevada sensibilidade, sem um potencial de contaminação e ou uma redução de reprodutibilidade (MAŜTOVSKÁ e LEHOTAY, 2004).

Um solvente ideal para análise em cromatografia gasosa de resíduos de multiclasses de agrotóxicos deve ser compatível com: os analitos, com a técnica de preparo de amostra, e análise multirresíduo em cromatografia gasosa, logo a seleção depende de diversos fatores incluindo o tipo de técnica de injeção e polaridade dos analitos, solubilidades dos analitos no solvente, não deve afetar a separação e detecção dos analitos, deve ter baixa toxicidade e inflamabilidade, risco ambiental e custo (MAŜTOVSKÁ e LEHOTAY, 2004).

São utilizados solventes não polares tipicamente n-hexano e diclorometano, para a eluição de analitos não polares. As misturas de acetonitrila, acetona, acetato de etila, metanol e água têm sido utilizadas para a extração de analitos com média e

alta polaridade (RAMOS, 2012). A Tabela 5 apresenta algumas vantagens e desvantagens dos solventes mais utilizados na MSPD.

Tabela 5 - Vantagens e desvantagens de alguns solventes utilizados para extração na MSPD

Solventes	Vantagens	Desvantagens
Acetonitrila	• Extração de uma menor quantidade de interferentes lipofílicos, como ceras, gorduras e pigmentos • Adequada para LC-MS/MS e GC-MS	• Elevada toxicidade • Alto custo • Miscível em água (necessita de etapa para remoção)
Acetona	• Menos tóxico • Maior volatilidade • Menor custo comparado a acetonitrila e acetato de etila	• Miscível em água (necessita de etapa para remoção) • Muito volátil (podendo ocorrer a perda)
Acetato de etila	• Pouco miscível em água (fácil remoção) • Pouco tóxico • Volátil • Extração de compostos com ampla faixa de polaridade	• Co-extração de interferentes
Hexano	• Seletivo para analitos apolares	• Elevada inflamabilidade • Elevada toxicidade

Em termos de custo, acetonitrila é aproximadamente 1,4 a 1,7 vezes mais caro que o acetato de etila e acetona em mesmo grau de pureza (MAŜTOVSKÁ e LEHOTAY, 2004).

4.4.1.3Modificações na MSPD

A extração na MSPD foi inicialmente realizada por extração em fase sólida, porém, a utilização de extração em fase sólida para o isolamento de fármacos, contaminantes ambientais e compostos naturais a partir de tecidos requer homogeneização e remoção de resíduos de tecido antes da aplicação da coluna. A adição de homogeneizados diretamente no topo de uma coluna promove à interrupção do fluxo a partir da obstrução do filtro ou camadas superiores da embalagem da coluna.

Com objetivo de resolver estes problemas, Sebastiá e colaboradores (2010) substituíram a extração em fase sólida por uma extração em fase sólida dispersiva, no qual o cartucho de extração em fase sólida foi substituído por tubo de centrífuga, sendo realizada agitação em vortex. O procedimento tornou mais rápida a eluição, expondo menos os analistas ao solvente orgânico. Esta modificação na técnica foi chamada de dispersão da matriz em fase sólida assistida por vortex (VA-MSPD) por Caldas e colaboradores (2013).

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

Na extração em fase sólida dispersiva (dSPE), realizada na VA-MSPD, são normalmente utilizados vórtex e agitação para auxiliar a extração a aumentar a área de contato e a taxa de transferência de massa entre a amostra e a fase extratora. Mas a centrifugação em alta velocidade é normalmente inevitável em dSPE, que pode ser demorada e levar à co-precipitação de interferentes indesejados e à perda de analitos (ZHU *et al*., 2014).

Ramos e colaboradores (2008) utilizaram pela primeira vez a energia de ultrassom na MSPD visando aumentar o rendimento de extração de agrotóxicos em amostras de frutas. A extração por solventes de compostos orgânicos em plantas é significativamente melhorada utilizando a potência de ultrassom. Os efeitos mecânicos do ultrassom proporcionam uma maior penetração do solvente nos materiais celulares e melhoram a transferência de massa, que combinado a quebra de paredes celulares biológicas, facilitam a extração (PICÓ, 2013). Os efeitos físicos, mecânicos ou químicos de ondas ultrassônicas são capazes de alterar as propriedades dos materiais por meio da geração de pressão, cisalhamento e gradiente de temperatura no meio através do qual se propagam (PICÓ, 2015).

O ultrassom pode transmitir através de qualquer meio elástico e causar uma oscilação das partículas. Quando a oscilação das partículas ocorre em um meio, uma perturbação é causada. Se o distúrbio for periodicamente repetido, ocorrerão ciclos de expansão e compressão através de um meio. Os ciclos de compressão

empurram moléculas juntas, enquanto os ciclos de expansão os separam. Em um líquido, o ciclo de expansão produz pressão negativa que tira as moléculas umas das outras. Se a intensidade do ultrassom é alta o suficiente, o ciclo de expansão pode criar bolhas ou cavidades no líquido que varia dependendo da natureza e da pureza do líquido. Dentro de vários segundos, as bolhas crescem, tornam-se instáveis mecanicamente quando atingem um tamanho específico e entram em contração rápida. O processo pelo qual as bolhas se formam, cresce e sofre colapso implosivo é conhecido como "cavitação" (SEIDI e YAMINI, 2012; PICÓ, 2013). A cavitação acústica em meio líquido gera vários efeitos físicos e químicos. A oscilação e o colapso das bolhas de cavitação, conduzidas a baixas frequências ultra-sônicas (por exemplo, 20 kHz), podem gerar fortes forças de cisalhamento, microjatos, micro-ondas e ondas de choque (YOUSOF *et al.,* 2016).

NA MSPD auxiliada por ultrassom as partículas sólidas são transportadas pelo fluido de alta velocidade, logo a ação da cavitação também altera a viscosidade do fluido, o número de bolhas de nuclaeação e o tamanho das bolhas (HU e ZHENG, 2017).

A extração auxiliada por ultrassom envolve a aplicação de irradiação de ultrassom usando banho ou sonda, para reduzir o tempo e aumentar significativamente a eficiência de extração (CAPRIOTTI *et al.,* 2015).

Quando a cavitação ocorre em um líquido perto de uma superfície sólida, a dinâmica do colapso da cavidade é bastante assimétrica e produz jatos de alta velocidade de líquido. O impacto dos jatos na superfície sólida é muito forte, produzindo superfícies altamente expostas e altamente reativas (SEIDI e YAMINI, 2012).

A Tabela 6 apresenta algumas vantagens e desvantagens da MSPD clássica, assistida por vortex, por sonda de ultrassom e por banho ultrassônico (OZCAN *et al*., 2012).

Tabela 6 - Vantagens e desvantagens da MSPD assistida por vortex, banho ultrassônico e sonda de ultrassom em relação à MSPD original.

	Vantagens	Desvantagens
MSPD original	• Melhor limpeza da amostra, visto que pode utilizar diferentes solventes para promover remoção de interferentes; • Capacidade de concentrar os analitos	• Requer cartuchos de SPE; • Requer maior quantidade de amostra; • Dependendo da matriz pode formar emulsão, dificultando eluição • Menor reprodutibilidade devido a dificuldade de padronização no empacotamento do cartucho
MSPD assistida por vortex	• Assegura maior reprodutibilidade; • Não requer cartuchos de SPE • Menor exposição ao solvente e ao manuseio de amostras, pela substituição do sistema de filtração a vácuo	• Dificuldade para controle da homogeneidade da força orbital
MSPD assistida por sonda de ultrassom	• Regulação precisa da potência fornecida • O fluxo ultrassônico na ponta da sonda é muitas vezes suficiente para proporcionar uma contato entre as fases • Opera com uma variedade de frequências e potências	• Difícil controle preciso de temperatura • Pode produzir espécies radicalares • A cavitação favorece a erosão da ponteira o contaminando o sistema
MSPD assistida por banho ultrassônico	• Favorece a ruptura da amostra, aumentando o rendimento de extração • O campo acústico é distribuído de forma bastante uniforme • A quantidade de energia dissipada do banho no sistema analítico geralmente não é muito grande; • Capacidade de manipular várias amostras simultaneamente	• A quantidade de energia dependerá do tamanho do banho, da espessura da parede e da posição do banho; • Nem todos os banhos de limpeza funcionam na mesma frequência;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu na otimização e validação de um método para determinação de 36 multiclasses de agrotóxicos em amostras de frutas e hortaliças. Para o preparo de amostra foi utilizada a técnica de preparo de amostra MSPD com determinação por GC-MS ou LC-MS/MS. O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), da Escola de Química e Alimentos (EQA), na Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

5.1 Instrumentação

- Balança Analítica modelo FA 2104N, Bioprecisa (Curitiba, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (100 - 1000 µL) (Labmate, Varsóvia, Polônia);
- Agitador Vórtex modelo Certomat® MV-B. Braun. (Bioteck Internacional, Alemmar - Comercial e Industrial S.A., São Paulo, Brasil),
- Sonicador de ponteira modelo QR-500 Eco-Sonics (Indaiatuba, Brasil);
- Cuba de ultrassom Cristófoli (Cristófoli Equipamentos de Biossegurança, Campo Mourão, Brasil);
- Centrífuga de tubos microprocessada modelo Quimis® Q222T (QUIMIS aparelhos científicos, Diadema, Brasil);
- Coluna capilar de sílica fundida de baixa polaridade ZB-5MSi, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e espessura de filme de 0,25 µm (Zebron, Torrance, EUA).
- Aquisição de dados pelo software GC Solution version 2 Shimadzu;
- Cromatógrafo a gás, GC-MS-QP 2010 Plus Shimadzu equipado com injetor split/splitless; auto-injetor AOC-20i, fonte de ionização por elétrons (EI) e filtro de massa quadrupolo (Tokio, Japão);
- Gás hélio para GC, pureza 99,999 %; (White Marthins);
- Gás argônio analítico 5.0 usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS (White Martins, Brasil);

- Sistema de Purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3® Millipore (Millipore, Bedford, USA);
- Cromatógrafo a líquido Alliance Separations modelo 2695 Waters equipado com amostrador automático, bomba quaternária, sistema de desgaseificação, Detector MS, Micromass® Quatro Micro™ API Waters, com fonte API, utilizando o modo de ionização por Eletrospray (ESI), sistema de aquisição de dados através do software Masslynx 4.0 Waters (Milford, USA);
- Coluna analítica Kinetex C18 (3,0 mm × 50 mm i.d., 2,6 µm) Phenomenex (Torrance, EUA);
- Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics (Instruments Ltda., Inchinnan, Escócia).
- Processador de alimentos, modelo Mega Master Plus RI 3170 Walita (Barueri, Brasil);
- Microscópio Eletrônico de Varredura modelo SM 6610 LV Scanning Electron Microscope (Tokio, Japão).

5.2 Reagentes, solventes e materiais

- Acetonitrila, grau HPLC (J.T Baker, Mallinckrodt, Nova Jersey, USA);
- Acetona grau HPLC (J.T Baker, Mallinckrodt, Nova Jersey, USA);
- Hexano grau HPLC (J.T Baker, Mallinckrodt, Nova Jersey, USA);
- Acetato de etila grau HPLC (J.T Baker, Mallinckrodt, Nova Jersey, USA);
- Detergente Extran® neutro (Merck, Rio de Janeiro, Brasil);
- Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 mL;
- Padrões analíticos: acefato, atrazina deuterada, azoxistrobina, bifentrina, B-ciflutrina, captan, carbendazim, carbofurano, carbofurano deuterado, carbossulfano, cimoxanil, clorantraniliprole, clorotalonil, clorpirifós, 2,4-D, deltametrina, difenoconazol, dimetoato, fempropatrina, fenoxaprope-etílico, fipronil, fluazifope-p-butílico, flutriafol, imidacloprido, metribuzim, metalaxil-M, permetrina,

pimetrozina, piraclostrobina, pirimetanil, tebuconazol, tebuconazol deuterado, tetraconazol, tiametoxam, tiametoxam deuterado, tiofanato metílico e trifenilfosfato foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil;

- A pureza dos padrões analíticos foi superior a 99 % para todos os analitos;
- Sorvente amina primária secundária (PSA) 40μm Bondesil (Varian, Santa Clara, USA);
- Florisil 100-200 mesh (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Carvão ativo 100 mesh Darco (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Quitina de casca de camarão (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Sílica 99,8 % (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Quitosana de casca de camarão, de baixa viscosidade (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Alumina neutra 98 % (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil);
- C18 Sepra C18-E, 50 μm (Phenomenex, Torrance, EUA);
- Celite 545 (Synth, Diadema, Brasil);
- Sulfato de magnésio anidro (J.T Baker, Mallinckrodt, Nova Jersey, USA);
- Sulfato de sódio anidro (Synth, Diadema, Brasil);
- Areia coletada na praia de Bojuru, Saão José do Norte – RS;
- Areia coletada na praia do Cassino, Rio Grande- RS;
- Areia coletada na Quitéria, próximo à Lagoa dos Patos- RS

5.3 Seleção das matrizes vegetais

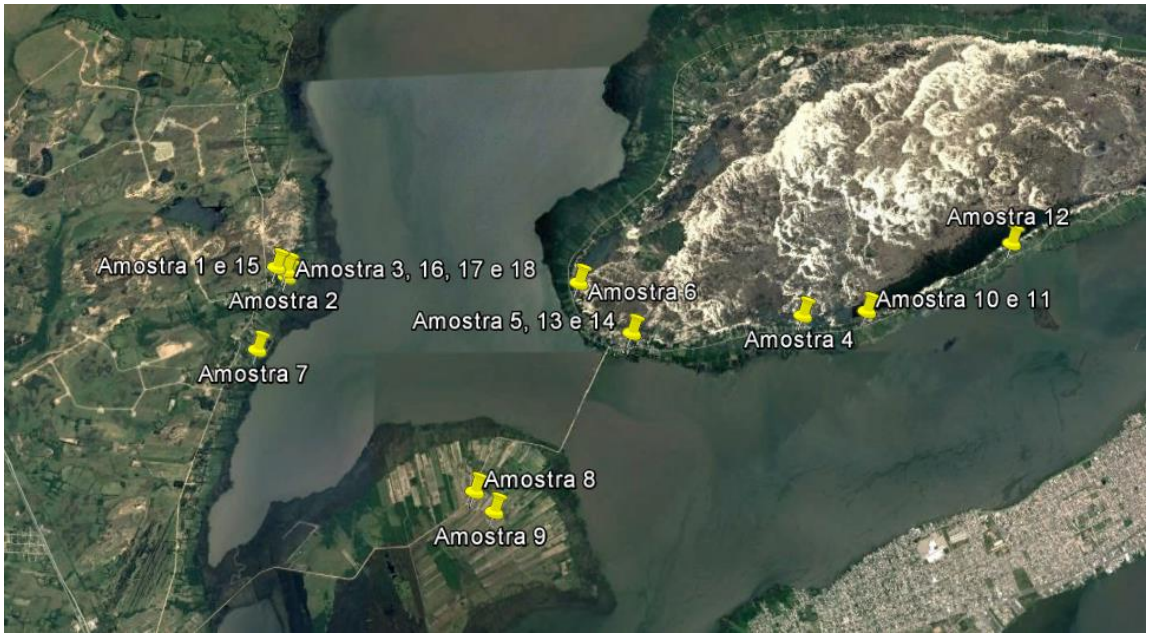
Foi realizada uma entrevista com os agricultores na zona rural do município de Rio Grande-RS, conforme Apendice B. De acordo com a pesquisa foram selecionados os produtores rurais das localidades da Quitéria, Leonídeo e Ilha dos Marinheiros que apresentarm interesse em participar do projeto as seguintes matrizes para estudo: couve, alface, morango, tomate, pimentão, cenoura. Estas matrizes apresentaram maior importância econômica e potencial risco de

contaminação por agrotóxicos, de acordo com Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos, coordenado pela ANVISA (2012). A couve foi escolhida para realizar o desenvolvimento do método por se tratar de matriz cuja complexidade ofereceria maior dificuldade para limpeza do extrato.

5.4 Amostragem das matrizes vegetais

As amostragens foram de acordo com as recomendações de órgãos oficiais (BRASIL, 2012; Codex Alimentarius, 1999; EU, 2002). Foram realizadas 2 saídas de campo para coleta das amostras, sendo adquiridos 1 kg de morango e alface, 2 kg de tomate, pimentão e couve. A Figura 3 apresenta os locais de coleta de amostras.

Figura 3 - Imagem do google *earth* para os pontos de coleta das amostras de morango, tomate, couve, alface e pimentão utilizadas na aplicabilidade (marcados).



Morango: amostras 1 a 7 (morango). Tomate: amostras 8, 9, 18. Couve: amostras 10, 12, 13 e 16. Alface: amostras 11 e 15. Pimentão: amotras 14 e 17.

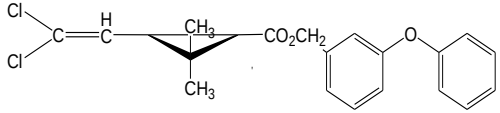
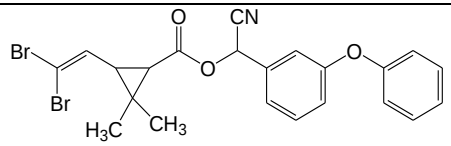
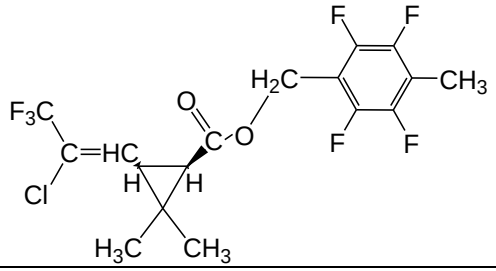
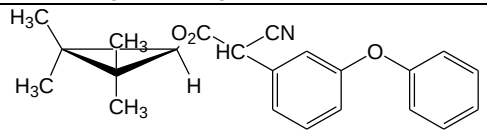
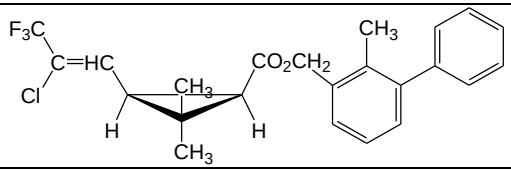
5.5 Processamento prévio da amostra

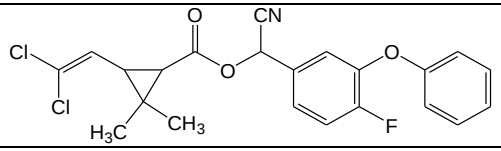
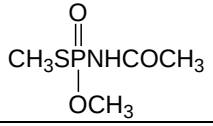
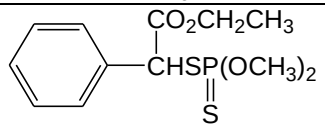
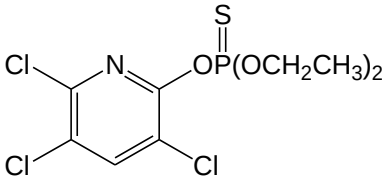
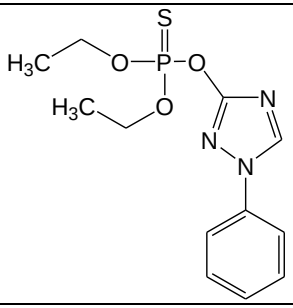
As amostras foram colocadas em sacos de polietileno, rotulados, selados em caixas de isopor contendo gelo. As amostras foram imediatamente enviadas para o laboratório e sendo trituradas e congeladas (SANTE, 2015).

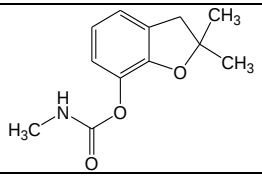
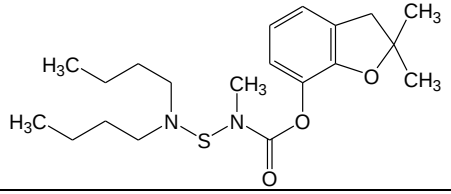
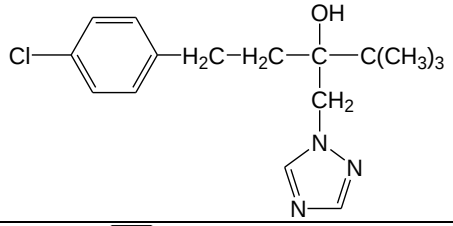
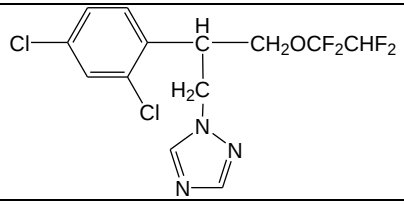
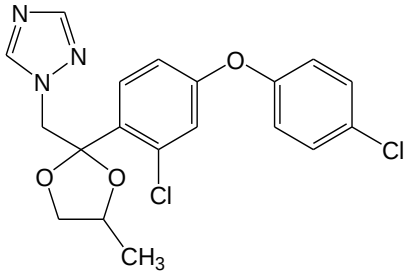
5.6 Seleção dos analitos

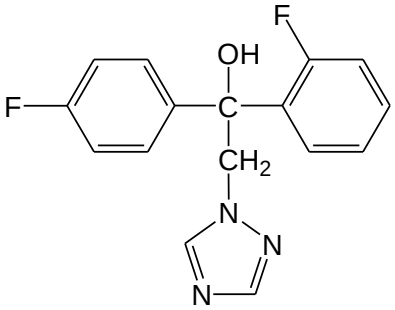
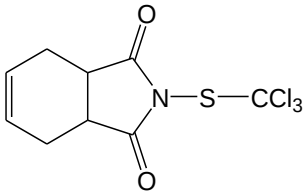
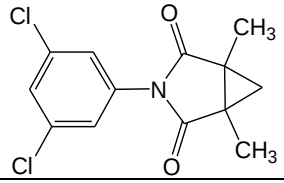
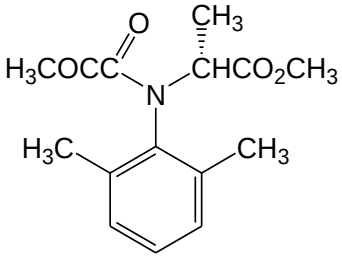
A seleção dos analitos foi realizada por triagem com agricultores da zona rural de Rio Grande, onde os interessados responderam a um questionário sobre quais hortaliças eram produzidas e se utilizavam algum agrotóxico (conforme Apendice B). Assim, foram selecionados os agrotóxicos conforme a Tabela 7, de acordo com a frequência de utilização destes nos cultivos. Os agrotóxicos selecionados apresentam uma ampla faixa de polaridade, expressa pelo log K_{OW}, que relaciona a distribuição de um soluto entre as fases imiscíveis durante a extração. Este parâmetro é importante para descrever o transporte entre água e fases hidrofóbicas (WELLS, 2003).

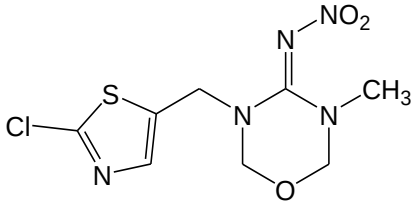
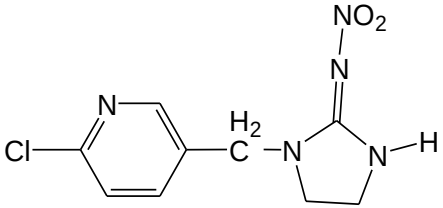
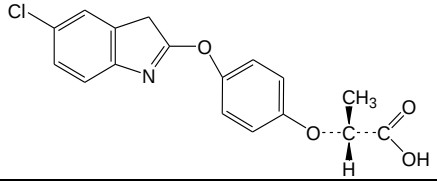
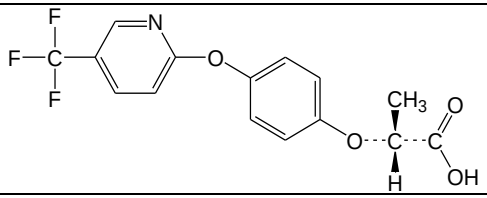
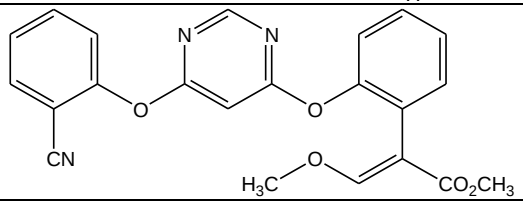
Tabela 7 – Estrutura química, classe, grupo químico, modo de ação, log Kow e número CAS dos agrotóxicos e selecionados para estudo.

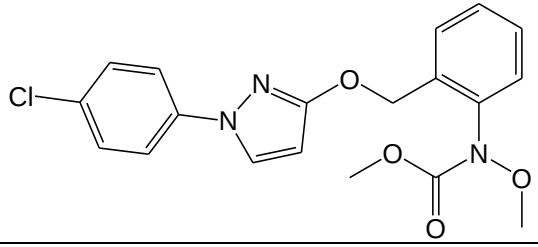
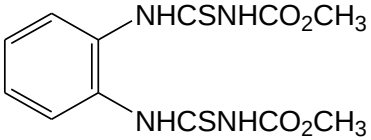
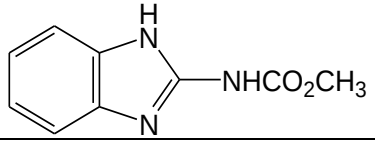
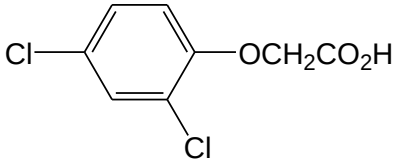
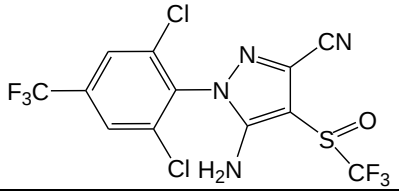
Nome	Estrutura	Classe	Grupo químico	Modo de ação	Log Kow	CAS
Permetrina		Inseticida	Piretróide	Contato	6,1	52645-53-1
Deltametrina		Inseticida	Piretróide	Contato	4,6	52918-63-5
Teflutrina		Inseticida	Piretróide	Contato	6,4	79538-32-2
Fempropatrina		Inseticida	Piretróide	Contato	6,0	64257-84-7
Bifentrina		Inseticida	Piretróide	Contato	>6	82657-04-3

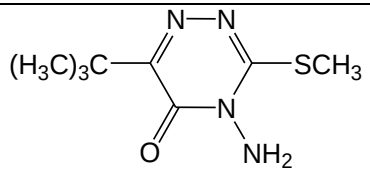
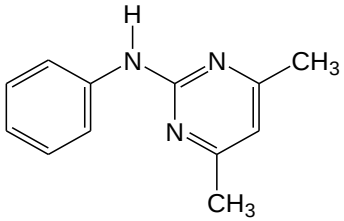
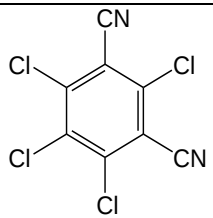
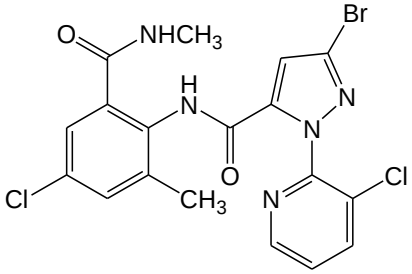
Nome	Estrutura	Classe	Grupo químico	Modo de ação	Log Kow	CAS
B-ciflutrina		Inseticida	Piretróide	Contato	5,9	68359-37-5
Acefato		Herbicida	Piretróide	Sistêmico	-0,89	30560-19-1
Fentoato		Inseticida	Organofosforado	Contato	3,69	2597-03-7
Clorpirifós		Inseticida	Organofosforado	Contato	4,7	2921-88-2
Triazofós		Inseticida	Organofosforado	Contato	3,34	24017-47-8
Dimetoato	$CH_3NHCOCH_2SP(OCH_3)_2$ ‖ S	Inseticida	Organofosforado	Sistêmico	0,704	60-51-5

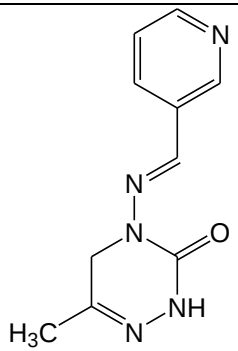
Nome	Estrutura	Classe	Grupo químico	Modo de ação	Log Kow	CAS
Carbofurano		Inseticida	Carbamato	Sistêmico	1,8	1563-66-2
Carbossulfano		Inseticida	Carbamato	Sistêmico	5,4	55285-14-8
Tebuconazol		Fungicida	Triazol	Sistêmico	3,7	107534-96-3
Tetraconazol		Fungicida	Triazol	Sistêmico	3,56	112281-77-3
Difenoconazol		Fungicida	Triazol	Sistêmico	4,36	119446-68-3

Nome	Estrutura	Classe	Grupo químico	Modo de ação	Log Kow	CAS
Flutriafol		Fungicida	Triazol	Sistêmico	2,3	76674-21-0
Captan		Fungicida	Dicarboximida	Contato	2,8	133-06-2
Procimidona		Fungicida	Dicarboximida	Sistêmico	3,3	32809-16-8
Metalaxil		Fungicida	Acilalaninato	Sistêmico	1,71	57837-19-1

Nome	Estrutura	Classe	Grupo químico	Modo de ação	Log Kow	CAS
Tiametoxam		Fungicida	Neonicotinoide	Sistêmico	-0,13	153719-23-4
Imidacloprido		Inseticida	Neonicotinoide	Sistêmico	0,57	138261-41-3
Fenoxaprope-p-etílico		Herbicida	Ácido ariloxifenoxipropiônico	Sistêmico seletivo	4,58	71283-80-2
Fluazifope-P-butilico		Herbicida	Ácido ariloxifenoxipropiônico	Sistêmico Seletivo	4,5	83066-88-0
Azoxistrobina		Fungicida	Estrubilurina	Sistêmico	2,5	131860-33-8

Nome	Estrutura	Classe	Grupo químico	Modo de ação	Log Kow	CAS
Piraclostrobina		Fungicida	Estrubilurina	Sistêmica	3,99	175013-18-0
Tiofanato metílico		Fungicida	Benzimidazol	Sistêmico	1,45	23564-05-8
Carbendazim		Fungicida	Benzimidazol	Sistêmico	1,48	10605-21-7
2,4 - D		Herbicida	Ácido ariloxialcanóico	Sistêmico seletivo	0,04-0,33	94-75-7
Fipronil		Inseticida	Pirazol	Sistêmico	4	120068-37-3

Nome	Estrutura	Classe	Grupo químico	Modo de ação	Log Kow	CAS
Metribuzim		Herbicida	Triazinona	Sistêmico seletivo	1,65	21087-64-9
Pirimetanil		Fungicida	Anilinopirimidina	Sistêmico	2,84	53112-28-0
Clorotalonil		Fungicida	Isoftalonitrila	Contato	2,94	1897-45-6
Clorantraniliprole		Inseticida	Antranilamida	Sistêmico	2,86	500008-45-7

Nome	Estrutura	Classe	Grupo químico	Modo de ação	Log Kow	CAS
Pimetrozina		Inseticida	Piridina azometina	Sistêmico	-0,19	123312-89-0
Cimoxanil	$CH_3CH_2NHCONHCOC(CN)=NOCH_3$	Fungicida	Acetamida	Sistêmico	0,67	57966-95-7

5.7 Preparo das soluções analíticas

As soluções analíticas estoque, contendo 1000 mg L^{-1} de cada composto foram preparadas pela dissolução dos padrões sólidos em acetonitrila, considerando o grau de pureza. As soluções foram armazenadas em frascos âmbar e estocadas a -18 °C.

A partir das soluções estoques de 1000 mg L^{-1} foram preparadas soluções trabalho na concentração de 10 mg L^{-1} de cada substância em acetonitrila ou acetato de etila.

Foram selecionados 27 analitos, para determinação por cromatografia gasosa, sendo estes: azoxistrobina, bifentrina, β-ciflutrina, captan, carbofurano, carbossulfano, clorotalonil, clorpirifós, deltametrina, difenoconazol, dimetoato, fempropatrina, fenoxaprope-etílico, fipronil, fluazifope-p-butílico, flutrifol, metribuzim, metalaxil-M, permetrina, pimetrozina, tebuconazol, tetraconazol, tiametoxam, na concentração de 10 mg L^{-1} foi preparada a partir da solução de 1000 mg L^{-1}. As condições cromatográficas estabelecidas neste trabalho foram desenvolvidas de acordo com trabalho prévio realizado pelo grupo (RODRIGUES *et al*., 2010)

Para determinação por cromatografia líquida, preparou-se uma solução contendo a mistura de 9 padrões analíticos: acefato, 2,4-D, carbendazim, clorantraniliprole, cimoxanil, imidacloprido, piraclostrobina, pirimetanil e tiofanato metílico. Estes padrões não possuem características, como termicamente estáveis ou voláteis, para serem analisados por cromatografia gasosa. Diluições destas soluções trabalho foram preparadas diariamente para o estudo e validação do método.

5.8 Seleção das condições de separação dos analitos no sistema GC-MS

O injetor foi utilizado no modo *splitless* contendo lã de vidro, mais adequado quando os analitos se encontram em concentração em baixas concentrações, sendo volume de injeção de 2 μL Inicialmente foram injetados cada um dos padrões individualmente a fim de verificar quais íons mais estáveis e intensos para cada analito e confirmado pela literatura. Para seleção das melhores condições de separação foram avaliados parâmetros como: programação de temperatura do

forno, temperaturas do injetor, da fonte de íons e da interface. As análises foram realizadas no modo de monitoramento do íon selecionado (SIM).

5.8.1 Programação da temperatura do forno

O controle da temperatura é um parâmetro essencial para obter uma separação cromatográfica dos componentes da amostra em menor tempo de eluição. Portanto a programação de temperatura do forno cromatográfico foi o primeiro parâmetro a ser avaliado neste trabalho. A programação de temperatura ideal do forno foi escolhida de acordo com a separação dos analitos levando em consideração: resolução, fator de retenção e fator de separação, de acordo com Collins (2006), estes parâmetros foram calculados utilizando o software Excel 5.0.

5.8.2 Avaliação das temperaturas do injetor, interface e fonte de íons

Para avaliar a influência da temperatura do injetor na separação, foram testadas as temperaturas de 260 até 320 °C. Para a interface, foram testadas as temperaturas de 280 até 320 °C. E para a fonte de íons, foram testadas as temperaturas de 250 até 300 °C.

5.9 Seleção das condições de separação em LC-MS/MS

A determinação de 9 agrotóxicos foi realizada empregando LC-MS/MS, uma vez que estes compostos tem baixa pressão de vapor, e são mais polares em relação aos demais analitos. O sistema LC-MS/MS foi utilizado no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM), reduzindo problemas de co-eluição, devido a apenas o sinal de interesse estar sendo registrado, essencial para determinação e confirmação dos analitos em baixas concentrações. O volume de injeção utilizado foi de 10 μL.

Os solventes utilizados foram preparados individualmente, filtrados a vácuo através de membranas de nylon 0,45 μm. A água ultrapura e o metanol foram desgaseificados em ultrassom durante 30 min, à temperatura ambiente. Os modos de eluição isocrático e gradiente foram avaliados durante o desenvolvimento da separação cromatográfica.

5.9.1 Condições do espectrômetro de massas

Com a finalidade de obter as condições ótimas dos parâmetros de fragmentação, foram realizadas infusões diretas da solução analítica padrão individual, na concentração de 1 mg L^{-1}, no espectrômetro de massas. Nesta etapa foi selecionado o modo de ionização (eletrospray positiva e/ou negativa), voltagem do capilar, a voltagem do cone para selecionar o íon precursor, a energia de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos; temperatura da fonte de ionização; temperatura e a vazão do gás de dessolvatação para secagem do solvente.

5.10 Seleção das variáveis qualitativas na MSPD

Para seleção dos suportes sólidos, solventes, uso de sais e equipamentos utilizados para melhor extração dos agrotóxicos, foram realizados ensaios univariados de recuperação em triplicata em 3 injeções cada, sendo avaliados pelo teste de Tukey. Os ensaios foram realizados conforme a Figura 4. Foi utilizada 0,5 g de amostra, fortificado com 50 μL de uma mistura de 27 padrões de agrotóxicos 10 mg L^{-1}. As amostras fortificadas foram deixadas em repouso por 1 h, para evaporação do solvente e promover uma maior interação dos agrotóxicos com a amostra, antes da extração. Foi adicionado 1 g de suporte sólido, a mistura foi macerada por 5 minutos e transferida para tubos de centrífuga contendo 1 g de sulfato de sódio e 20 mg de carvão ativado, sendo realizada a adição de 10 mL de solvente, seguido de agitação por 1 minuto em vortex e 5 minutos de centrifugação a 10179 xg.

Figura 4 - Esquema da MSPD avaliada

5.10.1Escolha do suporte sólido

Foram testados suportes sólidos clássicos na MSPD, assim como materiais alternativos oriundos de fontes renováveis. Os suportes sólidos testados na MSPD foram: sílica, C18, PSA, alumina, quitina, quitosana, celite 545, areia da praia de Bojuru - São José do Norte, areia da praia do Cassino-Rio Grande e areia coletada na localizada na Quitéria-Rio Grande, próximo a Lagoa dos Patos. As areias foram lavadas 3 vezes com álcool etílico 96 °GL e 3 vezes com água destilada, e secas por 24 horas em estufa a 100 °C conforme Manhita e colaboradores (2006). A fim de assegurar que as areias utilizadas estivessem livres de contaminação pelos agrotóxicos em estudo, foi realizada MSPD sem amostra, os cromatogramas se encontram no Apêndice A.

5.10.2Escolha do solvente

Para seleção do solvente foram avaliados acetonitrila, hexano, acetona e acetato de etila. Não foram testados solventes halogenados, devido a sua maior toxicidade.

5.10.3Efeito da adição de sais

A utilização de sais foi avaliada sem adição de sal, com adição de 1,0 g de sulfato de sódio e com adição de 1,0 g de sulfato de magnésio juntamente com o suporte sólido selecionado.

5.10.4Modificações da MSPD

A fim de obter um método rápido e flexível foi avaliada na etapa de extração a utilização de vortex, banho ultrassônico e sonda de ultrassom. O vortex foi utilizado por 5 minutos após a adição de solvente, condição estabelecida em trabalhos prévios. O banho ultrassônico, com potência de 170 Watts e 42 kHz de frequência foi utilizado por 10 minutos, conforme Qi et al (2010). A sonda de ultrassom utilizada possui potência de 500 Watts e 20 kHz de frequência ultrassônica foi utilizada conforme Barfi et al. (2013).

5.11 Otimização da MSPD

A partir da escolha das variáveis qualitativas, foi realizado um planejamento experimental completo 2^3, visando otimizar a MSPD para amostra de couve, onde foram avaliadas: a massa de suporte sólido (g), volume de solvente (mL), e massa de carvão ativo (mg) na etapa de limpeza do extrato.

A quantidade de suporte sólido a ser utilizado depende da natureza da amostra. No entanto, para a maioria dos estudos, as razões amostra: suporte sólido variam na proporção de 1:1 a 1:4 (CAPRIOTTI *et al.,* 2015).

Para avaliação da quantidade de suporte sólido, foi mantida a quantidade de 0,5 g de amostra, assim foram mantidas as relações de amostra:suporte sólido de 1:1 (no nível -1), 1:2 (ponto central) e 1:3 (nível +1), conforme Barker (2007) e Capriotti et al. (2015). Os volumes de solvente avaliados foram escolhidos de acordo com a literatura (LOZOWICKA *et al*.,2016; WIANOWSKA e DAWIDOWICZ, 2016; HERTZOG *et al*., 2015). A quantidade de carvão ativo utilizado na etapa de limpeza foi determinada de acordo com os níveis da literatura, buscando reduzir os interferentes e os custos.

Tabela 8 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 + 3 pontos centrais com valores codificados e valores reais (em parênteses).

Ensaio	Areia (g)	Acetato de etila (mL)	Carvão ativo (mg)
1	-1 (0,5)	-1 (5)	-1 (20)
2	1 (1,5)	-1 (5)	-1 (20)
3	-1 (0,5)	1 (15)	-1 (20)
4	1 (1,5)	1 (15)	-1 (20)
5	-1 (0,5)	-1 (5)	1 (100)
6	1 (1,5)	-1 (5)	1 (100)
7	-1 (0,5)	1 (15)	1 (100)
8	1 (1,5)	1 (15)	1 (100)
9	0 (1,0)	0 (10)	0 (60)
10	0 (1,0)	0 (10)	0 (60)
11	0 (1,0)	0 (10)	0 (60)

5.12 Avaliação da eficiência da MSPD utilizando areias coletadas em diferentes locais

Areias coletadas em diferentes locais foram utilizadas na MSPD para avaliar a influência da composição desta nas recuperações dos analitos. A areia coletada nas dunas da praia do Cassino (32º12’35,6”S 52º10’54,6”W) e na localidade da Quitéria (32º0’43,74”S 52º14’36,90”O) ambas na cidade de Rio Grande. A areia da praia de Bojuru foi coletada em local próximo do mar (31º21’59,4” S 51º3’28,1”W). A zona de areia em estudo faz parte das areias das praias holocênicas do sul do Brasil (BARROS *et al*., 2010). A Figura 5 apresenta os 3 locais de coleta de areia utilizada na MSPD.

Figura 5 - Locais de coletas das areias no sul do Brasil

5.13 Efeito da granulometria da areia utilizada na MSPD

A areia da praia de Bojuru foi peneirada de forma a conhecer a granulometria e avaliar o efeito do tamanho de partícula na MSPD. Desta forma foi avaliada a eficiência da MSPD utilizando areia sem peneiramento prévio, areia com tamanho de partícula entre 0,180-0,212 mm e com tamanho de 0,090 a 0,106 mm, tendo em vista a distribuição granulométrica da areia e literatura (ABHLASH *et al*., 2009; BARKER, 2000).

5.14 Caracterização das areias utilizadas na MSPD

A caraterização físico-química deste material foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX). As análises de MEV e EDX foram realizadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura modelo SM 6610 LV Scanning Electron Microscope localizado no Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL) da FURG.

5.15 Validação

O objetivo da validação é uniformizar os procedimentos adotados afim de demonstrar que o método analítico é confiável e adequado. Os métodos foram

validados avaliando as seguintes figuras de mérito: limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), curvas analíticas (calibração externa no solvente, superposição na matriz e curva trabalho) e linearidade, exatidão (recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e efeito matriz de acordo com os guias de validação para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos estabelecidos na Europa e Estados Unidos (SANTE, 2015; FDA 2015; ANVISA, 2003).

Matrizes representativas podem ser utilizadas para validar métodos multirresíduos ou com um único resíduo, com no mínimo, um produto representativo de cada grupo (SANTE, 2015). O método foi validado por grupo representativo, com base na sua composição, frutas, hortaliças folhosas e raízes. O objetivo foi incluir os grupos mais comuns de produtos vegetais com baixo conteúdo lipídico e elevado teor de água. A couve foi selecionada como exemplo de uma hortaliça folhosa, tomate como fruta e cenoura como raíz.

5.15.1Linearidade

A linearidade do instrumento foi avaliada pela construção de curvas analíticas através de padronização externa no solvente e por padronização externa no extrato branco da matriz. A linearidade dos métodos foi avaliada pela curva trabalho, na qual as amostras foram fortificadas em cada nível (0,005-0,2 mg kg^{-1}) com a solução padrão dos analitos, passando então pela etapa de preparo de amostra otimizada e em seguida analisada por GC-MS e LC-MS/MS. Esta curva é aplicada na validação dos métodos e nos cálculos de recuperação.

Para a construção das curvas analíticas e trabalho, foram preparados três conjuntos de soluções:

Conjunto 1 - Soluções preparadas através de diluições da solução padrão de trabalho no solvente;

Conjunto 2 - Soluções preparadas a partir de diluições da solução padrão de trabalho no extrato branco da matriz (couve, tomate e cenoura), extraído pela MSPD (pós fortificação);

Conjunto 3 - Soluções obtidas a partir da extração das amostras de couve, tomate e cenoura fortificadas com a solução padrão de trabalho (pré -fortificação);

Os conjuntos das soluções 1 e 2 foram utilizados para calcular o efeito matriz. O conjunto de soluções 3 foi utilizado para cálculo das recuperações.

Cada solução foi injetada três vezes, e cada curva teve no mínimo 5 níveis de concentração. A regressão linear foi aplicada às áreas não rejeitadas obtendo-se a equação para a curva analítica, sendo avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2) e resíduos dos dados inferiores a 20 %, calculados conforme Kruve e colaboradores (2015).

5.15.2Limite de quantificação

Os limites de quantificação (LOQ) foram estimados pela menor concentração em que cada analito apresentou uma relação sinal/ruído de 10 vezes, calculada pelo software do equipamento.

Os limites instrumentais foram obtidos através de padronização externa no solvente, pelo preparo de soluções analíticas de diferentes concentrações em solvente, enquanto que os limites do método foram obtidos através da curva trabalho (SANTE, 2015).

5.15.3Efeito matriz

O potencial de ocorrência do efeito matriz deve ser avaliado durante o desenvolvimento do método, validação e uso rotineiro, onde devem ser eliminados ou compensados.

O efeito matriz específico deve ser compensado na validação do método, uma vez que, a exatidão e a precisão das análises podem ser influenciadas pela matriz. A avaliação do efeito matriz pode ser realizada pela comparação das curvas de calibração externa no solvente pela sobreposição na matriz (ECONOMOU *et al*., 2009).

O efeito matriz foi calculado pela comparação entre as inclinações das curvas analíticas obtidas das soluções analíticas em solvente com as obtidas com soluções analíticas preparadas no extrato das matrizes de couve, tomate e cenoura. O cálculo foi efetuado através da equação 1:

$$EM(\%)= \frac{\text{inclinação } (X_1)\text{-inclinação } (X_2)}{\text{inclinação}(X_2)} \times 100 \quad (1)$$

onde:

X_1= inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada analito, preparada no extrato da matriz (couve, tomate e cenoura);

X_2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada analito, preparada no solvente (acetato de etila);

Quando os valores encontrados para o efeito matriz estiverem entre -20 e +20 %, considera-se que o efeito matriz é baixo; se estiverem entre -50 e -20 % ou entre +20 e +50 % é considerado médio; e se os valores encontrados forem abaixo de -50 % ou acima de +50 %, o efeito matriz é considerado alto (ECONOMOU *et al*., 2009).

5.15.4Repetibilidade e precisão intermediária

A precisão do método foi avaliada em função da repetibilidade e da precisão intermediária. Para a repetibilidade, as amostras foram fortificadas em 3 níveis de concentração em triplicata e injetadas em triplicata no mesmo dia, pelo mesmo analista e nas mesmas condições, sendo calculado o desvio padrão relativo (RSD) (%). A precisão intermediária foi realizada com a fortificação das amostras em dois níveis de concentração, nas concentrações correspondentes ao LOQ e 10 vezes o LOQ e o procedimento foi avaliado em diferentes dias. Para os cálculos dos RSD (%) utilizou-se a equação 3:

$$RSD(\%) = \frac{s}{Xm} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

Xm = média de uma série de medidas (replicatas).

5.15.5Exatidão

Para o estudo da exatidão do método, foram utilizados ensaios de recuperação, de acordo com as determinações da SANTE (2015). Foram realizadas fortificações das amostras “branco” em diferentes níveis de concentração. As recuperações foram avaliadas em no mínimo três níveis para cada analito, nas concentrações de 1 LOQ, 5 LOQ e 10 LOQ. As extrações referentes a cada nível de

concentração foram realizadas em triplicata e cada extrato foi injetado três vezes no GC-MS e LC-MS/MS.

Para determinar as concentrações, substituiu-se os valores de área encontrados em cada nível na equação da curva trabalho. Para calcular as recuperações, substitui-se os valores de concentração na equação 2:

$$\text{Recuperação } (\%) = \left(\frac{C1-C2}{C3}\right) \times 100 \quad (2)$$

sendo:

C1= concentração do analito na amostra fortificada;

C2= concentração do analito na amostra não fortificada;

C3= concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

Em geral são aceitos intervalos de recuperação entre 70 e 120 % para validação de métodos de análise de resíduos de agrotóxicos. No entanto um intervalo padrão de 60-140 % pode ser usado para recuperações individuais em análises de rotina (SANTE, 2015).

5.15.6Robustez

A robustez de um método analítico avalia a resistência a variações nos resultados quando pequenas diferenças são realizadas nas condições experimentais inicialmente descritas (ANVISA, 2003). No entanto, pode ser avaliada em termos de variabilidade da matriz da amostra: Matrizes diferentes podem levar a diferentes efeitos de matriz (SANTE, 2015, FDA, 2015).

A robustez foi avaliada em métodos multirresíduos através de ensaios de recuperação em diferentes matrizes mas com pigmentos interferentes similares, como tomate e cenoura (SANTE, 2015, FDA, 2015). As frutas e hortaliças foram separadas em 3 grupos de acordo com a sua composição, o tomate representa frutas e hortaliças (morango e pimentão), a couve representa as hortaliças folhosas (alface) e a cenoura representa as raízes e tubérculos. Sendo considerado um método robusto aquele que obteve recuperações entre 70 e 120 %, e RSD inferiores a 20 %, porém em certos casos em análises multirresíduos, recuperações fora deste intervalo podem ser aceitas (SANTE, 2015).

5.15.7Aplicabilidade

Uma vez otimizado o método de análise, o mesmo foi aplicado para determinação de agrotóxicos em amostras de couve, tomate, alface, morango e pimentão coletados com os agricultores que tiveram interesse em participar do projeto, nas localidades da Ilha do Leonídeo, Ilha dos Marinheiros e Quitéria, Rio Grande-RS. As 7 amostras de morango foram coletadas em janeiro de 2017. Foram coletadas 3 amostras de tomate, 4 amostras de couve, 2 amostras de alface e 2 amostras de pimentão em abril de 2017.

6 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1 Avaliação da separação cromatográfica por GC-MS

Os parâmetros: resolução, fator de separação e fator de retenção foram utilizados para avaliar a separação dos analitos. A melhor condição de aquecimento do forno foi obtida quando garantida a separação com menor tempo de eluição.

Um programa de temperatura rápido em cromatografia gasosa resulta em um tempo de análise mais curto, mas é inerentemente acompanhado com perda parcial da eficiência de separação da coluna. A programação da temperatura em cromatografia gasosa é significativamente importante, uma vez que melhora a separação e diminui o tempo de análise (COLLINS, 2006). A temperatura da coluna deve ser suficiente para que o tempo de análise seja curto, porém suficientemente baixa para que a eficiência desejada seja atingida. Para a grande maioria das amostras, quanto menor a temperatura da coluna maior será a razão dos coeficientes de partição na fase estacionária e, como consequência uma melhor separação (LANÇAS, 1993).

A condição inicialmente estudada foi baseada em trabalho anterior do grupo (RODRIGUES *et al*., 2010). A condição selecionada para a programação das temperaturas do forno cromatográfico foi: 70 °C por 1 min; 10 °C min^{-1} até 160 °C; 25 °C min^{-1} até 190 °C; 65 °C min^{-1} até 250 °C; 30 °C min^{-1} até 300 °C por 5 min e fluxo do gás de arraste de 1 mL min^{-1}. Nesta condição foi obtida resolução entre 1,79 e 32,17, superiores a 1,25 que é suficiente para fins quantitativos. O fator de separação para cada um dos analitos foi superior a 1,0, garantindo a separação entre os picos. O fator de retenção obtido para cada analito variaram entre 0,7 a 1,3, sendo aceitáveis valores entre 0,5 e 20 para múltiplos componentes (COLLINS, 2006).

A Tabela 9 apresenta os tempos de retenção para cada analito e os íons característicos mais intensos confirmados pela literatura.

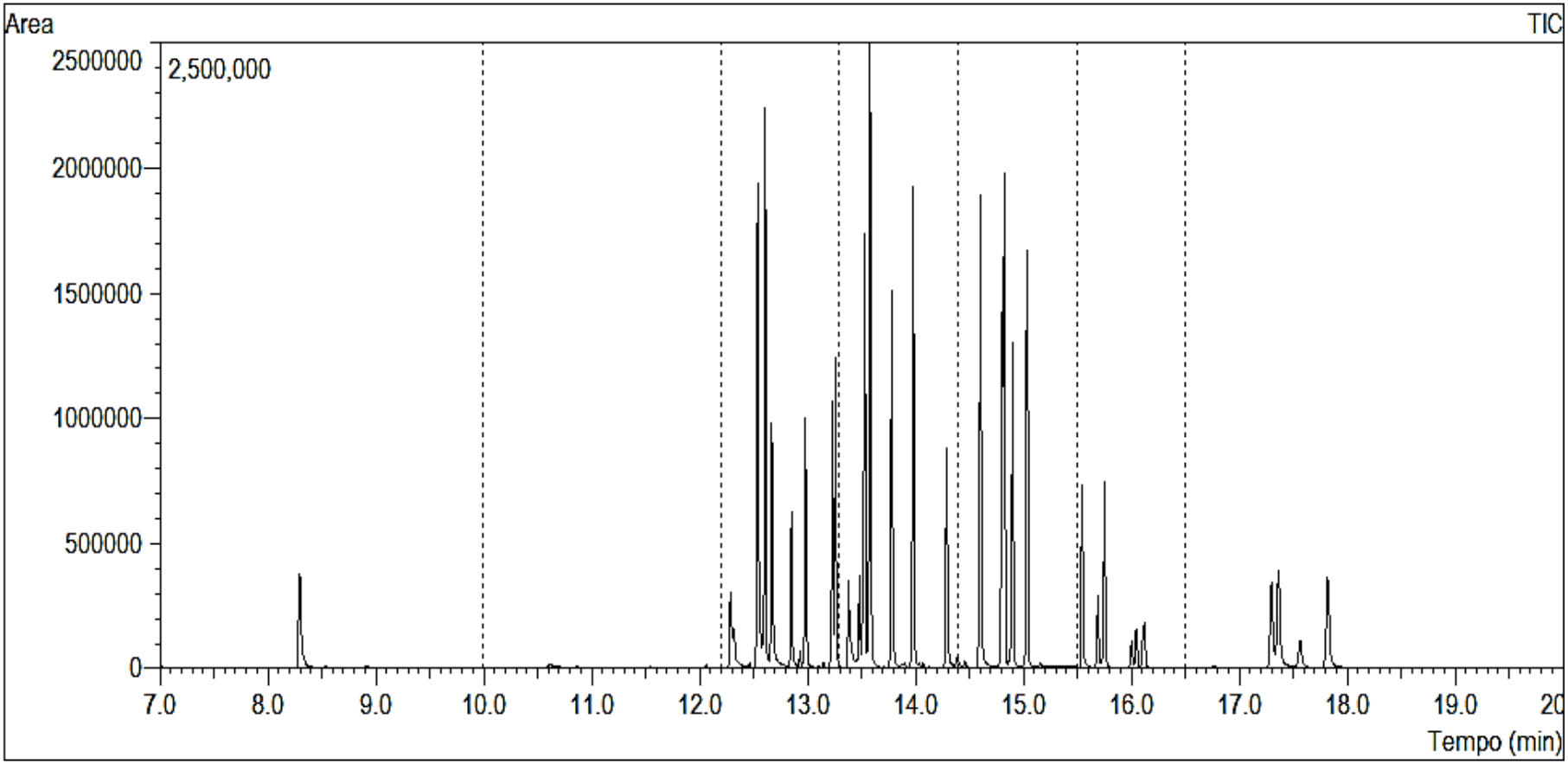
A Figura 6 apresenta o cromatograma dos íons totais para separação dos 27 compostos por GC-MS. Foi possível obter uma separação cromatográfica de 27 compostos em um reduzido tempo de análise de 20 minutos.

Tabela 9 - Analitos, tempo de retenção e íons monitorados por GC-MS

Analitos	t_R (min)	Íons monitorados
Carbofurano	8,15	**164**, 149, 131
Captan	10,93	**151**,79, 80
Dimetoato	12,49	**125**, 87, 93
Pirimetanil	12,74	**198**, 199, 200
Teflutrina	12,80	**177**, 197, 141
Clorotalonil	12,88	**266**, 264, 268
Metribuzim	13,06	**198**, 144, 103
Metalaxil	13,20	**132**, 206, 160
Clorpirifós	13,45	**182**, 97, 197
Tetraconazol	13,46	**336**, 338, 171
Tiametoxam	13,48	**132**, 182, 247
Fipronil	13,70	**367**, 369, 213
Fentoato	13,77	**274**, 125, 93
Flutriafol	13,82	**123**, 219, 164
Fluazifope	14,02	**282**, 383, 254
Triazofós	14,22	**161**, 257, 172
Tebuconazol	14,55	**250**, 125, 252
Procimidona	14,88	**283**, 95, 255
Carbossulfano	15,09	**118**, 160, 57
Bifentrina	15,10	**181**, 141, 115
Fempropatrina	15,18	**97**, 55, 115
Fenoxaprope	15,86	**288**, 361, 261
Permetrina	16,09	**183**, 163, 165
β-ciflutrina	17,47	**163**, 206, 91
Difenoconazol	17,85	**265**, 323, 267
Deltametrina	18,15	**181**, 253, 207
Azoxistrobina	18,45	**344**, 75, 388

Em negrito íons utilizados para quantificação, os demais são para confirmação e monitoramento da integridade do espectro.

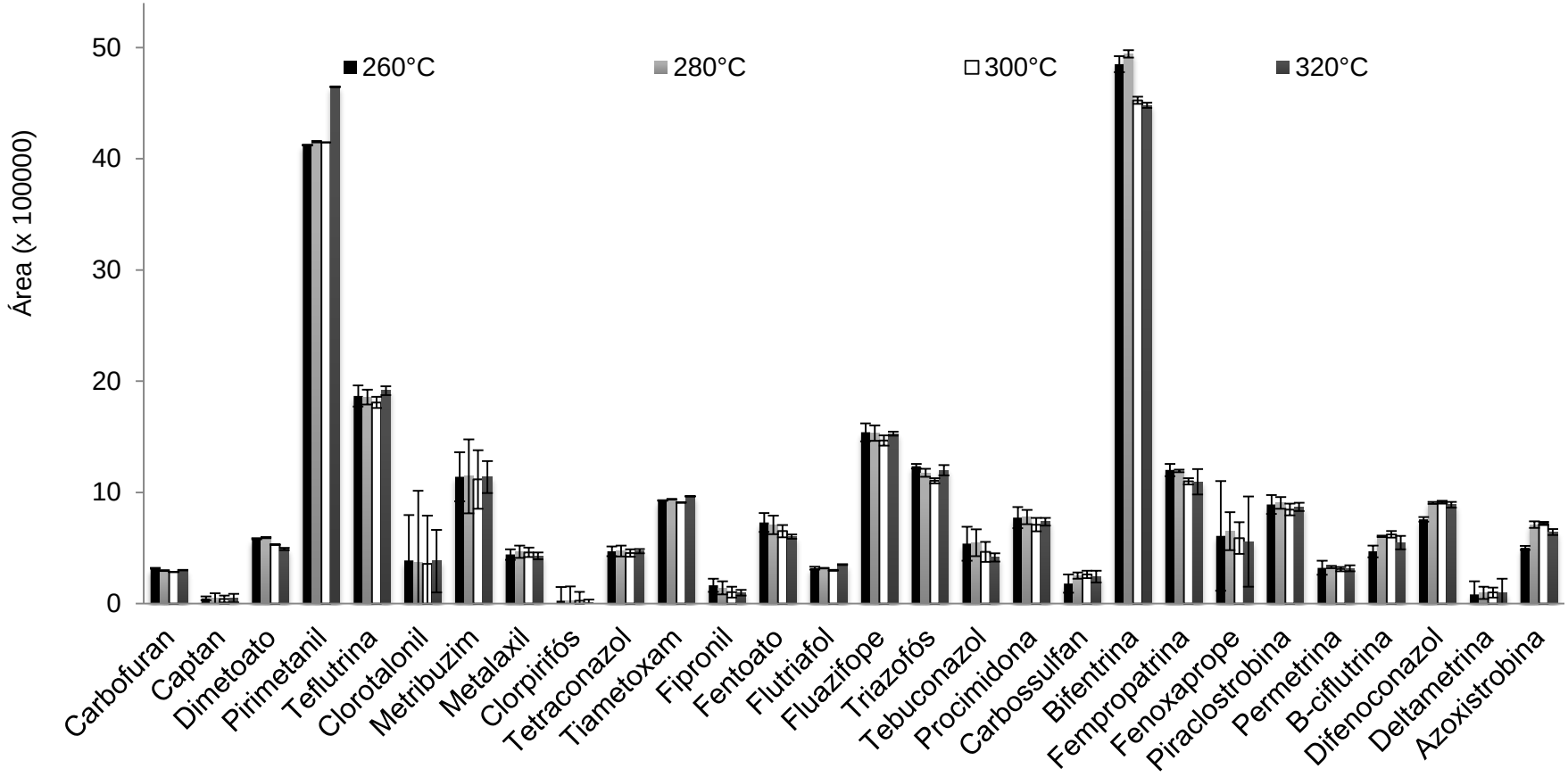
Figura 6 - Cromatograma dos íons totais (TIC) obtido por GC-MS da mistura de 27 agrotóxicos na concentração de 1 mg L^{-1} em acetonitrila



6.2 Seleção dos parâmetros do GC-MS

Assim como a taxa de aquecimento da coluna tem grande influência na separação cromatográfica, o ajuste de temperatura de alguns setores como injetor, coluna e detector, desempenham um papel fundamental na cromatografia gasosa. A câmara de injeção deve estar suficientemente quente para vaporizar rapidamente a amostra, evitando perda da eficiência devido à injeção, mas de tal forma a evitar que haja decomposição térmica ou rearranjos de amostra. Desta forma, foram realizados testes para adequação da temperatura, verificando se a alteração proporciona melhora na intensidade e no formato dos picos. A Figura 7 apresenta a relação das temperaturas de injeção avaliadas com a área de cada analito.

Figura 7 - Efeito da temperatura de injeção nas áreas dos picos dos 27 agrotóxicos na concentração de 1 mg L^{-1}. (Condição do GC-MS: temperatura da interface 280 ºC, temperatura da fonte de íons: 300 ºC).

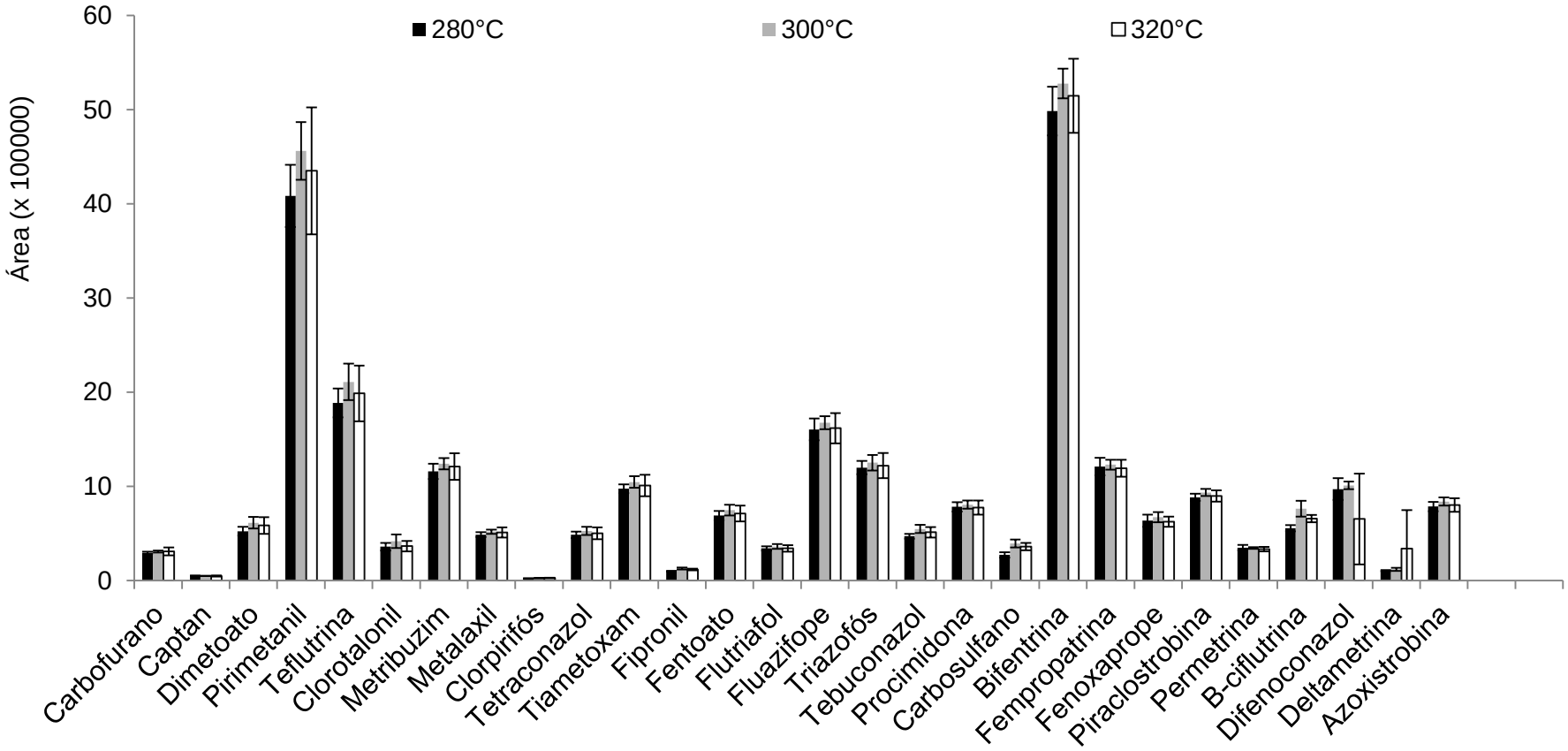


As temperaturas de 300 °C e 320 °C apresentaram maiores valores de área. Foi aplicado o teste de Tukey, onde foi observado que não havia diferença estatísticamente significativa ($p>0,05$) entre estas temperaturas, sendo escolhido 300 °C para evitar desgaste do equipamento ao se trabalhar na temperatura máxima permitida e visto que a temperatura máxima da fase móvel é de 340 ºC.

Foi possivel observar que quanto maior a temperatura de injeção, maior o sinal devido a diminuição na adsorção no injetor, para deltametrina esta diferença e ainda maior.

A interface deve estar suficientemente quente de forma a evitar condensação (LANÇAS, 1993). A Figura 8 apresenta o efeito da temperatura de interface nas áreas dos analitos.

Figura 8 - Efeito da temperatura da interface nas áreas dos picos dos 27 agrotóxicos na concentração de 1 mg L^{-1}. (Condição do GC-MS: temperatura de injeção 300 ºC, temperatura da fonte de íons: 300 ºC)

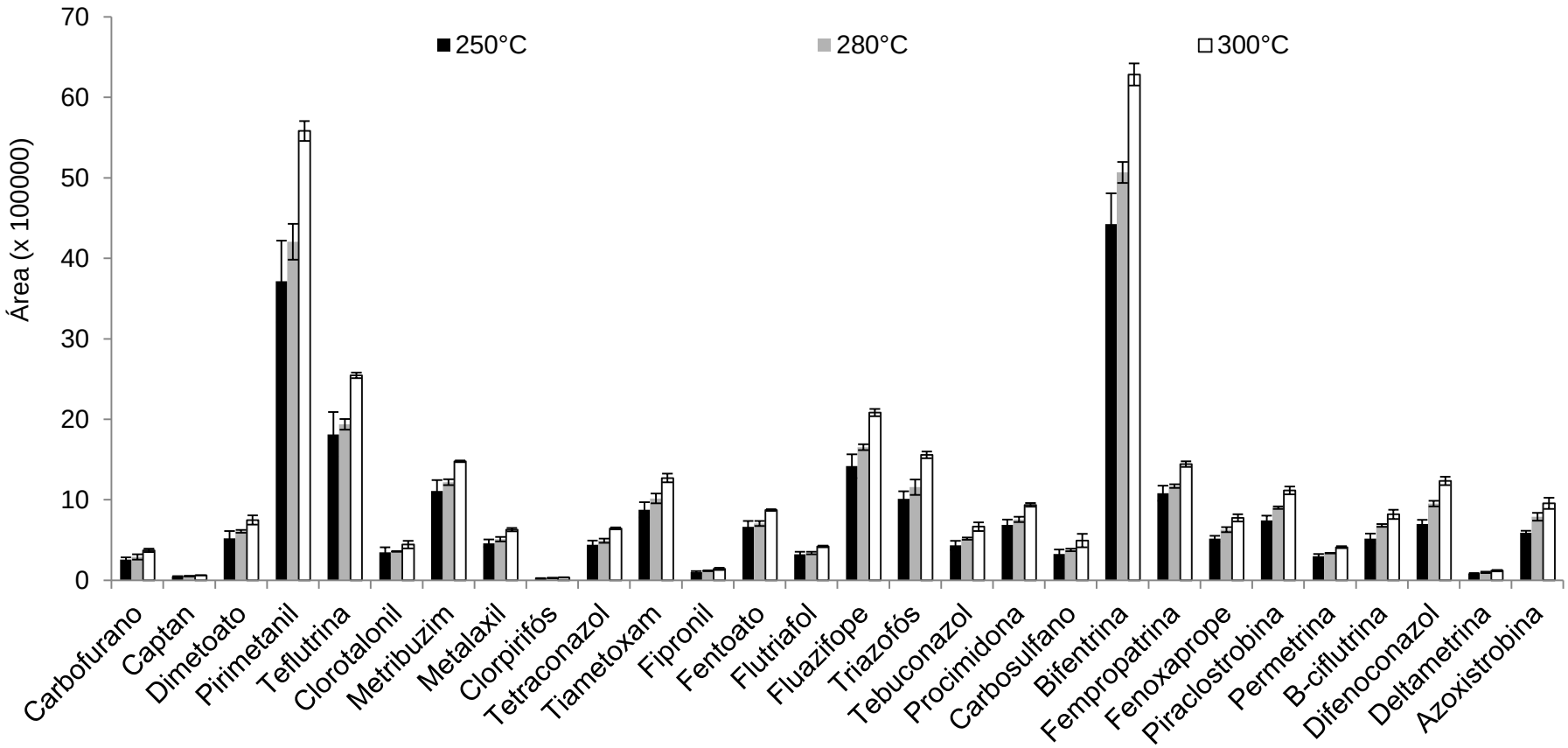


A temperatura da interface foi avaliada pelo teste de Tukey, e pode-se observar que houve diferença estatísticamente significativa entre as médias. De acordo com a Figura 8, as maiores áreas dos picos dos agrotóxicos foram observadas quando utilizada a temperatura de 300 °C na interface do equipamento. A temperatura da inteface em GC-MS normalmente é ajustada para estar ligeiramente acima da temperatura de saída da coluna, pois quaisquer pontos frios podem causar condensação da amostra e devem ser evitados. O agrotóxico difenoconazol apresentou redução na área quando utilizada a temperatura de 320 °C, possivelmente isto se deve a degradação deste analito. Quando utilizada a temperatura de 280 °C foi observada diminuição nas áreas dos picos de todos analitos em relação a 300 °C.

A Figura 9 apresenta a influência da temperatura da fonte de íons na resposta área dos picos.

A análise estatística mostra que a temperatura de 300 °C na fonte de íons promove aumento nas áreas dos picos para a maioria dos analitos. Quando utilizadas menores temperaturas alguns analitos podem não ter sido completamente ionizados, reduzindo a intensidade dos picos. A temperatura da fonte de íons afeta o grau de fragmentação das moléculas, temperaturas de fonte de íons mais baixas são propícias a picos de íons moleculares mais abundantes (KARASEK e CLEMENT, 1988).

Figura 9- Efeito da temperatura da fonte de íons nas áreas dos picos dos 27 agrotóxicos na concentração de 1 mg L^{-1}. (Condição do GC-MS: temperatura de injeção 300ºC, temperatura da interface: 300 ºC)



6.3 Avaliação da separação cromatográfica por LC-MS/MS

A partir da infusão de soluções individuais de cada um dos analitos foram determinadas quais as melhores condições de fragmentação dos íons monitorados. Foi utilizada a fonte de ionização na temperatura de 100 ºC, a temperatura do gás de dessolvatação (N_2) de 400 °C, a vazão do gás de dessolvatação de 500 L h^{-1} e a vazão do gás do cone de 50 L h^{-1}.

A fonte de ionização a pressão atmosférica utilizada foi ESI devido a moderada polaridade da maioria dos analitos. A ESI é geralmente a fonte utilizada para agrotóxicos mediamente polares, uma vez que é uma técnica mais branda que a ionização química a pressão atmosférica é menos suscetível a degradações térmicas uma vez que a ionização ocorre direto na fase líquida a temperaturas quase ambiente (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005; LANÇAS, 2009).

A Tabela 10 apresenta os agrotóxicos monitorados por LC-MS/MS, o modo de ionização utilizado (ESI+ ou ESI-), as transições monitoradas, voltagem do cone e a energia de colisão, para cada analito foram selecionadas duas transições características. A transição mais intensa foi utilizada para quantificação dos analitos e a segunda transição mais intensa para identificação dos mesmos.

Tabela 10 - Agrotóxicos quantificados por LC-MS/MS, modo de ionização, transições, energia do cone e voltagem de colisão.

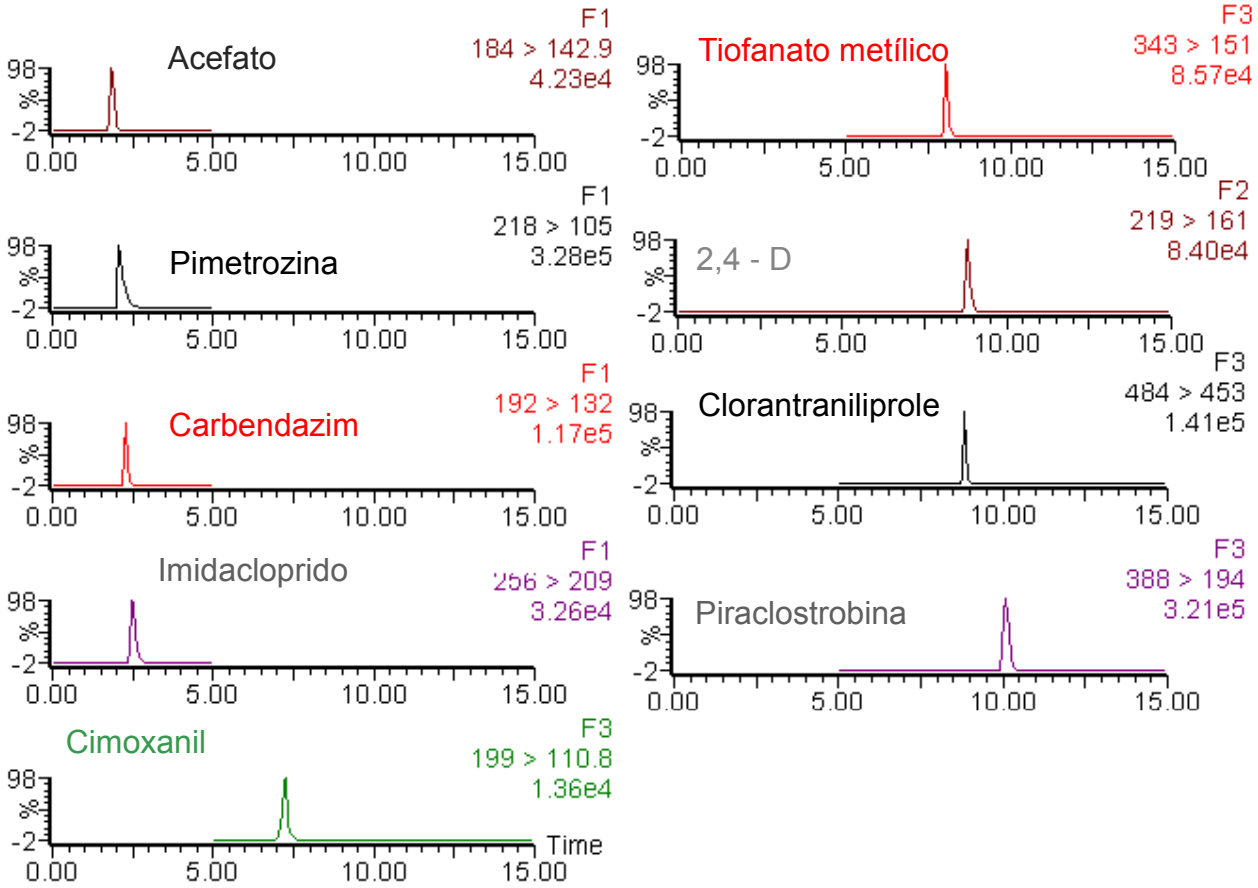
As condições de eluição no modo gradiente empregadas para separação de 10 agrotóxicos estão apresentadas na Tabela 10, foram baseadas no trabalho de Rombaldi e colaboradores (2015).

Tabela 11 - Condições de eluição empregadas no modo gradiente

Tempo (min)	Metanol (%)	Água com 0,1% ácido acético (%)	Vazão (mL min^{-1})
0	8	92	0,2
6	80	20	0,2
6,1	80	20	0,3
10	80	20	0,3
10,5	8	92	0,2
15	8	92	0,2

A separação cromatográfica dos 10 agrotóxicos analisados por LC-MS/MS está representada na Figura 10.

Figura 10 - Cromatograma no modo SRM obtido por LC-MS/MS da mistura de 10 agrotóxicos na concentração de 1 mg L^{-1} em acetato de etila



6.4 Seleção das variáveis qualitativas na MSPD

Para escolha dos parâmetros qualitativos que mais influenciam na MSPD foram realizados ensaios de recuperação em triplicata avaliando o uso dos diferentes suportes sólidos pelo teste de Tukey.

6.4.1 Seleção do suporte sólido

O preparo da amostra pode ser considerado como um processo de separação analítica, que envolve principalmente o isolamento seletivo dos analitos das matrizes, remoção de espécies interferentes e enriquecimento dos analitos. Com base nas propriedades dos analitos e complexidade da matriz, vários materiais alternativos reutilizáveis foram avaliados no preparo da amostra. Foram avaliados nove suportes sólidos na MSPD realizada em amostras de couve. Suportes sólidos tradicionalmente utilizados como C18, PSA (amina primária e secundária), sílica, florisil, alumina e celite foram avaliados. Quitina, quitosana e areia foram avaliados

como suportes sólidos alternativos. Foram mantidos 0,5 g de amostra macerada por 5 minutos juntamente com 1 g de suporte sólido, adição de 10 mL de acetonitrila e 20 mg de carvão ativo sob agitação em vortex por 5 minutos.

Todos ensaios apresentaram desvio padrão relativo inferior a 20 %, conforme Figuras 11 e 12.

Para C18, foi observado que com a diminuição da polaridade dos analitos, houve a redução nas recuperações, provavelmente devido a maior afinidade destes analitos com o suporte sólido, dificultando a eluição (CAO *et al.,* 2015).

Foi observada baixa recuperação (entre 14 e 33 %) quando utilizado Florisil como suporte sólido para extração de azoxistrobina e deltametrina. Estes resultados coincidem com encontrados por Tsochatzis e colaboradores (2010) quando avaliada a extração destes agrotóxicos em arroz. Florisil é um adsorvente polar que retêm compostos com pares de elétrons livres de átomos de nitrogênio e enxofre, como carbossulfano, tiametoxam, trizofós, o que pode ter resultado na diminuição nas recuperações destes compostos (KACZYŃSKI *et al*., 2016). Para os agrotóxicos mais ácidos, metalaxil (pK = 0), tetraconazol (pK = 0,65) e metribuzim (pK = 0,99), as recuperações utilizando Florisil como suporte sólido foram de 78 %, 83 e 91 %, respectivamente, enquanto que para os ácidos mais fracos a recuperação foi inferior, como o pirimetanil (pK = 3,52) que apresentou recuperação de 7 %. Provavelmente em um ambiente com reduzida quantidade de água como aquele em que ocorre a separação da mistura, a dissociação dos agrotóxicos ácidos foi suprimida de modo que a interação ácido-base de Florisil e com os agrotóxicos ácidos teve de pouca importância (JAROSZYŃSKA, 2003).

O tamanho das moléculas e sua simetria determinam a taxa de migração através do suporte sólido. Os compostos fenoxaprope e fluazifope possuem valores próximos de pK (de 3,2 e 3,1, respectivamente), a recuperação desses compostos deve depender das propriedades espaciais das moléculas. Ambas as moléculas têm uma estrutura semelhante em relação à sua simetria, mas o fenoxaprope tem maior massa molecular, o que faz com que suas moléculas migrem mais lentamente através da camada dos suportes sólidos.

Com a quitosana foram obtidas recuperações (entre 1 e 87 %). Esta diminuição pode ser proveniente da interação dos grupos amino e hidroxila da

quitosana e os grupos eletrofílicos dos analitos, ocorrendo interação eletrostática e ligações de hidrogênio entre o suporte sólido e os analitos. Assim, devido a sua forte capacidade de adsorção dos analitos, pode ter resultado na dificuldade no processo de eluição, acarretando em a uma maior adsorção dos analitos e menor eficiência de eluição. Resultados similares foram obtidos por Peng *et al.* (2016), quando utilizado quitosana de baixa viscosidade na MSPD para extração de fenóis em oliva.

Figura 11 – Recuperação dos analitos na concentração de 0,1 mg kg^{-1} utilizando diferentes suportes sólidos convencionais na etapa de dispersão na VA-MSPD. (Condição de extração: 0,5 g de amostra fortificada com a mistura de 27 padrões na concentração 0,1 mg kg^{-1}, 1 g de suporte sólido, maceração 5 min., 10 mL de acetonitrila, 1 g de sulfato de sódio, 20 mg de carvão ativo, vortex 1 min., centrifugação 10179 $_x$g). Barras de erro indicam desvio padrão relativo (n=3).

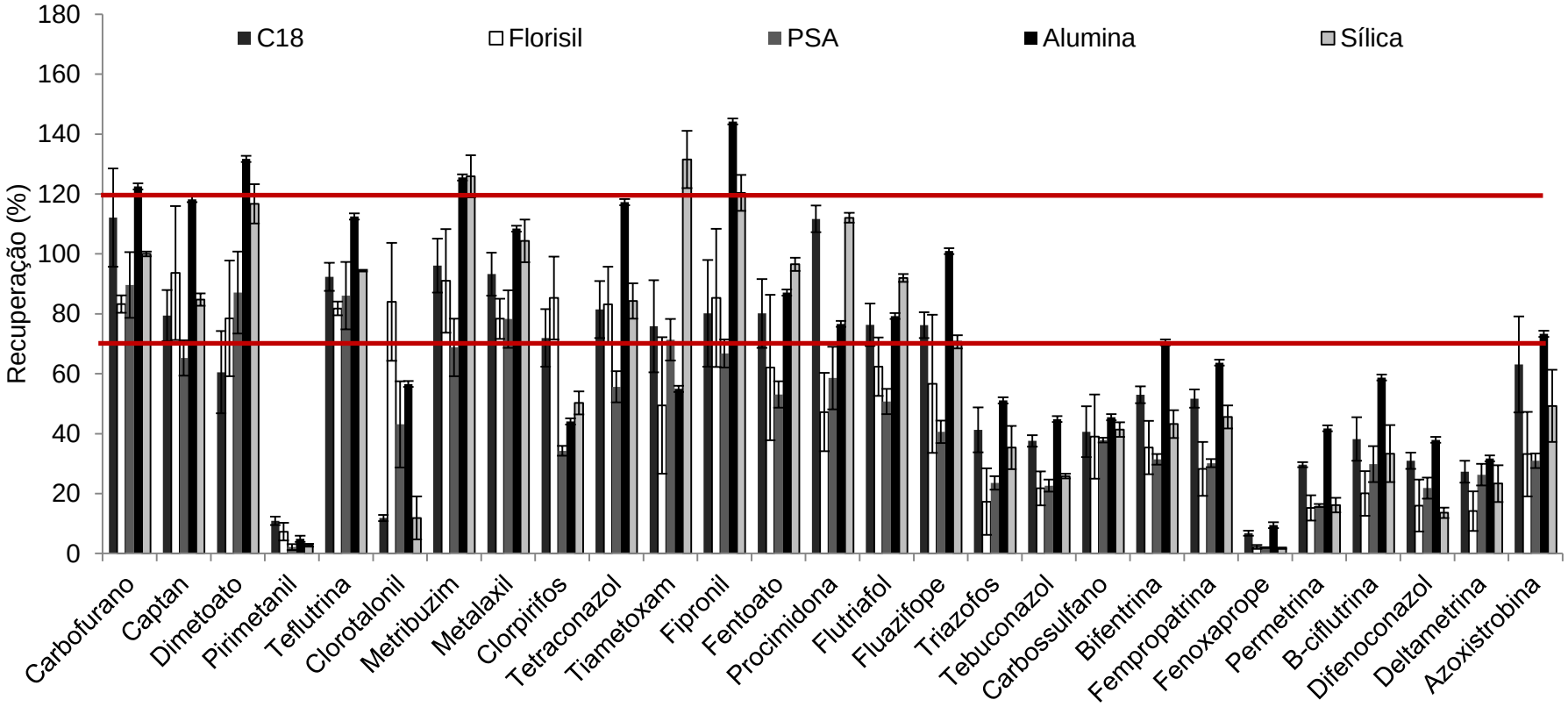
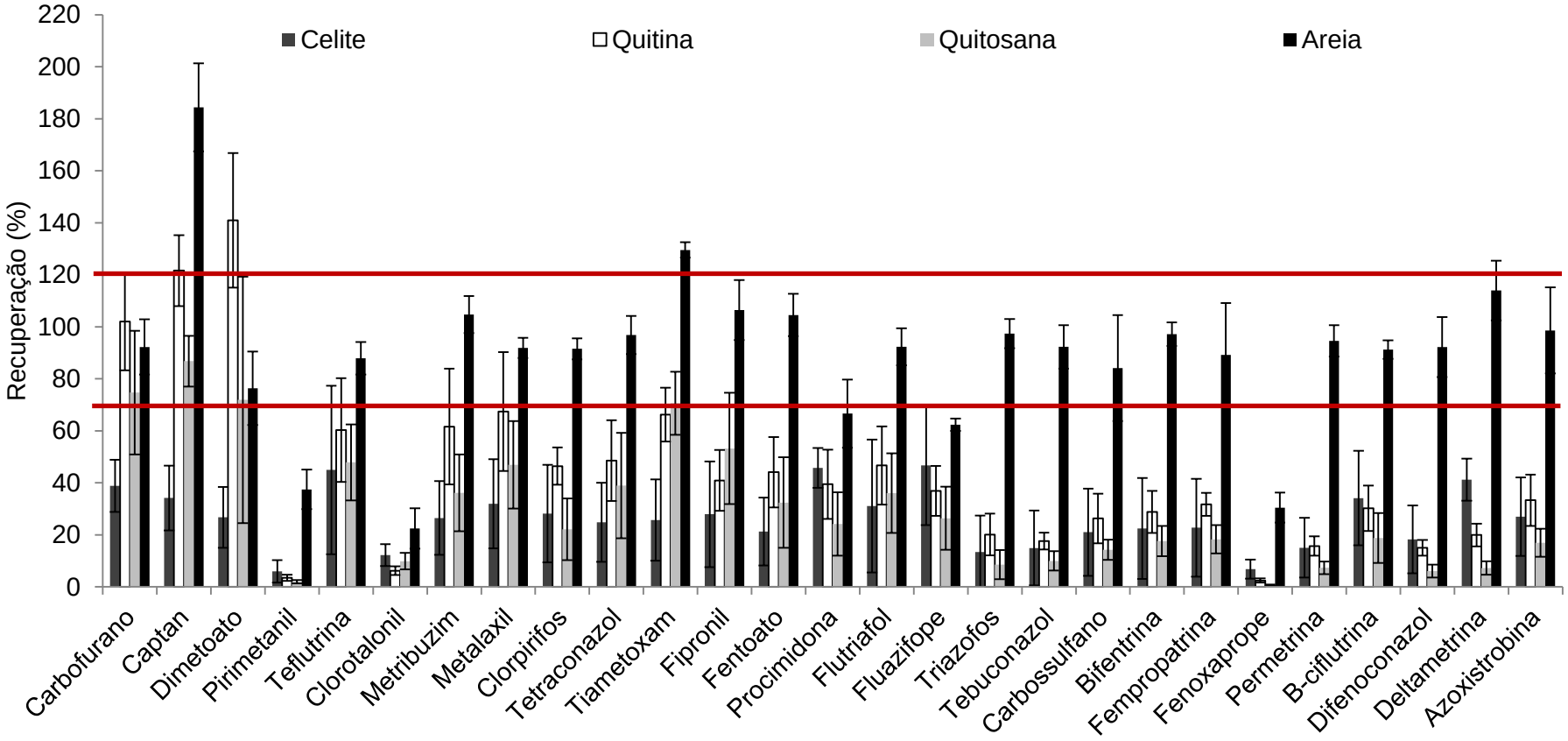


Figura 12 – Recuperação dos analitos na concentração de 0,1 mg kg^{-1} utilizando diferentes suportes sólidos de obtidos de fonte natural na etapa de dispersão na VA-MSPD. (Condição de extração: 0,5 g de amostra fortificada com a mistura de 27 padrões na concentração 0,1 mg kg^{-1}, 1 g de suporte sólido, maceração 5 min., 10 mL de acetonitrila, 1 g de sulfato de sódio, 20 mg de carvão ativo, vortex 1 min., centrifugação 10179 $_{x}$g). Barras de erro indicam desvio padrão relativo (n=3).

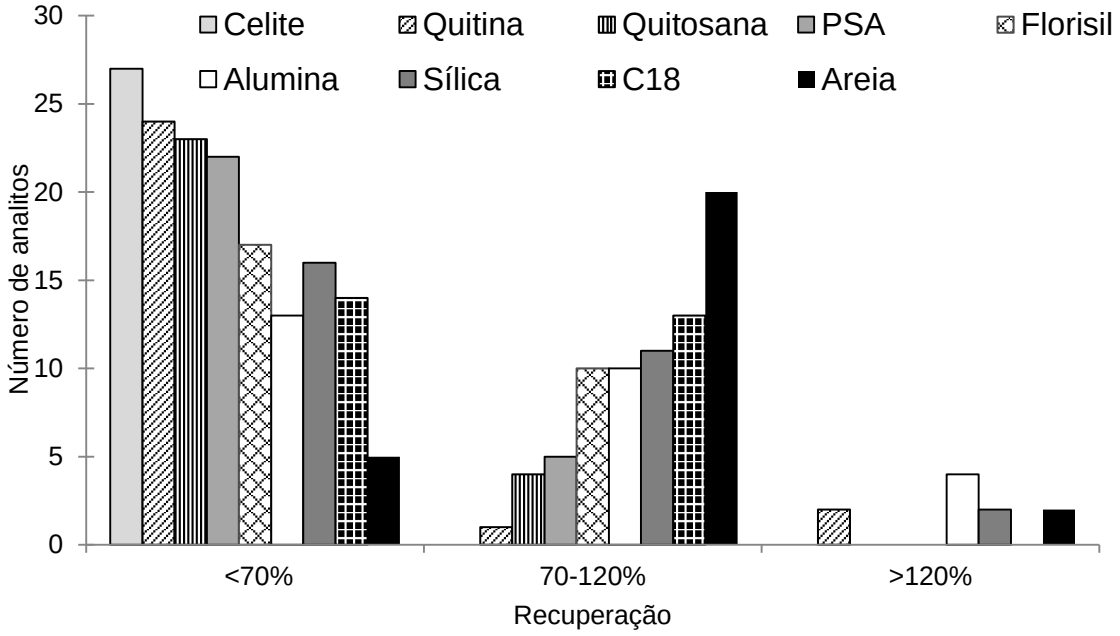


As baixas recuperações de fenoxaprope etílico (2 %) e fluazifope butílico (41 %), quando utilizado PSA como sorvente se deve a este ser um trocador aniônico fraco que interage com agrotóxicos com grupos ácidos, como os ácidos fenoxialcanóicos (CAO *et al*., 2015).

Captan e clorotalonil são sensíveis a pH alcalino podendo atingir baixas recuperações uma vez que após o contato com PSA, o pH dos extratos aumenta atingindo valores acima de 8, podendo comprometer a estabilidade de compostos sensíveis a pH alcalino (LOZOWICKA *et al*., 2016).

Foi possível verificar que a maior quantidade de multiclasses de analitos pôde ser extraída, com recuperações entre 70 e 120 % utilizando como suporte sólido a areia da praia de Bojuru, conforme a Figura 13, sendo selecionado para as etapas posteriores.

Figura 13 - Número de analitos que apresentaram valores de recuperação <70 %, entre 70-120 % e >120 %, após extração por MSPD com diferentes suportes sólidos (condição de extração: 0,5 g de amostra fortificada com a mistura de 27 padrões na concentração 0,1 mg kg^{-1}, 1 g de suporte sólido, maceração 5 min., 10 mL de acetonitrila, 1 g de sulfato de sódio, 20 mg de carvão ativo, vortex 1 min., centrifugação 10179 xg) (n=3).



Celite é um material alternativo e de baixo custo, porém não se apresentou eficiente para os compostos em estudo. Utilizando alumina, os ensaios apresentaram elevada recuperação (acima de 120 %), isto pode ser atribuído a presença de substância interferentes endógenas (VIANA *et al.*, 1996; MENEZES FILHO *et al.,* 2006).

Florisil tem sido utilizado na etapa de limpeza em matrizes com elevado teor de gordura, tendo potencial para reter componentes mais polares da matriz como lipídios (SOBHANZADEH *et al*., 2011).

As propriedades abrasivas da areia parecem proporcionar uma ruptura mais eficiente do material da planta, quebrando em partículas menores e, desta forma, expondo, de forma mais eficiente, os componentes da planta aos eluentes. Esses resultados parecem corroborar a ideia de que a alta eficiência de extração observada com areia como suporte sólido na MSPD se deve provavelmente devido a uma combinação de dois fatores: interrupção da amostra muito efetiva e falta de química interações entre analitos e suporte sólido.

Os óxidos metálicos, como óxido de alumínio, de titânio e de ferro presentes na areia atuam como trocadores de íons e ligantes. Moléculas como pirimetanil e clorotalonil que possuem baixa polarizabilidade, 21,9 e 24,4, respectivamente, quando comparadas a teflutrina, que possui valor de polarizabilidade de 33,4, tendem a formar ligações químicas mais fortes com a areia, e consequentemente apresentando menores valores de recuperação que a teflutrina (XU *et al*., 2016).

Visto que a areia quando utilizada como suporte sólido apresentou recuperações satisfatórias (entre 70-120 %,) foi selecionada a areia como suporte sólido na MSPD nas etapas posteriores.

6.4.2 Seleção do solvente

De acordo com as estruturas químicas e polaridades, os agrotóxicos são facilmente solúveis em solventes orgânicos como hexano, acetato de etila, acetona e acetonitrila. Um grande número de substâncias interferentes presentes em frutas e hortaliças, tais como açúcares, pigmentos, proteínas, ceras, as quais são facilmente solúveis nestes solventes e podem influenciar na análise. Assim a seleção de um

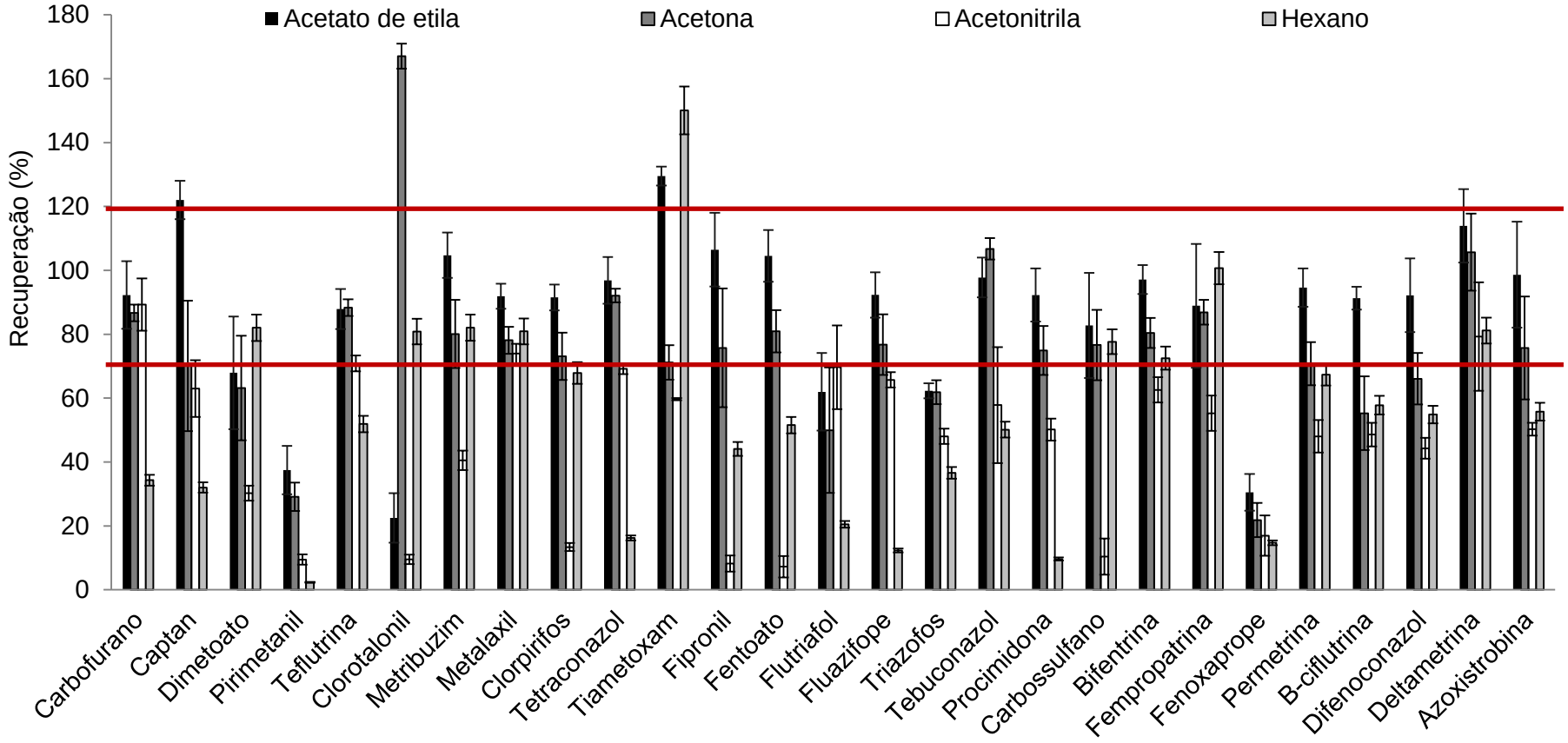
solvente adequado para extração se torna particularmente importante (LU *et al*., 2013).

Foram avaliados solventes de diferentes polaridades para extração, tais como: hexano, acetato de etila, acetona e acetonitrila. O único parâmetro alterado foi o tipo de solvente, mantendo o volume constante (10 mL).

Foi observada baixa recuperação para a maioria dos analitos quando utilizado hexano, solvente orgânico mais apolar, assim como o solvente mais polar (acetonitrila), sendo assim solventes de polaridade média como acetato de etila e acetona apresentaram recuperações entre 70 e 120 % para um maior número de analitos. Neste trabalho, foram comparadas as recuperações dos analitos utilizando diferentes solventes sendo selecionado o acetato de etila que recuperou maior número de analitos de forma eficiente além da sua toxicidade relativamente inferior aos demais (PRAT, 2014, PRAT, 2016).

A Figura 14 apresenta as médias das recuperações obtidas e os desvios padrão relativos, quando avaliados diferentes solventes na MSPD. Pode-se observar que quando utilizado acetato de etila como solvente na etapa de extração, as recuperações para a maioria dos analitos foi considerada satisfatória, apresentando valores entre 70 e 120 %, com desvios inferiores a 20 %, desta forma o solvente acetato de etila foi escolhido para extração de agrotóxicos em amostras de frutas e hortaliças.

Figura 14 - Recuperação dos analitos na concentração de 0,1 mg kg^{-1} utilizando diferentes solventes. (Condição de extração: 0,5 g de amostra fortificada com a mistura de 27 padrões na concentração 0,1 mg kg^{-1}, 1 g de areia, maceração 5 min., 10 mL de solvente, 1 g de sulfato de sódio, 20 mg de carvão ativo, vortex 1 min., centrifugação 10179 x g). Barras de erro indicam desvio padrão relativo (n=3).



Visto que os analitos tem uma ampla faixa de polaridade, estes compostos não possuem afinidade por solventes fortemente polares, como acetonitrila e acetona, que possuem valores de Kow de -0,34 e -0,24, respectivamente, no entanto solventes com caráter lipofílico como hexano, com Kow de 3,90, não são eficientes para extração de compostos mediamente polares. Assim, acetato de etila tem demonstrado ser um solvente com características universais, uma vez que possui capacidade para extrair agrotóxicos de diferentes classes.

De acordo com a EPA (Environmental Protection Agency) a toxicidade aguda global do acetato de etila é baixa e não parece ser mutagênica. O acetato de etila é facilmente biodegradável e não potencialmente bioacumulável, sendo considerado como não perigoso para o meio ambiente (PRAT *et al*., 2014).

Os métodos multirresíduo baseados na extração com acetato de etila tem sido utilizados há mais de 20 anos e continuam a ser utilizados em muitos laboratórios, devido à eficiência de extração, este solvente tem demostrado ser equivalente aos solventes miscíveis com água para agrotóxicos polares e não-polares em vegetais, frutas e produtos secos (após adição de água) (MOL *et al*., 2007).

A mudança por solventes com menor volume de expansão, como acetato de etila e hexano, permite um maior volume de injeção no modo splitless. No entanto, quando utilizado hexano como solvente pode ocorrer adsorção na seringa resultando em respostas relativas menores de agrotóxicos mais polares (MAŜTOVSKÁ e LEHOTAY, 2004) conforme observado neste trabalho com a redução na recuperação de carbofurano.

Rombaldi *et al*. (2015) também avaliaram o uso de diferentes solventes, como acetato de etila, acetonitrila e metanol na extração de agrotóxicos e produtos de cuidado pessoal em mexilhão, acetato de etila proporcionou recuperações para os agrotóxicos entre 73 e 100 %.

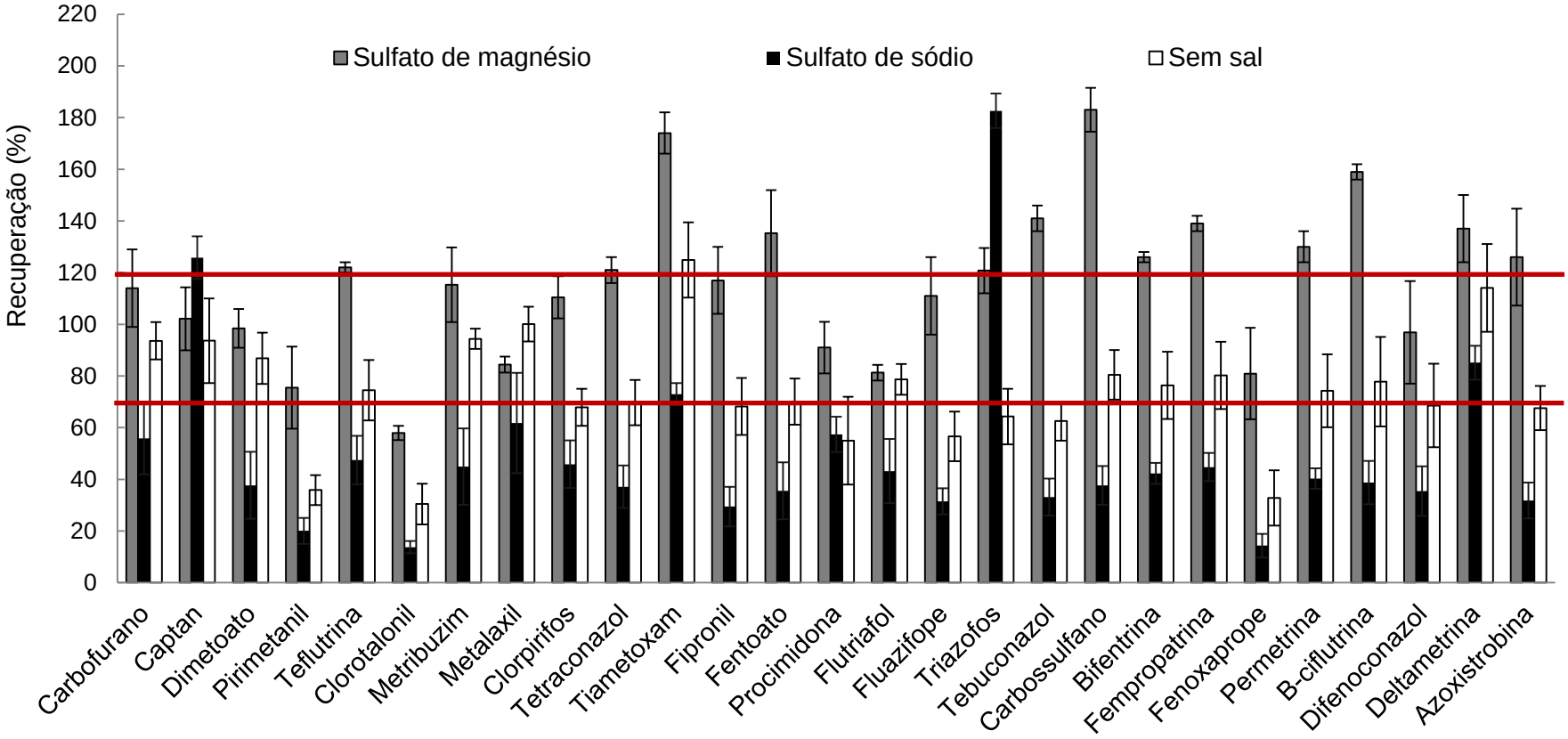
Lu e colaboradores (2013) avaliaram quantidade de resíduo da extração, resultante dos co-extrativos, com os solventes como: hexano, diclorometano, acetona, acetonitrila e metanol para determinação de agrotóxicos em aipo. Foi possível observar que a quantidade de resíduo aumentou com o aumento do índice de polaridade do solvente. Os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila

foram os que apresentaram menor teor de resíduos de co-extrativos comparados aos demais solventes. Assim como neste trabalho que foi possível observar redução na quantidade de pigmentos extraídos de couve quando utilizados solventes menos polares.

6.4.3 Seleção de sais

Em técnicas de preparo de amostra como MSPD e QuEChERS, alguns sais podem atuar como um sal de secagem para reduzir a fase aquosa, ajudando assim a melhorar as recuperações promovendo a partição dos compostos na fase orgânica (LOZOWICKA *et al*., 2016). Quando o GC é utilizado como técnica analítica de separação, pode ser adicionado sulfato de sódio anidro ao meio de dispersão com a finalidade de reter água proveniente da amostra (CAPRIOTTI *et al*., 2010).

Figura 15 - Recuperação dos analitos na concentração de 0,1 mg kg^{-1} utilizando diferentes sais e ausência de sal. (Condição de extração: 0,5 g de amostra fortificada com a mistura de 27 padrões na concentração 0,1 mg kg^{-1}, 1 g de areia, maceração 5 min., 10 mL de acetato de etila, 1,0 g de sal, 20 mg de carvão ativo, vortex 1 min., centrifugação 10179 xg). Barras de erro indicam desvio padrão relativo (n=3).



A ausência de sal proporcionou recuperações entre 70 e 120 % para a maioria dos analitos. As melhores recuperações quando não foi utilizado sal, pode ser explicada pela composição da couve, que é uma matriz complexa, contendo minerais como cálcio, magnésio, manganês, potássio, fósforo, que podem atuar com a mesma função do sal na MSPD. A adição de sal pode reduzir a efetividade da etapa de limpeza, assim co-extrativos mais polares tendem a particionar na fase orgânica. O uso de sulfato de magnésio favoreceu a co-extração de alguns compostos polares da matriz da amostra, como a clorofila (REJCZAK e TUZIMSKI, 2015). A adição de sal como sulfato de sódio pode reduzir as recuperações pelas atrações eletrostáticas entre as moléculas dos analitos e do sal (FERNANDEZ-ALBA e BARCELÓ, 2005).

Para continuidade do trabalho foi selecionada a condição sem adição de sal na MSPD para extração de agrotóxicos em frutas e hortaliças, mesmo estas possuindo diferentes composições de minerais.

6.4.4 Modificações da MSPD

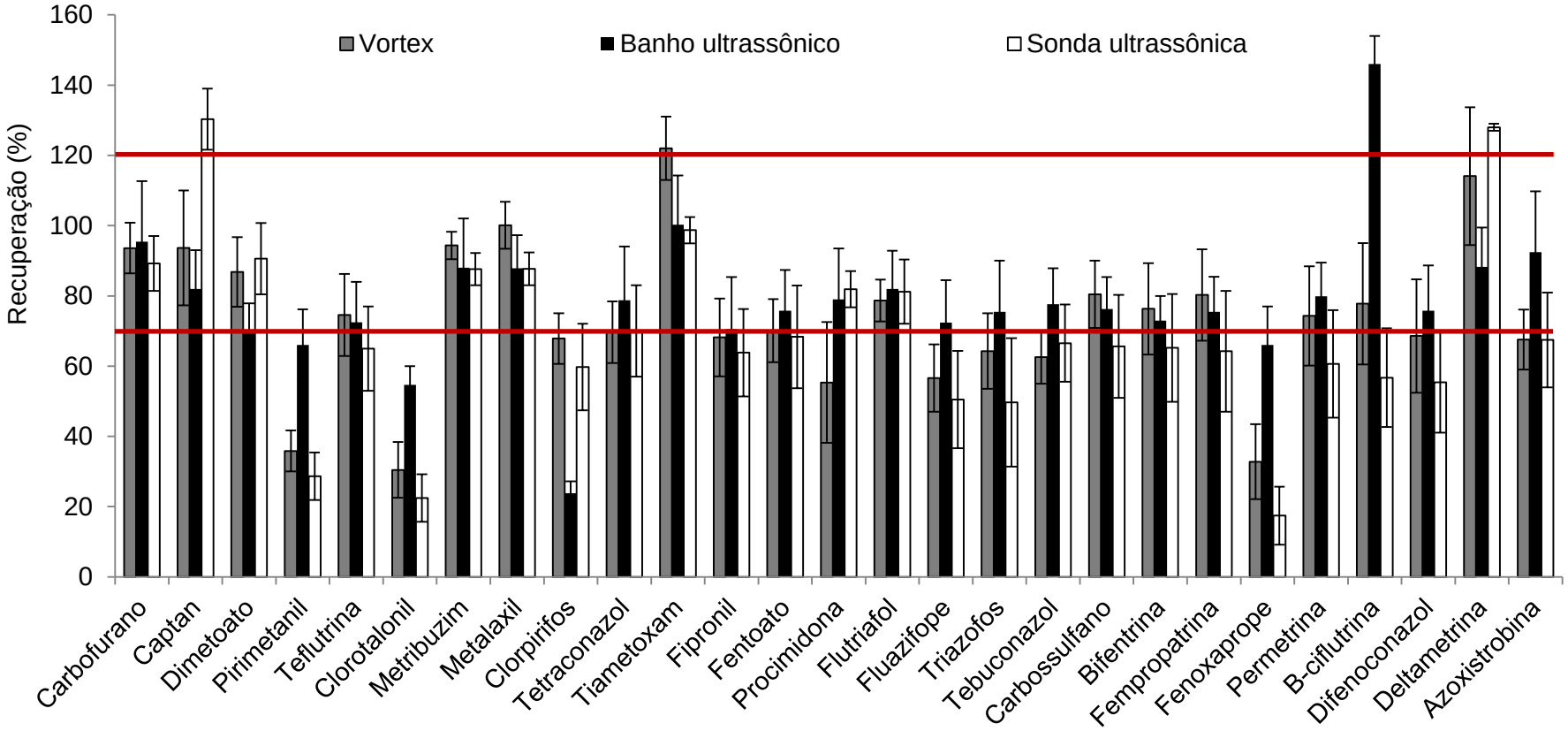
A MSPD pode ser realizada acompanhada de uma variedade de combinações, visando melhora na eficiência geral de extração e permitindo o preparo da amostra em poucos minutos. A eficiência de extração pode ser aumentada pela utilização de banho ultrassônico, sonda de ultrassom e vortex. Estas modificações da MSPD original permitem maior rapidez no processo de extração, além de fornecer rendimentos de extração satisfatórios, tendo sido aplicados na determinação de compostos orgânicos apolares em matrizes complexas (ZHONG *et al*., 2012).

Foram avaliadas três variações da MSPD visando auxiliar a etapa de extração, sendo comparadas MSPD assistida por vortex (VA-MSPD), MSPD assistida por banho ultrassônico e MSPD assistida por sonda de ultrassom. A VA-MSPD foi realizada conforme Caldas e colaboradores (2013), sendo realizada agitação por 1 minuto seguida de centrifugação a 10179 xg por 10 minutos. O uso de banho ultrassônico e sonda de ultrassom foram realizados conforme Ramos e colaboradores (2008), o banho ultrassônico foi utilizado por 10 minutos, enquanto que a sonda de ultrassom foi utilizada por 1 minuto. A Figura 16 apresenta as

recuperações obtidas pela MSPD em couve quando avaliadas as variações da MSPD.

Os ensaios foram realizados em triplicata e avaliadas as recuperações pelo teste de Tukey, sendo possível observar diferença estatisticamente significativa entre as médias para os diferentes tratamentos de amostra. A MSPD auxiliada por banho ultrassônico foi o tratamento mais eficiente para extração de agrotóxicos em amostras de couve, apresentando recuperações para a maioria dos analitos entre 70 e 120 %. Para agrotóxicos, a energia ultrassônica tem sido utilizada por promover maior rapidez e eficiência de extração durante extração sólido-líquido (RAMOS *et al*., 2008, ALBERO *et al*., 2017). A eficiência de cavitação em uma sonda é maior do que um banho de ultrassom porque o sistema de sonda pode introduzir uma intensidade muito maior para uma zona específica. Assim alguns analitos mais sensíveis podem ser degradados acarretando em uma diminuição nas recuperações (RAMOS *et al*., 2008; SEIDI e YAMINI, 2012). De forma que foi selecionada para as etapas posteriores a dispersão da matriz em fase sólida assistida por banho ultrassônico (UA-MSPD).

Figura 16 - Recuperação dos analitos na concentração de 0,1 mg kg^{-1} utilizando diferentes equipamentos auxiliares na extração. (Condição de extração: 0,5 g de amostra fortificada com a mistura de 27 padrões na concentração 0,1 mg kg^{-1}, 1 g de areia, maceração 5 min., 10 mL de acetato de etila, 20 mg de carvão ativo, vortex 1 min., banho ultrassônico 10 min, sonda de ultrassom 1 min, centrifugação 10179 $_{x}$g). Barras de erro indicam desvio padrão relativo (n=3).



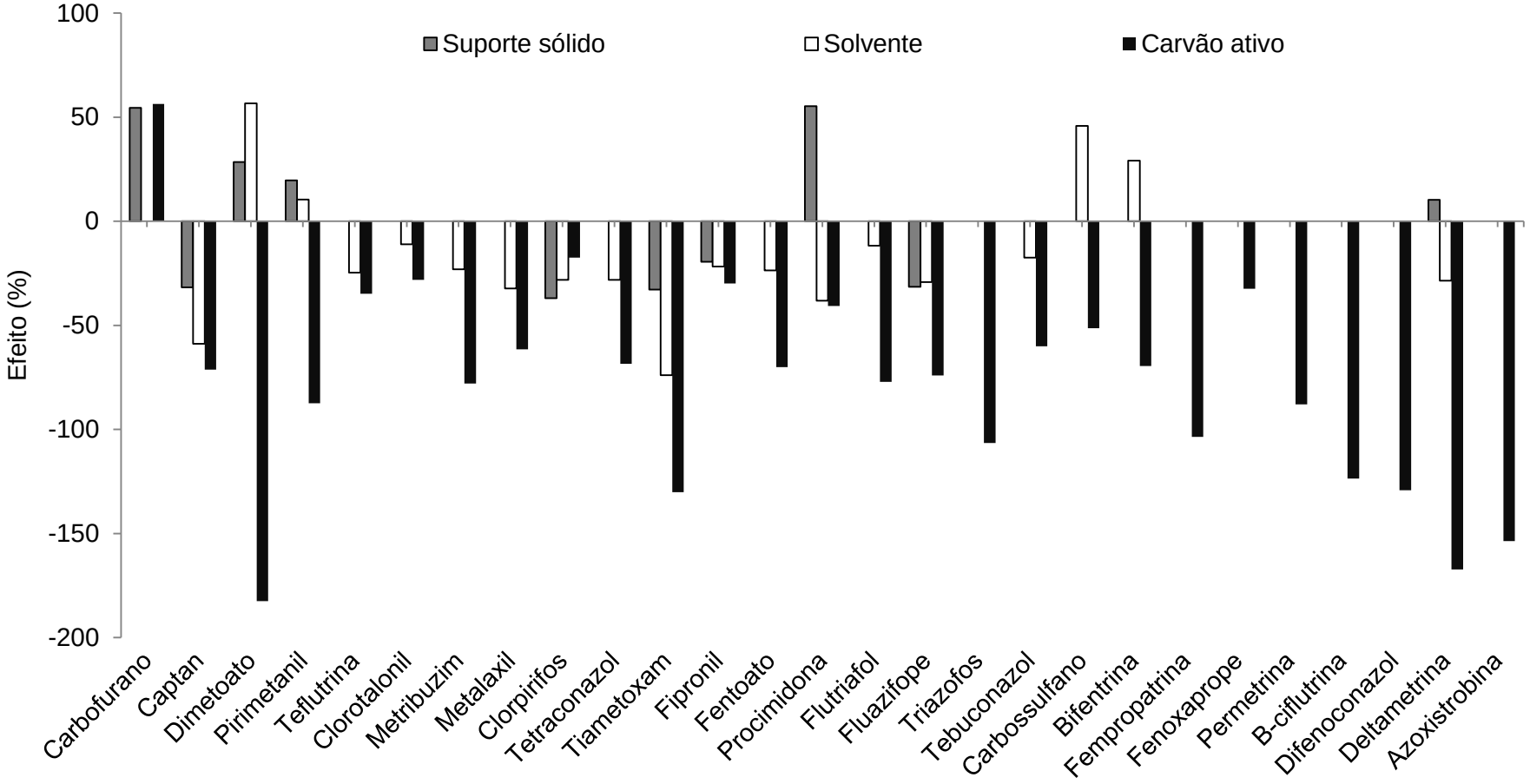
6.5 Otimização da MSPD

A fim de avaliar as interações entre as principais variáveis quantitativas, como quantidade de suporte sólido, quantidade de solvente e quantidade de carvão ativo na etapa de limpeza foi realizado um planejamento experimental 2^3, com 3 pontos centrais. A quantidade de suporte sólido foi avaliada de 0,5 g a 1,5 g, correspondendo as proporções 1:1 a 1:3 de amostra/suporte sólido, a quantidade de solvente foi de 5 a 15 mL, e a quantidade de carvão ativo foi de 0,0200 a 0,100 g (BARKER, 2007).

Foi possível verificar que a variação da quantidade de suporte sólido teve efeito significativo positivo e negativo para a mesma quantidade de analitos, desta forma a quantidade de suporte sólido foi mantida no ponto central, em 1 g, nesta condição a proporção de amostra/suporte sólido foi de 1:2. Esta proporção está de acordo com a sugerida por KRUVE et al.(2008) e utilizada em outros trabalhos, para extração de compostos fenólicos halogenados em frutos do mar e de agrotóxicos em solo (CHEN *et al.,* 2016; LOZOWICKA *et al*., 2016).

A quantidade de solvente teve efeito significativo negativo para 15 analitos, isto é, quando variadas as quantidades de solvente de 5 até 15 mL, houve redução na recuperação para a maioria dos analitos, sendo fixado no nível no nível -1 (5 mL de solvente). A redução na quantidade de solvente é de grande importância, pois reduz a exposição do analista ao solvente, bem como a geração de resíduos e possui menor diluição da amostra o que proporciona menores limites de quantificação. O maior rendimento de extração observado neste trabalho provavelmente ocorre devido a uma alta afinidade dos analitos com o eluente escolhido (TEIXEIRA *et* al., 2006). Resultados similares foram obtidos em outros trabalhos.

Figura 17 - Efeitos significativos (p≤0,05) nas recuperações obtidas para MSPD através do planejamento experimental 2^3.



Wang e colaboradores (2013) estudaram a eficiência de extração na MSPD utilizando diferentes volumes de solvente (de 1-10mL) para extração de agrotóxicos organofosforados em amostras de laranja, e selecionaram 5,0 mL como volume de eluição. As áreas dos picos cromatográficos aumentaram rapidamente à medida que o volume do solvente aumentou de 1,0 para 4,5 mL, porém quase não mudou quando avaliados volumes de 4,5-10,0 mL. Assim, volume de solvente eluição selecionado foi de 5,0 mL.

Teixeira e colaboradores (2006) também observaram maior rendimento de extração quando utilizado menor volume de solvente (5 mL) na extração de ácidos clorogênicos em folhas de figueira.

A quantidade de carvão ativo teve influência negativa nas recuperações para 26 dos 27 dos agrotóxicos analisados, visto que este possui a propriedade de remover também compostos planares (LU *et al*., 2012). A quantidade de carvão ativo foi fixado no nível -1, que corresponde a 20 mg.

Carvão ativo tem sido bastante utilizado para remoção de pigmentos como clorofila e carotenoides de extratos de amostras vegetais e devido a sua grande área superficial com grupos fortemente polares, favorece a formação de ligações de hidrogênio. Por causa destas características, quando utilizado em grandes concentrações são observadas forte retenção de agrotóxicos resultando em baixas recuperações. O carvão ativo tem uma estrutura superficial muito complexa contendo uma vasta gama de grupos funcionais incluindo grupos fenólicos, carboxílicos, carbônicos, aldeídicos, etéricos, peroxídicos, quinonas e lactonas. A baixa recuperação de muitos solutos orgânicos está frequentemente associada à força de múltiplas interações de ligação, que proporcionam um mecanismo de adsorção eficiente acompanhado por uma eluição com solvente ineficiente, conduzindo a uma recuperação global baixa (MATISOVÁ e ŠKRABÁKOVÁ, 1995).

Neste trabalho, assim como Cao e colaboradores (2015), foi observado que com o aumento de sorvente a base de carbono, houve aumento na limpeza do extrato. Entretanto as recuperações para a maioria dos compostos diminuiu, devido a adsorção dos analitos.

Quando utilizado sorvente a base de carbono (carbono grafitizado) para limpeza de extrato de diversos chás, CAO e colaboradores (2015) observaram que

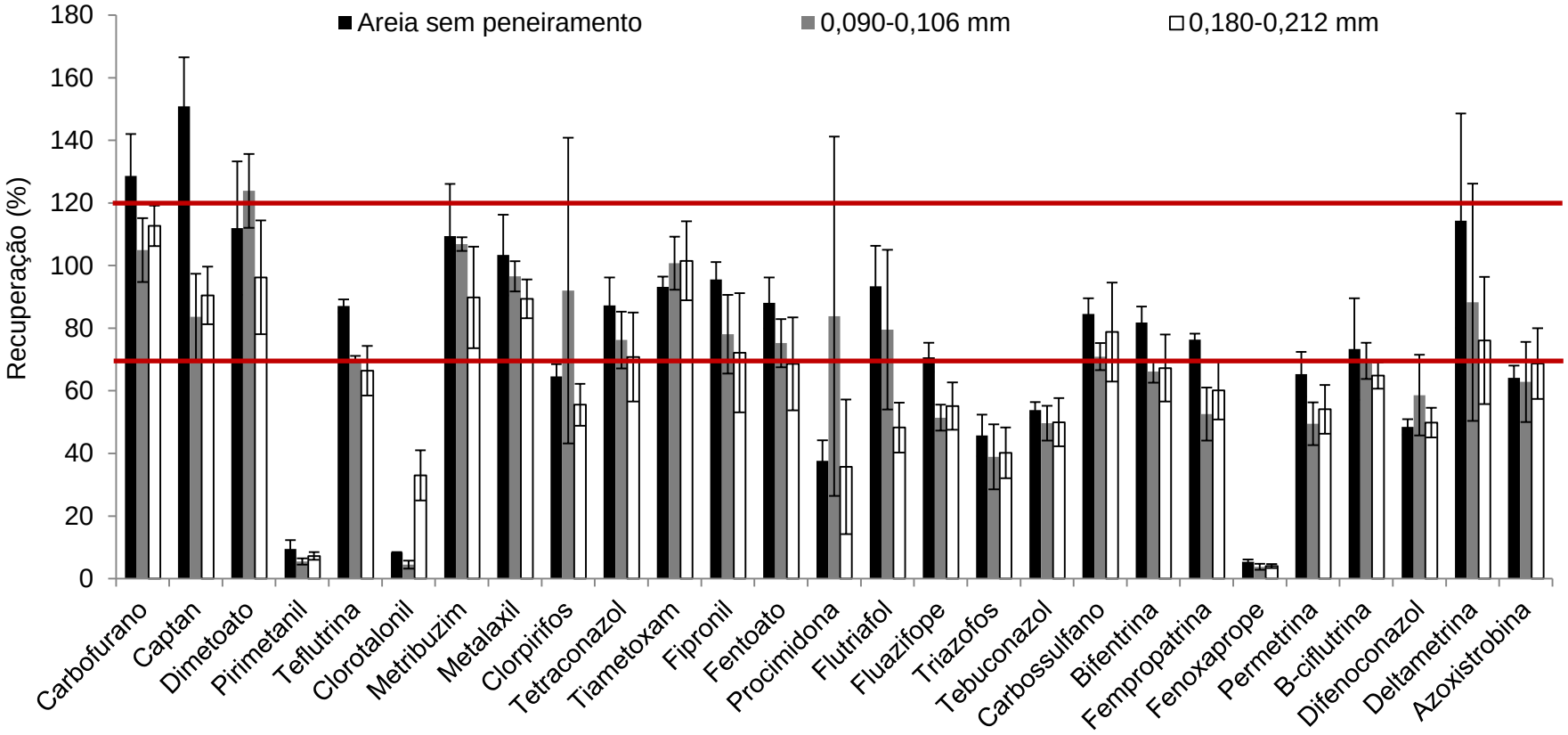
as maiores recuperações de agrotóxicos ocorreram na ausência ou nas menores concentrações de sorvente (50 mg), selecionando então a utilização de sorvente pela limpeza do extrato.

6.6 Avaliação da composição e da granulometria da areia

Foram avaliados diferentes tamanhos de partícula e posteriormente areias coletadas em diferentes locais, visando avaliar a influência da granulometria e composição na eficiência da MSPD em amostras de couve.

Quando avaliado areia da praia de Bojuru sem peneiramento e com tamanho de partícula de 0,090-0,106 e 0,180-0,212 mm na MSPD, foi observado que as recuperações para a maioria dos analitos foram de 70-120 % quando utilizados a areia sem peneiramento e a de 0,090-0,106 mm, estes resultados diferem estatisticamente das recuperações quando utilizada areia com tamanho de partícula de 0,180 a 0,212.

Figura 18 - Recuperação dos analitos utilizando suporte sólido com diferentes tamanhos de partícula. (Condição de extração: 0,5 g de amostra fortificada com a mistura de 27 padrões na concentração 0,1 mg kg^{-1}, 1 g de areia, maceração 5 min., 5 mL de acetato de etila, 20 mg de carvão ativo, banho ultrassônico 10 min., centrifugação 10179 xg). Barras de erro indicam desvio padrão relativo (n=3).



Abhilash e colaboradores (2009) realizaram estudos para avaliar o tamanho de partícula de Florisil como suporte sólido na MSPD para isolamento de resíduos de isômeros de hexaclorociclohexano de frutas, vegetais, grãos, legumes e plantas medicinais. Neste trabalho foram avaliados os tamanhos de partícula de: <0,074 mm, 0,074-0,149 mm, 0,149-0,250 mm, 0,250-0,595 mm e 0,595-1,19 mm. Os autores selecionaram as partículas de Florisil de 0,149 a 0,250 mm, pois apresentaram recuperações médias de 95 % em amostras fortificadas.

As amostras de areia utilizadas na MSPD foram caracterizadas por Energia Dispersiva de Raios X (EDX) e Microscopia Eletrônica Varredura . Devido a sua heterogeneidade foram realizadas análises de EDX em cada partícula de areia. A Figura 19 apresenta a imagem da microscopia da areia de Bojuru sem peneiramento.

Figura 19 - Imagem por MEV da areia de Bojuru aumento de (a)100X e (b)500X

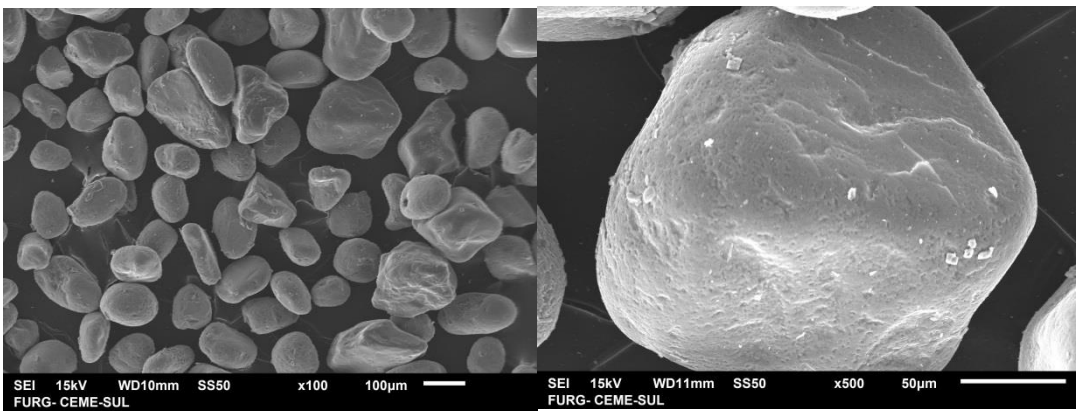
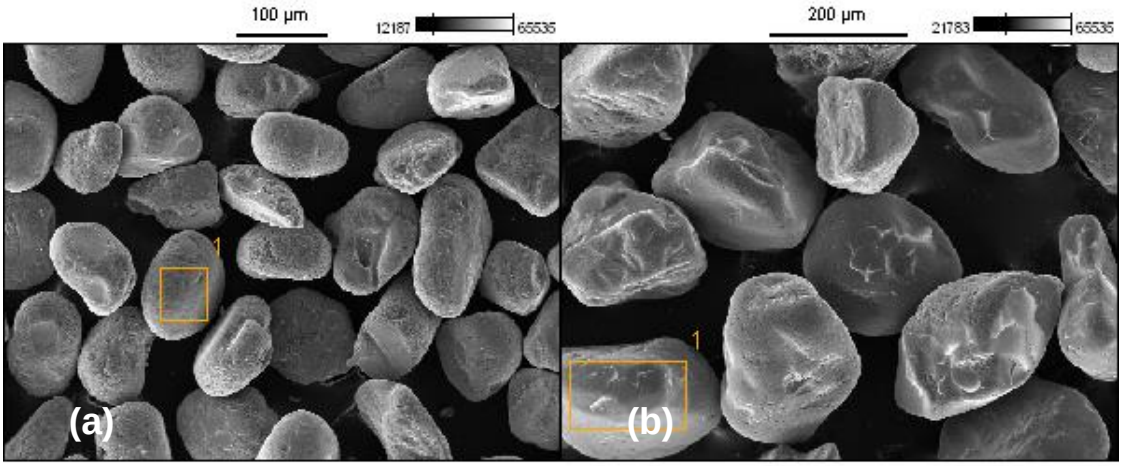


Figura 20 - Imagem por MEV da areia de Bojuru com tamanho de partícula de: (a) 0,090-0,106 mm e (b) 0,180- 0,212 mm (aumento de 100x)



Foi possível observar que a composição da areia varia de acordo com o tamanho de partícula. De acordo com a Tabela 12, isto se deve a presença de ferro, titânio e zircônio na areia, a areia com tamanho de partícula de 0,180-0,200 mm não apresentou estes elementos, e que promovem sorção dos co-extrativos.

Quando avaliados areias coletadas em diferentes locais, foi verificado que a areia de Bojuru apresentou melhores resultados (recuperações entre 70-120%) (Figura 21).

As recuperações para os analitos utilizando como suporte sólido areias coletadas na praia de Bojuru, na praia do Cassino e na localidade da Quitéria.

.

Tabela 12 - Análise EDX da areia de Bojuru com tamanho de partícula de 0,090-0,106 e 0,180-0,212 mm (% atômico).

	C	O	Mg	Al	Si	Ti	Mn	Fe	Zr
Amostra 1: 0,09-0,106 mm	12,56	48,70	0,56	1,07	0,65	22,90	0,47	12,69	
Amostra 2: 0,09-0,106 mm	9,92	54,11	0,27	0,51	0,64	20,61	0,60	13,36	
Amostra 3: 0,09-0,106 mm	9,42	52,40	0,42	1,31	2,16	20,41	0,60	12,85	
Amostra 4: 0,09-0,106 mm	16,22	36,00	0,54	0,71	1,38	23,08	1,95	19,85	0,19
Amostra 5: 0,09-0,106 mm	24,39	45,85	0,17	0,34	12,95	0,75		0,69	12,93
Amostra 6: 0,09-0,106 mm	11,83	48,82	1,15	0,81	0,85	20,26	0,37	15,67	
Amostra 7: 0,09-0,106 mm	10,46	49,59	0,96	1,11	1,46	19,64	0,47	16,04	
Média 0,09-0,106 mm	**13,54**	**47,92**	**0,58**	**0,84**	**2,87**	**18,24**	**0,64**	**13,02**	**1,87**
Amostra 1: 0,180-0,212 mm	26,41	48,54		0,14	24,75				
Amostra 2: 0,180-0,212 mm	20,44	53,25		0,55	25,50			0,25	
Amostra 3:0,180-0,212 mm	23,23	47,83		0,87	28,07				
Amostra 4:0,180-0,212 mm	24,18	46,38	0,16	0,81	27,99			0,22	
Amostra 5:0,180-0,212 mm	22,91	52,12		0,42	23,90			0,23	
Média 0,09-0,106 mm	**23,43**	**49,62**	**0,03**	**0,56**	**26,04**	**0**	**0**	**0,14**	**23,43**
Amostra 1-SP	23,54	47,64		0,51	14,11	0,48			13,66
Amostra 2-SP	22,20	47,78		0,23	14,49	0,22		0,31	14,77
Amostra 3-SP	9,05	52,14	0,91	2,78	5,43	17,08		12,27	
Amostra 4-SP	12,11	44,64	1,22	1,16	1,39	22,72	0,73	16,02	
Amostra 5-SP	18,83	56,35		0,32	12,00	0,38		0.32	11,81
Amostra 6-SP	11,13	47,86	0,35	0,76	1,02	24,08	1,51	13,29	
Amostra 7-SP	10,62	48,01		0,68	1,77	21,59	2,29	15,03	
Amostra 8-SP	16,57	51,25		0,24	31,45	0,19		0,30	
Amostra 9-SP	7,97	60,06	0,31	1,04	1,22	18,11	0,55	10,75	
Média SP	**14,67**	**50,64**	**0,31**	**0,86**	**9,21**	**11,65**	**0,56**	**8,50**	**4,47**

SP: sem peneiramento

Figura 21 - Recuperação dos analitos utilizando areia coletadas em diferentes locais. (Condição de extração: 0,5 g de amostra fortificada com a mistura de 27 padrões na concentração 0,1 mg kg^{-1}, 1 g de areia, maceração 5 min., 5 mL de acetato de etila, 20 mg de carvão ativo, banho ultrassônico 10 min., centrifugação 10179 $_x$g). Barras de erro indicam desvio padrão relativo (n=3).

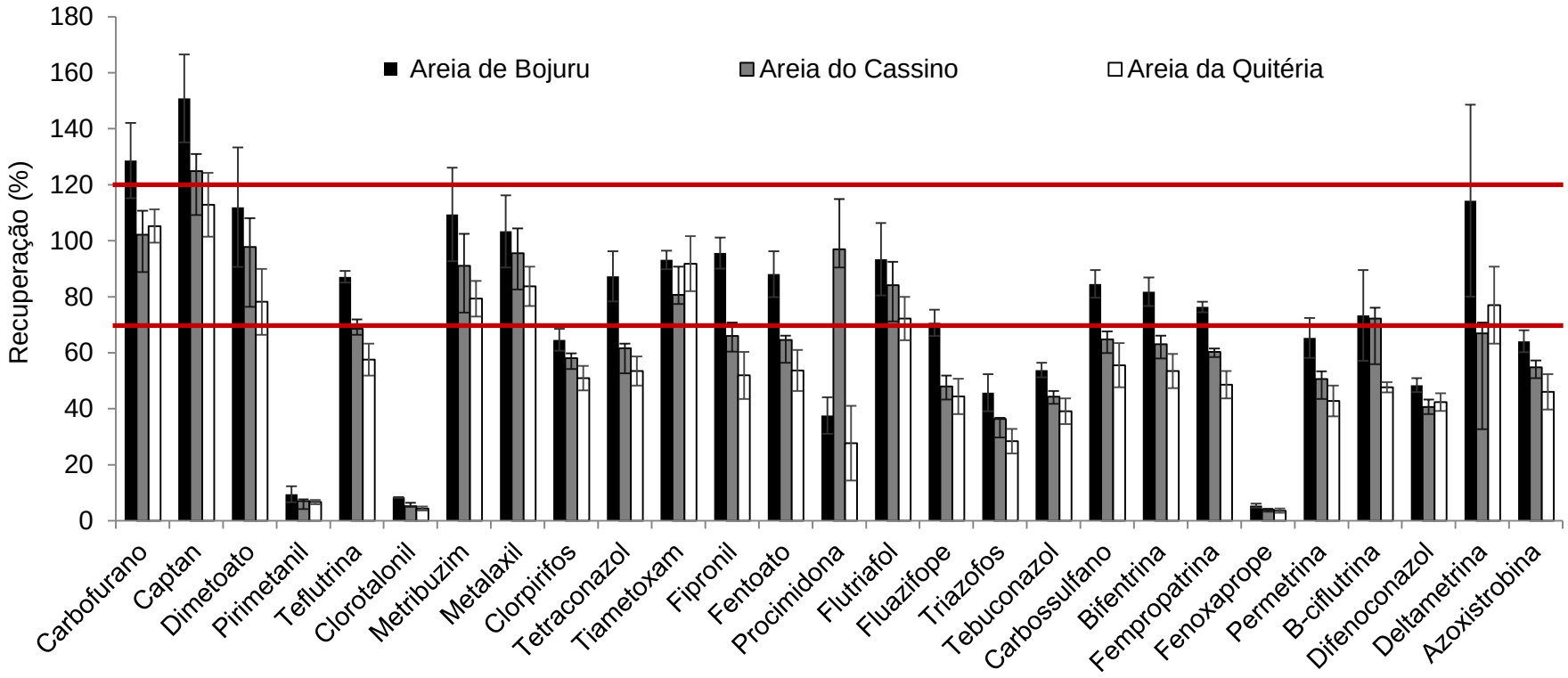
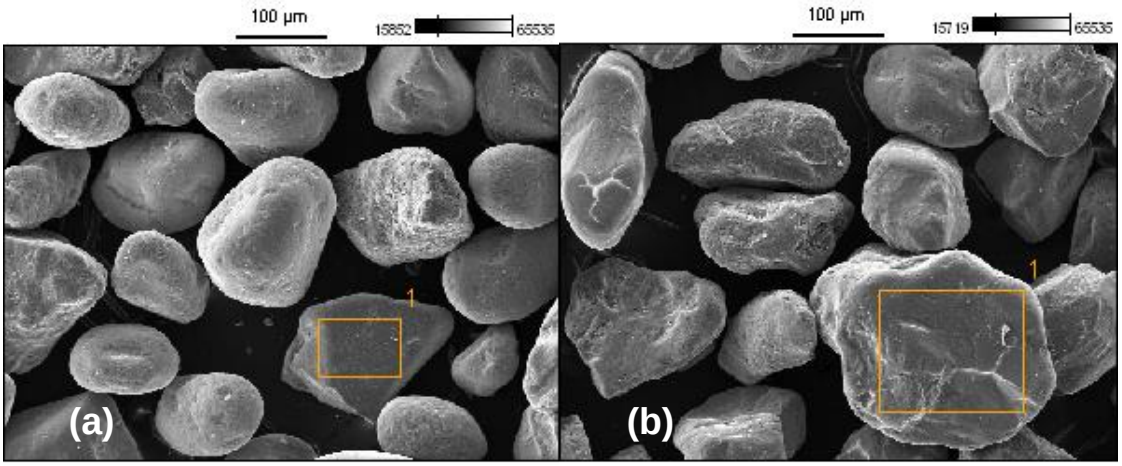


Figura 22 - Imagem por MEV da areia coletada na (a) localidade da Quitéria e (b)da praia do Cassino (aumento de 100x)



Na Figura 22 é possível observar diferença na estrutura das partículas de areia, a areia da localidade da Quitéria possui forma mais arredondada, mais uniforme, enquanto que a areia do Cassino possui estrutura irregular, devendo influenciar na ruptura da amostra e adsorção dos co-extrativos.

A Tabela 13 apresenta distribuição granulométrica, em percentual, das areias de Bojuru, praia do Cassino e da localidade da Quitéria.

Tabela 13 – Distribuição granulométrica das areias em estudo (em % mássico).

Tamanho de partícula (mm)	Bojuru	Cassino	Quitéria
<0,090	13,3	0,4	2,9
0,090-0,106	14,5	0,8	5,9
0,106-0,149	40,2	8,9	15,8
0,149-0,212	31,6	26,8	11,0
0,212-0,500	0,3	61,0	29,8

A Tabela 13 apresenta os percentuais atômicos dos elementos presentes nas amostras de areia de Bojuru, Cassino e Quitéria. Foi possível verificar que a areia da praia do Cassino e da Quitéria apresentam maior proporção de partículas maiores, com tamanho entre 0,212 e 0,5 mm. Conforme verificado nos ensaios que avaliaram a influência do tamanho de partícula nas recuperações, partículas maiores não

foram eficientes para romper a estrutura da amostra e devido a composição majoritária de sílica, na areia do Cassino, não foi capaz de adsorver somente os co-extrativos.

O teste de Tukey mostrou que a areia de Bojuru apresentou maior eficiência na MSPD realizada em amostras de couve, isto se deve a composição da areia (Tabela 14) cuja sua heterogeneidade guiou as análises de EDX em cada partícula de areia.

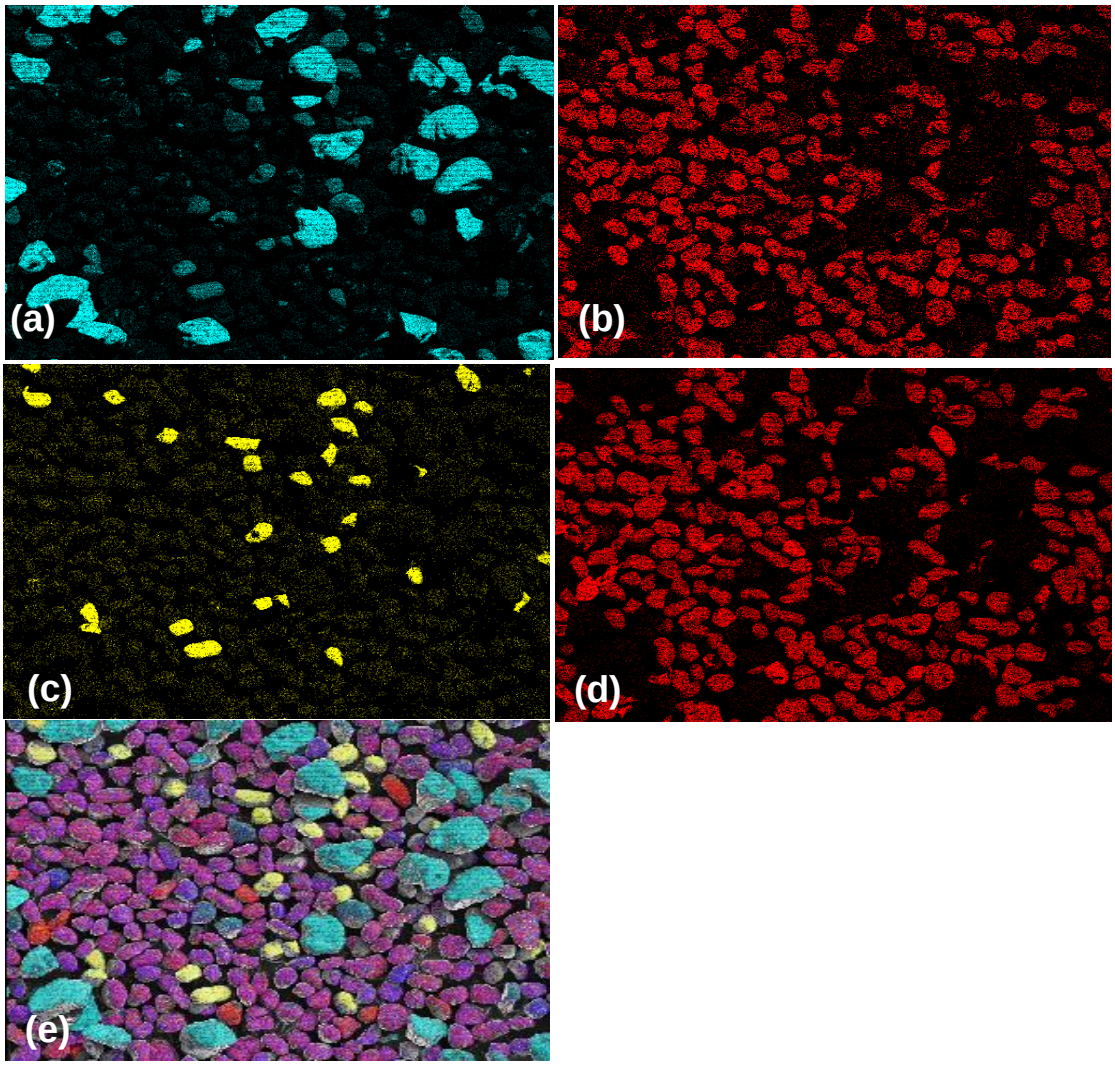
Na areia da praia do Cassino os elementos que predominam são oxigênio e silício, comuns nas areias utilizadas na MSPD (WIANOWSKA e DAWIDOWICZ, 2016; WIANOWSKA *et al.*, 2015; POZO *et al.*, 2010.

Tabela 14 - Análise EDX da areia da praia do Cassino e da Quitéria (% atômico).

	C	O	Mg	Al	Si	Ti	Fe	Zr
Amostra 1-Cassino	29,57	39,47	0,10	0,64	29,67			
Amostra 2-Cassino	18,16	47,72	0,74	6,49	20,25			
Amostra 3-Cassino	19,64	46,77	0,32	1,22	31,17			
Amostra 4-Cassino	23,47	45,14	0,33	0,87	28,65			
Média Cassino	**22,71**	**44,77**	**0,37**	**2,30**	**27,43**	**0**	**0**	**0**
Amostra 1-Quitéria	9,36	48,27	1,12	2,46	2,42	21,76	14,09	
Amostra 2-Quitéria	15,76	55,94		1,41	13,55	0,30	0,65	12,39
Amostra 3-Quitéria	12,37	44,36	6,56	10,57	4,13	1,44	8,67	
Amostra 4-Quitéria	12,41	55,36	0,16	3,03	27,94	0,20	0,90	
Amostra 5-Quitéria	15,15	55,93	0,15	1,51	13,97	0,22	0,50	12,56
Média Quitéria	**13,01**	**51,97**	**2,00**	**3,80**	**12,40**	**4,78**	**4,96**	**4,99**
Amostra 1-Bojuru	23.54	47,64		0,51	14,11	0,48		13,66
Amostra 1-Bojuru	22,20	47,78		0,23	14,49	0,22	0,31	14,77
Amostra 2-Bojuru	9,05	52,14	0,91	2,78	5,43	17,08	12,27	
Amostra 3-Bojuru	12,11	44,64	1,22	1,16	1,39	22,72	16,02	
Amostra 4-Bojuru	18,83	56,35		0,32	12,00	0,38	0,32	11,81
Amostra 5-Bojuru	11,13	47,86	0,35	0,76	1,02	24,08	13,29	
Amostra 6-Bojuru	10,62	48,01		0,68	1,77	21,59	15,03	
Amostra 7-Bojuru	16,57	51,25		0,24	31,45	0,19	0,30	
Amostra 8-Bojuru	7,97	60,06	0,31	1,04	1,22	18,11	10,75	
Amostra 9-Bojuru	23,54	47,64		0,51	14,11	0,48		13,66
Média Bojuru	**15,56**	**50,34**	**0,28**	**0,82**	**9,70**	**10,53**	**6,83**	**5,39**

A Figura 23 mostra a heterogeneidade das partículas de areia, com exceção das partículas que contem ferro e titânio concomitantemente, as demais tem composição distinta de cada elemento (zircônio e silício).

Figura 23 - Imagem por MEV da areia coletada em Bojuru, partículas contendo: (a) silício, (b) ferro, (c) zircônio, (d) titânio e (e) mistura de sílica, ferro, titânio e zircônio



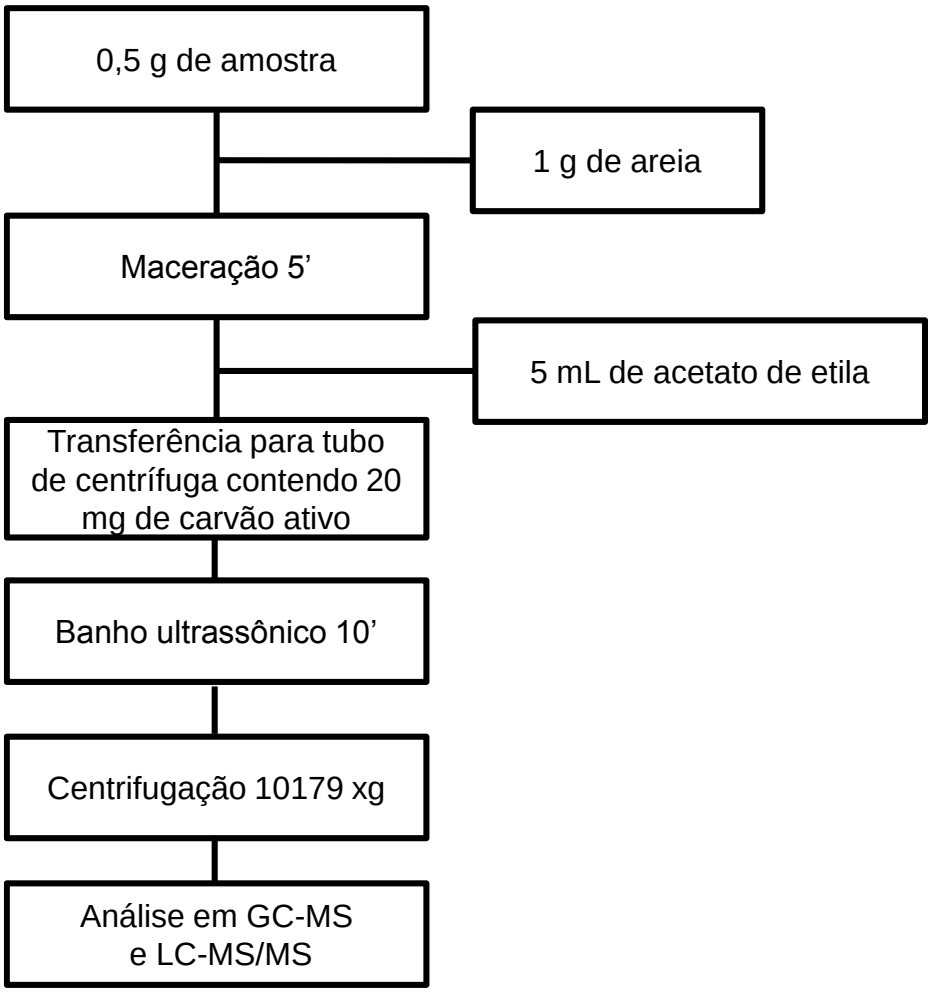
A areia do Cassino tem em sua composição elevado teor de silício, enquanto que a areia da localidade da Quitéria é composta principalmente por sílica e zircônio, enquanto na areia da praia de Bojuru que também contem sílica, zircônio, assim como as demais, se destaca pela presença óxidos de titânio e de ferro. Estes óxidos são de grande importância no preparo de amostra de matrizes complexas como a couve.

Comparado à sílica, o dióxido de zircônio apresenta duas vantagens principais: maior estabilidade quanto a variações no pH e maior estabilidade térmica (LANÇAS, 2009).

A diversidade de estruturas e composição de óxidos metálicos permite que estes materiais tenham uma ampla reatividade, através presença de grupos hidroxila e a superfície dos óxidos metálicos, proporcionado flexibilidade no desenvolvimento de métodos analíticos e oferecendo um potencial em condições mais robustas. A quantidade e as propriedades das hidroxilas dependem fortemente das categorias de óxidos metálicos. O óxido de titânio pode atuar tanto como trocador de ânions a pH baixo como trocador catiônico a um pH elevado (XU *et al*., 2016).

Assim, as condições do método desenvolvido são mostradas na Figura 24.

Figura 24 – Fluxograma do método desenvolvido



6.7 Validação do método proposto

Nos laboratórios de rotina, a necessidade de validação para cada matriz dificulta o emprego da técnica como rotina no laboratório. Em uma sequência de

amostras, pode haver vários tipos diferentes de extratos de amostra, e é muito oneroso para os analistas prepararem padrões no extrato de cada matriz.

Portanto, neles frequentemente são adotados atalhos em seus procedimentos de correspondência de matriz, usando uma determinada matriz que corresponda a um grupo com características semelhantes. Este procedimento é mais conveniente, mas pode levar a imprecisões porque o grau de intensificação induzida pela matriz é dependente da matriz (e às vezes varia entre amostras de uma mesma matriz). A fim de aumentar o escopo de matrizes, deve-se validar por grupo de matrizes com características semelhantes, como elevado teor de água, açúcares, pigmentos.

O método proposto foi validado conforme SANTE (2015), quanto aos parâmetros: linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, exatidão, precisão, efeito matriz e robustez.

6.7.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada para 27 compostos em GC-MS e 9 compostos em LC-MS/MS em amostras de couve (representando o grupo das hortaliças folhosas), cenoura (representando as raízes) e tomate (representando os frutos). A faixa linear de todas as curvas analíticas (curva no solvente e curva na matriz) foram construídas a partir do LOQ instrumental de cada composto, sempre garantindo que todas as curvas tivessem no mínimo 5 níveis de concentração. Entretanto, as curvas analíticas responderam em diferentes faixas de concentração, levando em conta a característica de cada analito.

Os resultados para as curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato de couve podem ser observados na Tabela 13. Os coeficientes de determinação (R^2) variaram entre 0,99 e 1,00, estando de acordo com os valores recomendados segundo as orientações da ANVISA ($r \geq 0,99$) e INMETRO ($\geq 0,90$) para todos os analitos. A linearidade foi garantida na faixa de trabalho em estudo para cada agrotóxico com a remoção de pontos discrepantes do conjunto de dados, sendo o percentual de valores residuais inferiores a 20 %, conforme preconiza a SANTE (2015).

Tabela 15 – Curvas no solvente e nos extratos de couve, tomate e cenoura obtidas por GC-MS e LC-MS/MS

Analitos	Faixa Linear (mg kg^{-1})	Curva no solvente	R^2	Couve	R^2	Tomate	R^2	Cenoura	R^2
Carbofuran	0,002-0,5	y=264818x-1933	0,9962	y=276722x+3052	0,9947	y=471582x+26	0,9991	y= 148722x+10	0,9991
Captan	0,005-0,5	y=15352x–21	0,9920	y=86080x+762	0,9912	y=159116x+12	0,9989	y=74667x+5	0,9989
Dimetoato	0,01-1,0	y=153001x–3529	0,9933	y=532142x–6464	0,9975	y=354417x–351	0,9960	y=200889x+41	0,9960
Pirimetanil	0,01-1,0	y=1075877x-3709	0,9975	y=1462019x–3132	0,9999	y=198684x+157	0,9985	y=31000x-10	0,9985
Teflutrina	0,05-1,0	y=969797x+900	0,9995	y=1196622x+552	1,0000	y=1157424x+226	0,9993	y=1157424x+226	0,9993
Clorotalonil	0,01-1,0	y=318183x–5015	0,9971	y=370869x–4075	0,9981	y=395061-137	0,9925	y=7388x–43	0,9981
Metribuzim	0,05-1,0	y=243677x–1569	0,9978	y=431638x–2510	0,9991	y=519287x–119	0,9994	y=216889x+271	0,9994
Metalaxil	0,05-1,0	y=172153x+237	0,9989	y=205285x+3085	0,9999	y=522082x–136	0,9966	y=216111x+17	0,9999
Clorpirifos	0,05-1,0	y=302210x+1	0,9992	y=424501x+4075	0,9988	y=370760x+321	0,9932	y=11626222x–21139	0,9932
Tetraconazol	0,01-1,0	y=429348x–925	0,9947	y=263525x+535	0,9994	y=343869x–89	0,9940	y=184611x–24	0,9940
Tiametoxam	0,01-1,0	y=65556x–1173	0,9931	y=81043x+1308	0,9912	y=93520x+279	0,9977	y=41722x+45	0,9977

Analitos	Faixa Linear (mg kg^{-1})	Curva no solvente	R^2	Couve	R^2	Tomate	R^2	Cenoura	R^2
Fipronil	0,01-1,0	y=93302x–408	0,9947	y=183359x+149	0,9999	y=96828x+54	0,9978	y=39333x+45	0,9978
Fentoato	0,005-1,0	y=3189493x–2383	0,9962	y=547296x–2672	0,9995	y=316773x–32	0,9998	y=1689388x–591	0,9998
Procimidona	0,01-1,0	y=201637x+3051	0,9963	y=324663x+9342	0,9903	y=251575x+490	0,9984	y=317666x+137	0,9984
Flutriafol	0,01-1,0	y=710726x–3412	0,9989	y=1010702x–1711	0,9999	y=1382863x–375	0,9989	y=593166x–48	0,9989
Fluazifope	0,005-0,5	y=534215x–3316	0,9942	y=779101x+2195	0,9987	y=462458x–160	1,0000	y=215277x–28	1,0000
Triazofos	0,05-1,0	y=206628x–3005	0,9946	y=339559x–1759	0,9998	y=97705x+68	0,9998	y=48000x–5	0,9998
Tebuconazol	0,01-1,0	y=286208x–2384	0,9961	y=429224x–1196	0,9998	y=98883x+245	0,9997	y=56444x-12	0,9997
Carbosulfan	0,01-1,0	y=376062x–1592	0,9973	y=620711x+5267	0,9996	y=218945x+728	0,9942	y=165166x-718	0,9942
Bifentrina	0,005-0,5	y=441388x–2783	0,9983	y=1136901x –8	0,9999	y=787369x +145	0,9990	y=259666x +3	0,9990
Fempropatrina	0,01-1,0	y=465392x–1718	0,9989	y=609936x+9053	0,9990	y=345020x+382	0,9929	y=245777x+8	0,9929
Fenoxaprope	0,01-1,0	y=295628x–2308	0,9963	y=387863x–594	0,9997	y=11493x+28	0,9997	y=175555x–21	0,9997
Permetrina	0,05-1,0	y=640601x–3279	0,9980	y=797216x–804	0,9997	y=454924x-40	0,9976	y=130500x–26	0,9976
β-ciflutrina	0,05-1,0	y=86450x–450	0,9975	y=112719x+1077	0,9995	y=88958x+408	0,9998	y=44277x–7	0,9998

Analitos	Faixa Linear (mg kg^{-1})	Curva no solvente	R^2	Couve	R^2	Tomate	R^2	Cenoura	R^2
Difenoconazol	0,05-1,0	y=411094x-837	0,9979	y=444999x+1221	0,9982	y=174732x+329	0,9912	y=85000x+55	0,9912
Deltametrina	0,05-1,0	y=27182x-797	0,9903	y=29548x+43388	0,9971	y=67664x+77	0,9957	y=576555x+485	0,9957
Azoxistrobina	0,05-1,0	y=270449x-3353	0,9966	y=344239x–3321	0,9981	y=112287x+95	0,9949	y=34222x+6	0,9949
2,4-D	0,005-0,5	y=28442x+40	0,9913	y=20509x-60	0,9983	y=28226x+33	0,9999	y=33445x-21	0,9992
Acefato	0,005-0,5	y=79336x+1283	0,9939	y=69406x+902	0,9992	y=80819x+1141	0,9990	y=89790x+1094	0,9989
Carbendazim	0,005-0,5	y=264276x+3065	0,9985	y=211175x+334	0,9927	y=316282x+2152	0,9988	y=358638x–184	0,9995
Cimoxanil	0,05-1,0	y=42844x+36	0,9993	y=34132x-167	0,9994	y=41820x-70	0,9993	y=42218x-111	0,9991
Clorantraniliprole	0,005-0,5	y=34411x+24	0,9959	y=35437x+1135	0,9985	y=47528x +10	0,9999	y=2663x+11	0,9984
Imidacloprido	0,005-0,5	y=71633x+8	0,9996	y=59706x+736	1,0000	y=55174x+271	0,9997	y=61761x-25	0,9987
Pimetrozina	0,005-0,5	y=299392x+80	0,9997	y = 226414x-591	0,9986	y=286808x+5	0,9996	y=329667x-880	0,9993
Piraclostrobina	0,005-0,5	y=172823x+2812	0,9960	y=167108x+143	0,9997	y=206540x + 360	0,9999	y=201780x+107	0,9999
Tiofanato metílico	0,1-1,0	y=73632x-31794	0,9932	y=47717x+124	0,9965	y=100267x-6563	0,9999	y=109865x-7683	0,9973

6.7.2 Limite de quantificação

A Tabela 16 apresenta os limites de quantificação do instrumento e do método para as três matrizes em estudo.

Tabela 16 - Limites de Quantificação do instrumento (em mg L^{-1}) e do método para as amostras de couve, cenoura e tomate (em mg kg^{-1}) por GC-MS e LC-MS/MS*.

Analitos	LOQ Instrumento (mg L^{-1})	LOQ Couve (mg kg^{-1})	LOQ Cenoura (mg kg^{-1})	LOQ Tomate (mg kg^{-1})
Carbofuran	0,0005	0,002	0,01	0,02
Captan	0,001	0,005	0,01	0,2
Dimetoato	0,005	0,01	0,02	0,2
Pirimetanil	0,0005	0,01	0,05	0,1
Teflutrina	0,0005	0,05	0,01	0,05
Clorotalonil	0,005	0,01	0,05	0,2
Metribuzim	0,001	0,05	0,05	0,1
Metalaxil	0,005	0,05	0,05	0,2
Clorpirifós	0,005	0,05	0,1	0,1
Tetraconazol	0,005	0,01	0,02	0,02
Tiametoxam	0,01	0,01	0,1	0,1
Fipronil	0,005	0,01	0,1	0,2
Fentoato	0,001	0,005	0,01	0,05
Procimidona	0,0005	0,01	0,01	0,01
Flutriafol	0,005	0,01	0,01	0,02
Fluazifope	0,005	0,005	0,05	0,01
Triazofós	0,005	0,05	0,1	0,01
Tebuconazol	0,005	0,01	0,05	0,2
Carbossulfano	0,001	0,01	0,1	0,2
Bifentrina	0,0005	0,005	0,01	0,2
Fempropatrina	0,005	0,01	0,05	0,2
Fenoxaprope	0,005	0,01	0,1	0,1
Permetrina	0,005	0,05	0,05	0,1
β-ciflutrina	0,005	0,05	0,1	0,2
Difenoconazol	0,01	0,05	0,1	0,1
Deltametrina	0,005	0,05	0,1	0,1
Azoxistrobina	0,005	0,05	0,05	0,2

Analitos	LOQ Instrumento (mg L^{-1})	LOQ Couve (mg kg^{-1})	LOQ Cenoura (mg kg^{-1})	LOQ Tomate (mg kg^{-1})
2,4-D*	0,01	0,005	0,1	0,5
Acefato*	0,005	0,005	0,05	0,05
Carbendazim*	0,005	0,005	0,01	0,01
Cimoxanil*	0,005	0,05	0,05	0,1
Clorantraniliprole*	0,005	0,005	0,05	0,1
Imidacloprido*	0,005	0,005	0,05	0,05
Pimetrozina*	0,001	0,005	0,01	0,1
Piraclostrobina*	0,005	0,005	0,01	0,1
Tiofanato metílico*	0,5	0,1	0,5	0,5

*Análise por LC-MS/MS

De acordo com a Tabela 16, os valores de LOQ do instrumento para todos os analitos variaram entre 0,005 e 0,05 mg L^{-1}. Uma vez definidos os LOQi para cada tipo de matriz, as amostras foram fortificadas em concentração equivalente para verificar a eficiência de extração nestes níveis.

Todos os compostos avaliados neste trabalho tem seu uso permitido no Brasil, porém na prática um agrotóxico tem seu uso permitido para uma determinada cultura, mas é utilizado em outras culturas. Os limites máximos de resíduos (LMR) para esses agrotóxicos variam de 0,02 a 2 mg kg^{-1} de acordo com a legislação brasileira. Os valores de LOQs obtidos são iguais ou inferiores aos limites máximos de resíduos de acordo com a legislação brasileira e europeia.

Os limites de quantificação para amostras de tomate e cenoura foram superiores aos obtidos para couve para a maioria dos analitos, isto se deve provavelmente ao efeito matriz.

6.7.3 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado pela comparação da inclinação das curvas analíticas no extrato da matriz e no solvente. As maiorias dos compostos apresentaram efeito matriz médio em couve. O efeito matriz encontrado está de acordo com trabalhos da literatura para matrizes complexas.

Em outros trabalhos que avaliaram o efeito de matriz. Lehotay e colaboradores (2010) observaram efeito matriz alto na extração de agrotóxicos pelo

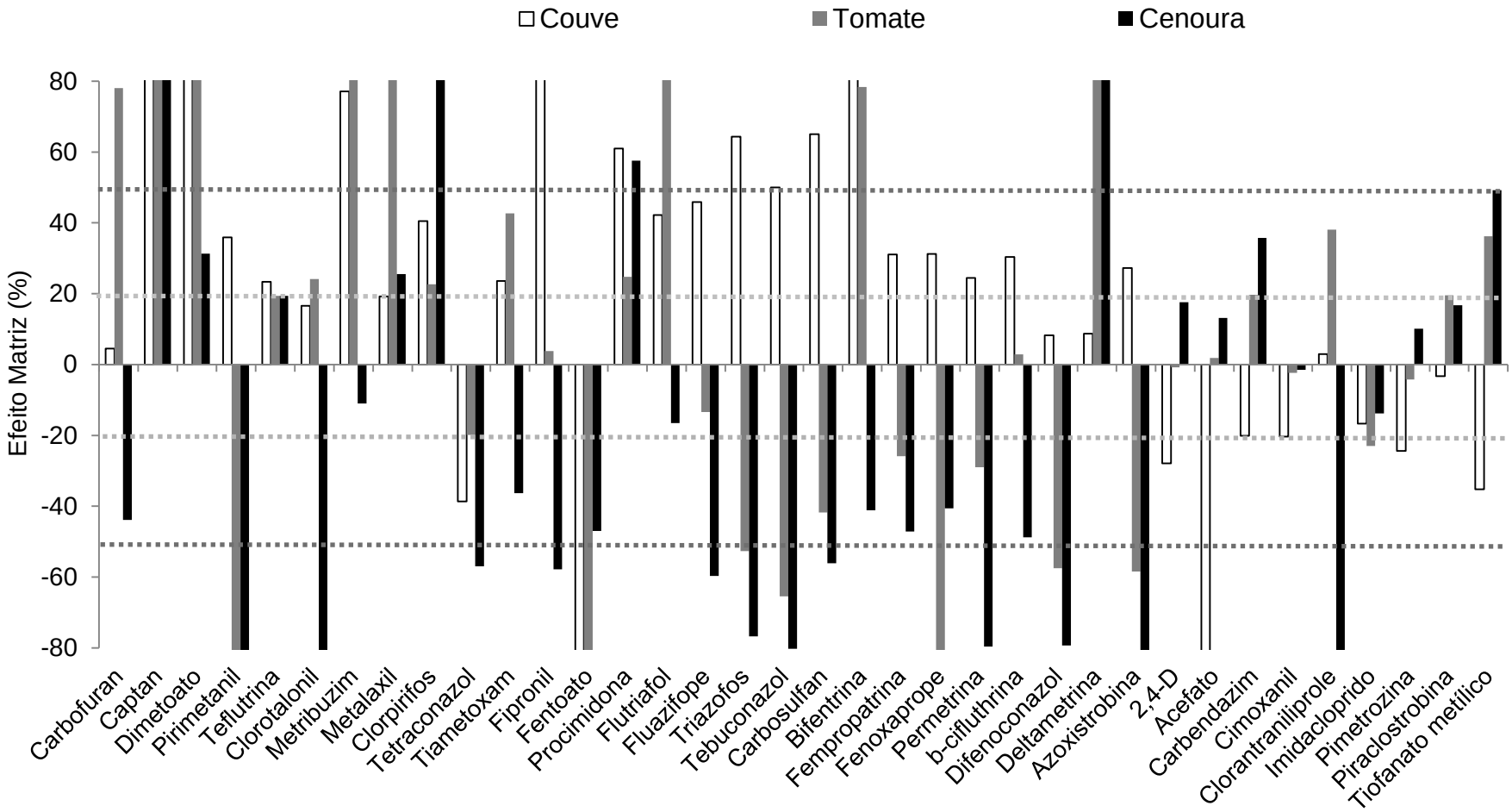
QuEChERS acetato em matrizes complexas como lima. Guedes e colaboradores (2016) também observaram efeito matriz alto para a maioria dos agrotóxicos em goiaba quando utilizado o método QuEChERS original.

A distribuição do efeito matriz depende da combinação da matriz com o analito. Agrotóxicos com grupos carboxila, carbamato, fosfato, hidroxila, triazóis, são os tipos mais suscetíveis de analitos ao efeito matriz (LI *et al.,* 2012).

Quando há presença de efeito matriz, não deve ser utilizada a curva padrão em solvente, visto que os resultados calculados para os agrotóxicos são superestimados por GC-MS e subestimado por LC-MS/MS. Órgãos regulamentadores como EPA e FDA permitem a adição de padrões internos para corrigir o efeito matriz para a análise de agrotóxicos, porém devido à ampla diversidade de propriedades físicas e químicas destes compostos e matrizes, é improvável que exista um único composto capaz de resolver totalmente o efeito de resposta cromatográfica induzida pela matriz (ANASTASSIADES *et al*., 2003b).

A diversidade de matrizes e as diferentes possibilidades de interações que podem ocorrer entre a amostra- agrotóxico- sistema cromatográfico tornam difícil estabelecer uma tendência para efeito matriz de cada agrotóxico em cada matriz..

Figura 25 - Efeito matriz (%) nas matrizes de estudo para couve, tomate e cenoura por GC-MS e LC-MS/MS.



Os carotenoides presentes majoritariamente em tomate e cenoura (licopeno e β-caroteno, respectivamente) não apresentam hidroxila em sua estrutura, sendo mais apolares que a luteína, carotenoide presente em maior quantidade na couve. As matrizes tomate e cenoura apresentaram maior efeito matriz quando comparado a couve possivelmente devido a co-extração de pigmentos carotenoides mais apolares pelo acetato de etila. O maior efeito matriz para estas culturas corrobora com os maiores limites de quantificação, indicando a necessidade do uso de um sorvente para remoção destes interferentes para melhora da detectabilidade.

6.7.4 Exatidão e precisão

A avaliação da eficiência de extração pela foi avaliada pela recuperação. Recuperações na faixa de 60 a 130 % para a repetibilidade foram obtidos para a maioria dos analitos (Tabela 17). Todos analitos apresentaram valores dentro da faixa entre 60 e 140 %, estando de acordo com o guia de validação SANTE (2015) . Para a precisão intermediária, a maioria dos compostos apresentou valores dentro da faixa aceitável, ficando dentro da faixa entre 60 e 140%.

Trifenilfosfato foi utilizado como padrão de recuperação, sendo obtida recuperação entre e 70 e 120 % com RSD (%) inferior a 20 %.

Tabela 17 – Recuperações (R) e desvio padrão relativo (RSD) para as amostras de couve fortificadas em diferentes níveis por GC-MS e LC-MS/MS*

Agrotóxicos	Repetibilidade						Precisão Intermediária			
	1 LOQ		5 LOQ		10 LOQ		1 LOQ		10 LOQ	
	R (%)	RSD	R (%)	RSD	R (%)	RSD	R (%)	RSD	R (%)	RSD
Carbofurano	110	6	105	5	73	19	64	22	86	21
Captan	64	19	122	16	86	20	66	18	89	11
Dimetoato	71	15	93	6	76	16	74	20	91	7
Pirimetanil	77	20	114	20	108	5	120	19	120	5
Teflutrina	110	6	105	3	116	2	99	18	97	19
Clorotalonil	120	16	78	2	83	21	94	5	122	7
Metribuzim	109	6	114	7	114	21	102	15	81	17
Metalaxil	71	18	98	1	115	19	69	19	72	18
Clorpirifos	120	15	101	17	73	18	89	14	71	17
Tetraconazol	91	18	98	4	89	12	103	20	91	20
Tiametoxam	87	20	120	14	120	17	68	18	80	12
Fipronil	77	11	118	12	74	7	117	12	70	17
Fentoato	101	9	105	3	70	5	67	12	99	18
Procimidona	75	20	120	15	100	4	86	16	82	18
Flutriafol	101	8	114	9	115	4	115	10	83	16
Fluazifope	68	19	85	16	110	13	120	12	80	13
Triazofos	70	20	79	11	89	6	88	9	92	20
Tebuconazol	71	15	103	4	82	5	72	20	77	16
Carbossulfano	67	11	78	20	89	8	80	15	112	8
Bifentrina	93	5	104	2	69	9	71	14	100	17
Fempropatrina	65	18	79	11	79	9	101	10	120	18
Fenoxaprope	67	13	69	20	120	12	64	20	70	7
Permetrina	114	18	105	7	87	4	91	20	107	14
β-ciflutrina	74	15	105	19	71	5	99	17	73	20
Difenoconazol	84	9	110	17	70	4	74	13	85	19
Deltametrina	75	12	100	14	91	4	105	4	81	19
Azoxistrobina	71	5	84	14	84	2	112	12	88	20

Agrotóxicos	Repetibilidade						Precisão Intermediária			
	1 LOQ		5 LOQ		10 LOQ		1 LOQ		10 LOQ	
	R (%)	RSD	R (%)	RSD	R (%)	RSD	R (%)	RSD	R (%)	RSD
2,4-D*	95	20	120	11	77	16	107	18	115	12
Acefato*	98	1	96	2	102	4	103	2	108	2
Carbendazim*	55	11	71	10	77	12	97	20	114	15
Cimoxanil*	84	13	120	3	94	14	110	9	109	6
Clorantraniliprole*	73	19	120	13	71	19	113	14	69	12
Imidacloprido*	93	6	140	3	86	14	117	9	117	9
Pimetrozina*	65	18	127	15	71	15	106	10	120	12
Piraclostrobina*	79	21	120	8	74	18	105	5	105	16
Tiofanato metílico*	97	7	120	16	71	12	103	20	120	20

*Análise por LC-MS/MS

A precisão do método foi expressa em desvio padrão relativo (RSD). O método se mostrou preciso uma vez que os valores de RSD ficaram entre 1 e 20 % para a repetibilidade e entre 1 e 22 % para a precisão intermediaria.

De acordo com os guias de validação para análise de agrotóxicos em alimentos, os valores de recuperação devem estar entre 60 e 140% com valores de RSD ≤ 20% (SANTE, 2015).

Cabe salientar que recuperações entre 60 e 140 % em analises multirresíduo de rotina são aceitas (SANTE, 2015).

6.7.5 Robustez

A robustez foi avaliada conforme SANTE (2015), sendo realizados ensaios de recuperação em triplicata de diferentes grupos de amostras. Foram obtidas recuperações entre 60 e 140 %, com desvios inferiores a 20 %, nas matrizes de tomate e cenoura, conforme a Tabela 18. Sendo assim, o método desenvolvido se mostrou robusto, e apto a ser utilizado em diferentes grupos de matrizes de alimentos.

Tabela 18 - Recuperações (R) e desvio padrão relativo para amostras de cenoura e tomate por GC-MS e LC-MS/MS*.

Agrotóxicos	Cenoura				Tomate			
	1 LOQ		10 LOQ		1 LOQ		10 LOQ	
	R (%)	RSD	R (%)	RSD	R (%)	RSD	R (%)	RSD
Carbofurano	106	4	120	22	94	5	114	9
Captan	99	19	88	9	110	11	84	12
Dimetoato	69	15	129	18	111	19	76	19
Pirimetanil	120	18	68	17	70	15	118	11
Teflutrina	77	18	105	4	126	16	82	14
Clorotalonil	79	17	91	16	124	15	107	17
Metribuzim	72	22	102	2	65	21	79	16
Metalaxil	119	12	107	5	86	11	92	6
Clorpirifos	84	20	117	14	111	22	70	12
Tetraconazol	117	11	82	16	69	18	97	23
Tiametoxam	112	20	69	7	69	14	104	3
Fipronil	82	14	110	12	63	13	120	16
Fentoato	102	2	118	1	122	17	78	20
Procimidona	76	15	100	20	68	15	70	13
Flutriafol	103	16	97	2	114	16	79	17
Fluazifope	89	16	92	6	88	18	82	14
Triazofos	80	13	67	19	70	14	76	20
Tebuconazol	90	11	81	15	71	19	87	10
Carbossulfano	120	18	98	6	65	16	119	20
Bifentrina	92	6	101	3	80	20	72	19
Fempropatrina	107	5	101	2	112	18	76	20
Fenoxaprope	67	22	102	5	65	21	70	15
Permetrina	119	11	104	3	105	4	81	15
B-ciflutrina	71	19	91	20	67	17	125	18
Difenoconazol	68	20	79	17	74	16	93	20
Deltametrina	122	19	79	19	65	18	61	17
Azoxistrobina	97	15	89	14	71	17	104	16
Acefato	104	1	120	5	97	2	100	5
2,4-D*	74	5	86	3	122	8	84	4
Carbendazim*	88	12	103	10	117	13	120	13
Cimoxanil*	120	6	88	4	101	6	75	7
Clorantraniliprole*	60	20	96	4	79	5	104	20
Imidacloprido*	100	4	100	4	100	4	86	13
Pimetrozina*	65	1	95	7	99	21	86	17
Piraclostrobina*	102	1	108	7	70	7	125	12
Tiofanato metílico*	80	17	127	16	79	20	76	4

6.7.6 Aplicabilidade

O método proposto foi aplicado na análise de 18 tipos de frutas e hortaliças, como: couve, tomate, morango, alface e pimentão, para verificação da ocorrência dos 36 agrotóxicos na zona rural do município de Rio Grande, RS, Brasil. A quantificação foi realizada empregando a quantificação por adição de padrão, com mínimo 5 níveis de concentração, para compensar qualquer efeito de matriz. Trifenilfosfato foi adicionado nas amostras como padrão de recuperação para avaliar a eficiência de extração durante o preparo das amostras.

A quantificação das amostras foi realizada pelo método de adição padrão. Este modo de padronização permite uma quantificação mais correta da amostra uma vez que os efeitos causados pela matriz e as perdas na extração são considerados na construção da curva analítica (SANTE, 2015).

Para a quantificação pelo método de adição padrão, concentrações conhecidas da mistura dos padrões foram adicionadas nas amostras em pelo menos 5 níveis de concentrações e a amostra sem adição foi analisada em triplicata. Obtendo-se a equação da reta ($y = a + bx$) na qual a concentração do analito é determinada através da extrapolação da curva analítica. As amostras e a curva foram extraídas e as determinações realizadas por GC-MS e LC-MS/MS.

A quantidade de pirimetanil encontrado em morango está de acordo com a legislação brasileira e europeia. O inseticida tiametoxam foi encontrado em concentração permitida para morango, no entanto está acima do limite permitido pelos países da União Europeia.

Acefato foi encontrado em quantidade dentro do limite máximo permitido para tomate. De acordo com a ANVISA (2015), o acefato apresentou maior percentual de detecções irregulares, tendo sido detectado irregularmente em 5,09% das amostras monitoradas. A presença deste agrotóxico já era esperada, uma vez que o acefato representa o inseticida mais comercializado de acordo com o IBGE (2015).

Entre os agrotóxicos encontrados, somente captan e clorpirifós tem modo de ação pelo contato, os demais apresentam modo de ação sistêmico, o que indica que uma limpeza ou retirada de casca não remove estes agrotóxicos.

As amostras que apresentaram maior ocorrência de agrotóxicos foram morango e tomate, de acordo com a ANVISA (2012), estes alimentos têm apresentado maior índice de irregularidades.

Tabela 19 - Resultados da aplicabilidade do método em amostras de frutas e hortaliças.

Matriz	Morango				Tomate	
	Amostra 2	Amostra 6	Amostra 7	LMR	Amostra 8	LMR
Captan	0,01±0,006	-	-	NA	-	
Clorpirifós	0,02±0,001	-	-	NA	-	
Tiametoxam	-	0,1±0,02	-	0,1	-	
Dimetoato	-	-	0,06±0,001	NA	-	
Pirimetanil	-	-	0,05±0,001	1,0	-	
Acefato	-	-	-		0,45±0,004	NA
Tebuconazol	-	-	-		0,30±0,002	0,1

NA: não autorizado para cultura

Arora e colaboradores (2017) observaram a toxicidade diferencial de combinações binárias de agrotóxicos organofosforados e carbamatos em condições in vitro. A toxicidade dada pela combinação piretróides com organofosforados e carbamatos apresentou efeito sinérgico. A amostra de tomate apresentou piretróide e carbamato, no entanto a ausência de legislação considerando a utilização concomitante destes compostos, ao consumo dos alimentos e a toxicidade destes compostos é de grande necessidade para garantia da segurança dos alimentos.

6.8 Comparação entre as técnicas de preparo de amostra

Com relação à extração de agrotóxicos em frutas e hortaliças, no Brasil têm sido utilizados, os métodos QuEChERS e Mini-Luke modificado (THE NETHERLANDS, 1996). Estes métodos apresentam uma boa extração dos analitos, no entanto quando comparados a MSPD apresentam algumas desvantagens como maior custo de reagentes, maior volume de solvente utilizado, implicando na maior exposição do analista, maior toxicidade dos solventes utilizados e maior quantidade de resíduo gerado.

A Tabela 20 apresenta o custo de 100 análises utilizando as técnicas de preparo de amostra oficiais e a MSPD otimizada neste trabalho.

Tabela 20 - Comparação entre as técnicas de preparo de amostra oficiais e a proposta neste trabalho

	QuEChERS	Mini-Luke modificado	Método proposto
Sorvente/suporte sólido	415 g sulfato de magnésio 2,5 g PSA	1500 g sulfato de sódio	2 g carvão ativo
Solvente	1000 mL acetonitrila	2000 mL de acetona 2000 mL de éter de petróleo 1000 mL de diclorometano	500 mL acetato de etila
Sais	100 g cloreto de sódio		-
Custo (US$)	165,7	292,9	23,8
Volume de solvente consumido (mL)	1000	5000	500
Classificação do solvente quanto aos princípios da Química Verde*	Problemático	Perigoso	Recomendado
Volume de resíduo gerado (mL)	2000	6500	550

*Prat *et al*., 2013; Prat *et al*., 2014.

7 CONCLUSÕES

O método proposto possibilita determinação de multiclasses de agrotóxicos com diferentes propriedades físico-químicas em diversas matrizes de alimentos por GC-MS e LC-MS/MS, este método apresenta baixo custo e menos tóxico ao analista e ao meio ambiente, atendendo aos princípios da Química Analítica Verde.

É possível utilizar um suporte sólido alternativo natural, como a areia da praia de Bojuru, na MSPD para determinação de multiclasses de agrotóxicos em frutas e hortaliças sem perdas na eficiência de extração.

As condições cromatográficas selecionadas para determinação dos agrotóxicos em estudo por GC-MS e LC-MS/MS permitiu a identificação de 36 compostos estudados.

O método validado demonstrou exatidão, precisão e robustez aceitáveis e LOQs adequados aos LMRs estipulados nas legislações vigentes.

O método desenvolvido apresenta caráter inédito, visto que apresenta aplicação da MSPD para extração de multiclasses de agrotóxicos com diferentes propriedades físico-químicas além de utilizar areia coletada na praia como suporte sólido.

8 TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos gerados no desenvolvimento deste trabalho foram coletados, separados em frascos devidamente rotulados de acordo com as normas definidas pela comissão de resíduos da Escola de Química e Alimentos, e armazenados para posterior recolhimento e tratamento por empresa contratada pela Universidade. Além disso, estão sendo desenvolvidos e otimizados, no LACOM, trabalhos com o objetivo de degradação dos resíduos de agrotóxicos gerados no laboratório.

9 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar ensaios sem a utilização de suporte sólido e de banho ultrassônico a fim de avaliar a sua influência na MSPD para extração de agrotóxicos.
- Avaliar o perfil de carotenóides dos alimentos a fim de relacionar com o efeito matriz

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHILASH, P. C. A.; SINGH, V.; SINGH, N. Simplified determination of combined residues of lindane and other HCH isomers in vegetables, fruits, wheat, pulses and medicinal plants by matrix solid-phase dispersion (MSPD) followed by GC-ECD. **Food Chemistry**, v. 113, p. 267-271, 2009.

ABREU-VILLAÇA, Y; LEVIN, E. D. Developmental neurotoxicity of succeeding generations of insecticides. **Environment International**, v. 99, p. 55-77, 2017.

ALBERO, B.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; MIGUEL, E.; TADEO, J. L. Application of matrix solid-phase dispersion followed by GC–MS/MS to the analysis of emerging contaminants in vegetables. **Food Chemistry**, v. 217, p. 660-667, 2017.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-43, 2003a.

ANASTASSIADES, M.; MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, p. 163–184, 2003b.

ANDRADE, G. C. R. M. et al. Determination of pesticide residues in tomato using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 22, n. 9, p. 1701-1708, 2011.

ANVISA (2016). Agrotóxicos e Toxicologia. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015.

ANVISA (2013). Agrotóxicos e Toxicologia. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2011 e 2012.

ANVISA (2015). Nota técnica de reavaliação do ingrediente ativo de agrotóxico carbofurano.

ANVISA. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 889, de 29 de maio de 2003.

ARABI, M.; GHAEDI, M.; OSTOVAN, A. Development of dummy molecularly imprinted based on functionalized silica nanoparticles for determination of acrylamide in processed food by matrix solid phase dispersion. **Food Chemistry**, v. 210, p. 78-84, 2016.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 6, 2008.

ARORA, S.; BALOTRA, S.; PANDEY, G. KUMAR, A. Binary combinations of organophosphorus and synthetic pyrethroids are more potent acetylcholinesterase inhibitors than organophosphorus and carbamate mixtures: An in vitro assessment. **Toxicology Letters**, v. 268, p. 8-16, 2017.

BARFI, B.; ASGHARI, A.; RAJABI, M.; BARFI, A.; SAEIDI, I. Simplified miniaturized ultrasound-assisted matrix solid phase dispersion extraction and high performance liquid chromatographic determination of seven flavonoids in citrus fruit juice and human fluid samples: Hesperetin and naringenin as biomarkers. **Journal of Chromatography A**, v. 1311, p. 30-40, 2013.

BARKER, S. A. Matrix solid phase dispersion (MSPD). **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 151-162, 2007.

BARKER, S. A. Matrix solid-phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 115-127, 2000.

BARKER, S. A.; LONG, A. R.; HINES, M. E. Disruption and fractionation of biological materials by matrix solid-phase dispersion. **Journal of Chromatography**, v. 529, p. 23-34, 1993a.

BARKER, S. A., LONG, A. R. Isolation of components from biological specimens via matrix solid phase dispersion. **US Pat. 5272094**, Dec. 21, 1993b.

BARKER, S. A.; LONG, A. Tissue drug residue extraction and monitoring by matrix solid phase dispersion (MSPD) HPLC analysis. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 15, n 12, p. 2071-2089, 1992.

BARKER, S. A.; LONG, A. R.; SHORT, C. R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. **Journal of Chromatography**, v. 475, 353-361, 1989.

BARROS, C. E. et al. Detrital minerals of modern beach sediments in southern Brazil: A provenance study based on the chemistry of zircon. **Journal of Coastal Research**, v. 26, n 1, p. 80–93, West Palm Beach, Florida, 2010.

BASS, C.; DENHOLM, A.; WILLIAMSON, M. S.; NAUEN, R. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p 78-87, 2015.

BJØRLING-POULSEN, M.; ANDERSEN, H. R.; GRANDJEAN, P. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. **Environmental Health**, v. 7, n. 50, p. 1-22, 2008.

BLESA, J. et al. Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1011, p. 49–54, 2003.

BOGIALLI, S.; DI CORCIA, A. Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting contaminants from foodstuffs. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 163-179, 2007.

BOGIALLI, S. et al. Simple and rapid determination of anatoxin-a in lake water and fish muscle tissue by liquid-chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1122, p. 180–185, 2006.

BOGIALLI, S. et al. Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, p. 93–100, 2005.

BOGIALLI, S. et al. Simple and rapid assay for analyzing residues of carbamate insecticides in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 351–357, 2004a.

BOGIALLI, S. et al. A Simple and rapid assay for analyzing residues of carbamate insecticides in vegetables and fruits: hot water extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 665-671, 2004b.

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, 8 de janeiro de 2002. Disponível em: < www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm >. Acesso em 06 jan. 2017.

BRASIL. Decreto nº 4, de 18 de janeiro de 2012. Dispõe sobre os critérios para a realização de estudos de resíduos de agrotóxicos para fins de registro de agrotóxicos no Brasil. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 21 de agosto de 2006.

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

CALDAS, S. S. et al. A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fish liver and crab hepatopancreas with determination by GC–MS. **Talanta**, v 112, p. 63-68, 2013.

CAN, A. Quantitative structure–toxicity relationship (QSTR) studies on the organophosphate insecticides. **Toxicology Letters**, v. 23, p. 434–443, 2014.

CAO, Y.; TANG, H.; CHEN, D.; LI, L. A novel method based on MSPD for simultaneous determination of 16 pesticide residues in tea by LC–MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 998, p. 72–79, 2015.

CAPRIOTTI, A. L. et al. Recent advances and developments in matrix solid-phase dispersion. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 186‑193, 2015.

CAPRIOTTI, A. L.; CAVALIERE, C.; LAGANA, A.; PIOVESANA, S.; SAMPERI, R. Recent trends in matrix solid-phase dispersion. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 53-66, 2013.

CAPRIOTTI, A. L.; CAVALIERE, C.; GIANSANTI, P.; GUBBIOTTI, R.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2521-2532, 2010.

CARRO, N.; VILAS, L.; GARCÍA, I.; IGNACIO, M.; MOUTEIRA, A. M. Optimization of a method based on micro-matrix solid-phase dispersion (micro-MSPD) for the determination of PCBs in mussel samples. **Analytical Chemistry Research**, v. 11, p. 1-8, 2017.

CARSON, R. **Primavera silenciosa**. São Paulo: Melhoramentos, 1969.

CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. Neuroactive insecticides: Targets, selectivity, resistance, and secondary effects. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 99-117, 2013.

CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide research: Past, present, or future? **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 1-16, 1998.

CHEN, J.; YANG, C.; CHUNG, W.; DING, W. Vortex-homogenized matrix solid-phase dispersion coupled with gas chromatography – electron capture negative-ion mass spectrometry to determine halogenated phenolic compounds in seafood. **RSC Advances**, v. 6, p. 96510-96517, 2016.

CHENG, Z.; DONG, F.; XU,J.; LIU, X.; WU, X.; CHEN, Z.; PAN, X.; GAN, J.; ZHENG, Y. Simultaneous determination of organophosphorus pesticides in fruits and vegetables using atmospheric pressure gas chromatography quadrupole-time-offlight mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 231, p. 365-373, 2017.

CHIACCHIERINI, E.; RESTUCCIA, D.; VINCI, G. Evaluation of two different extraction methods for chromatographic determination of bioactive amines in tomato products. **Talanta**, v. 69, p. 548–555, 2006.

COLLINS, C.; BRAGA, G.; BONATO, P. Fundamentos de cromatografia. Editora Unicamp, 2006.

CONCHA-GRANA, E. et al. Matrix solid phase dispersion method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in moss. **Journal Chromatography A**, v. 1406, p. 19–26, 2015.

CORREIA, M.; RODRIGUES, M.; PAIGA, P.; DELERUE-MATO, C. **Fungicides**. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P .M.; TOLDRÁ, F. Encyclopedia of food and health. Reino Unido: Elsevier, v. 3 , 2016.

COSTA, L. G. **Toxic effects of pesticides**. In: KLAASSEN, C. D. (ed.). Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons. 7ª ed. Nova York: Mc Graw-Hill, cap. 22, p. 883-930, 2008.

DAWIDOWICZ, A. L.; CZAPCZYNSKA, N. B.; WIANOWSKA, D. Relevance of the sea sand disruption method (SSDM) for the biometrical differentiation of the essential-oil composition from conifers. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, p. 241-250, 2013.

DAWIDOWICZ, A. L. et al. The loss of essential oil components induced by the purge time in the pressurized liquid extraction (PLE) procedure of Cupressus sempervirens. **Talanta**, v. 94, p. 140-145, 2012a.

DAWIDOWICZ, A. L. et al. Matrix solid-phase dispersion with sand in chromatographic analysis of essential oils in herbs. **Phytochemical Analysis**, v. 22, p. 51–58, 2012b.

DAWIDOWICZ, A. L.; CZAPCZYNSK, N. B. Sea sand disruption method (SSDM) as a valuable tool for isolating essential oil components from conifers. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 2045-2056, 2011.

DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D. PLE in the analysis of plant compounds Part I. The application of PLE for HPLC analysis of caffeine in green tea leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 1155–1159, 2005.

DEWHURST, I. **Pesticide residues: Herbicides**. In: MOTARJEMI, Y. Encyclopedia of food safety, v. 3, p. 11-14, 2014.

DORDIO, A. V. et al. Evaluation of carbamazepine uptake and metabolization by Typha spp., a plant with potential use in phytotreatment. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7827–7834, 2011.

DÓREA, H. S. **Dispersão da matriz em fase sólida**. In: BORGES, K. L.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos, LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora LTDA, 2015.

DUARTE, F. A.; SOARES, B. M.; VIEIRA, A. A.; PEREIRA, E. R.; MACIEL, J. V.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Assessment of modified matrix solid-phase dispersion as sample preparation for the determination of CH_3Hg^+ and Hg^{2+} in fish. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 10, p. 5015-5022, 2013.

ECONOMOU, A. et al. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 31, p. 5856-5867, 2009.

ENRÍQUEZ-GABEIRAS et al. Interference-free determination of illegal dyes in sauces and condiments by matrix solid phase dispersion (MSPD) and liquid chromatography (HPLC–DAD). **Food Chemistry**, v. 135, p. 193–198, 2012.

EPA, 2007. Registration eligibility decision for carbofuran. Agency E.P (http://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/carbofuran_red.pdf).

EU. 2002/63/EC de 11 July 2002 establishing community methods of sampling for the official control of pesticide residues in and on products of plant and animal origin

and repealing Directive 79/700/EEC. Official Journal of the European Communities, p. L187, 2002.

FANG, G. et al. Multiwalled carbon nanotubes as matrix solid-phase dispersion extraction absorbents to determine 31 pesticides in agriculture samples by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 3040-3045, 2009.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of Maximum Residue Levels in food and feed. Pesticide Residues. 2a edição. FAO Plant Production and Protection Paper, v.197, 264 pp, 2009.

FDA (Food and Drug Administration). Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program, 2a edição. US FDA. FDA Foods and Veterinary Medicine Science and Research Steering Committee, 2015.

FERNANDEZ-ALBA, A.; BARCELÓ, D. **Chromatographic mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues**, Elsevier, 2005.

FERREIRA, J. A.; SANTOS, L. F. S.; SOUZA, N. R. S.; NAVICKIENE, S.; OLIVEIRA, F. A.; TALAMINI, V. MSPD sample preparation approach for reversed-phase liquid. **B Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 91, p.160-164, 2013.

FREITAS, S. S.; LANÇAS, F. M. Matrix effects observed during pesticides residue analysis in fruits by GC. **Journal Separation Scence**, v. 32, p. 3698-3705, 2009.

GAÑÁN, J. et al. Evaluation of a molecularly imprinted polymer for determination of steroids in goat milk by matrix solid phase dispersion. **Talanta**, v. 126, p. 157–162, 2014.

GAÑAN, J. et al. Application of hybrid mesoporous silica for extraction of hormones in milk by matrix solid phase dispersion. **Materials Letters**, v. 119, p. 56–59, 2014.

GARCÍA-MAYOR, M. A. et al. Matrix solid-phase dispersion method for the determination of macrolide antibiotics in sheep's milk. **Food Chemistry**, v. 134, p. 553–558, 2012.

GARCINUÑO, R. M. et al. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method with subsequent clean-up for the determination of ethylene bisdithiocarbamate residues in almond samples. **Journal of Chromatography A**, v. 10, n. 41, p. 35-41, 2004.

GILBERT-LOPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J. F.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. F.; MOLINA-DÍAZ, A. Evaluation of two sample treatment methodologies for large-scale pesticide residue analysis in olive oil by fast liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p.3736-3747, 2010.

GUAN, S. et al. Multi-walled carbon nanotubes as matrix solid-phase dispersion extraction adsorbent for simultaneous analysis of residues of nine organophosphorus

pesticides in fruit and vegetables by rapid resolution LC–MS–MS. **Chromatographia**, v. 73, p.33-41, 2011.

GUEDES, J. A. C., SILVA, R. O, LIMA, C. G., MILHOME, M. A. L., NASCIMENTO, R. F. Matrix effect in guava multiresidue analysis by QuEChERS method and gas chromatography coupled to quadrupole mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 199, p. 380–386, 2016.

GUERRA, E. et al. Determination of dyes in cosmetic products by micro-matrix solid phase dispersion and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 141, p. 27–37, 2015.

GUPTA, R. C. Carbamate pesticides. **Encyclopedia of Toxicology**, v. 1, 2005.

HAMED, I.; ÖZOGUL, F.; REGENSTEIN, J. M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 40-50, 2016.

HERCEGOVÁ, A.; DÖMÖTÖROVÁ, M.; KRUŽLICOVÁ, D.; MATISOVÁ, E. Comparison of sample preparation methods combined with fast gas chromatography - mass spectrometry for ultratrace analysis of pesticide residues in baby food. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 1102-1109, 2006.

HERRERA-HERRERA, A. V.; ASENSIO-RAMOS, A. V.; HERNÁDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. **Pesticides and herbicides: Types, uses, and determination of herbicides**. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P.; TOLDRA, F. Encyclopedia of food and health, Elsevier Science & Technology, v. 1, 2015.

HERTZOG, G. et al. Study of vortex-assisted MSPD and LC-MS/MS using alternative solid supports for pharmaceutical extraction from marketed fish. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 4793-4803, 2015.

HILDMANN, F. et al. Pesticide residues in chicken eggs – A sample preparation methodology for analysis by gas and liquid chromatography /tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1403, p. 1–20, 2015.

HU, H. X.; ZHENG, Y. G. The effect of sand particle concentrations on the vibratory cavitation erosion. **Wear**, v. 384-385, p. 95-105, 2017.

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). (2012). Boletim de Comercialização de Agrotóxicos e Afins - Histórico de vendas - 2000 a 2012. Brasil.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (2006). Censo Agropecuário 2006. Brasil.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (2015). Indicadores de Desenvolvimento Sustentável 2015, Brasil.

IBGE IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (2016). Levantamento sistemático da produção agrícola, Brasil.

IPARRAGUIRRE, A. et al. Matrix solid-phase dispersion of polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated analogues in lettuce, carrot and soil. **Journal of Chromatography A**, v. 1360, p. 57–65, 2014.

IPCS (International Programme on Chemical Safety): The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2004. Geneva: World Health Organization, p. 58, 2005.

JAROSZYŃSKA, J. Isolation of free phenolic compounds from arboreal leaves by use of the Florisil/C18 system. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, p. 702-708, 2003.

JURADO, et al. **Herbicides: The face and the reverse of the coin. An in vitro pproach to the toxicity of herbicides in non-target organisms**. In: KORTEKAMP, A. Herbicides and Environment, Croacia: InTech, 2011, p. 3-45. ISBN 978-953-307-476-4.

KACZYŃSKI, P.; ŁOZOWICKA, B.; JANKOWSKA, M.; HRYNKO, I. Rapid determination of acid herbicides in soil by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection based on dispersive solid phase extraction. **Talanta**, v. 152, p. 127-136, 2016.

KARASEK, F. W.; CLEMENT, R. E. **Gas chromatography - Mass spectrometry**. In: KARASEK, F. W.; CLEMENT, R. E. Basic Gas Chromatography – Mass Spectrometry. Elsevier Science: Amsterdam, 1988.

KLOSKOWSKI, A. et al. Modern techniques of sample preparation for determination of organic analytes by gas chromatography. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 15-38, 2007.

KRUVE, A. et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 8-28, 2015.

KRUVE, A.; KUNNAPAS, A., HERODES, K.; LEITO, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, p. 58–66, 2008.

LAGUNAS-ALLUÉ, L.; SANZ-ASENSIO, J.; MARTÍNEZ-SORIA, M. T. Comparison of four extraction methods for the determination of fungicide residues in grapes through gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1270, p. 62- 71, 2012.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Editora Átomo, 2009.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993.

LEHOTAY, S. et al. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2548–2560, 2010.

LI, J.; LI, Y.; XU, D.; ZHANG, J.; WANG, Y.; LUO, C. Determination of metrafenone in vegetables by matrix solid-phase dispersion and HPLC-UV method. **Food Chemistry**, v. 214, p. 77-81, 2017a.

LI, W. et al. Matrix solid-phase dispersion combined with GC–MS/MS for the determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in marketed seafood. **Chromatographia**, v. 80, p. 813-824, 2017b.

LI, Y., CHEN, X.; FAN, C., PANG, G. Compensation for matrix effects in the gas chromatography–mass spectrometry analysis of 186 pesticides in tea matrices using analyte protectants. **Journal of Chromatography A**, v. 1266, p. 131-142, 2012.

LIAN, Y. et al. Simultaneous determination of 346 multiresidue pesticides in grapes by PSA-MSPD and GC-MS-SIM. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, 9428-9453, 2010.

LINKEVIČIŪTĖ, A.; BUTKIENĖ, R.; NAUJALIS, E. Optimization of matrix solid-phase dispersion extraction for the chromatographic analysis of flavones in cranberries. **Chemija**. v. 24, n. 3, p. 217-222, 2013.

LOZANO, A. et al. Evaluation of zirconium dioxide-based sorbents to decrease the matrix effect in avocado and almond multiresidue pesticide analysis followed by gas chromatography tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 118, p. 68-83, 2014.

LOZOWICKA, B. et al. Multi-residue methods for the determination of over four hundred pesticides in solid and liquid high sucrose content matrices by tandem mass spectrometry coupled with gas and liquid chromatograph. **Talanta**, v. 151, p. 51-61, 2016.

ŁOZOWICKA, B.; RUTKOWSKA, E.; HRYNKO, I. Simultaneous determination of 223 pesticides in tobacco by GC with simultaneous electron capture and nitrogen-phosphorous detection and mass spectrometric confirmation. **Open Chemistry**,v. 13, p. 1137-1149, 2015.

ŁOZOWICKA, B.; JANKOWSKA, M.; RUTKOWSKA, E.; HRYNKO, I.; KACZYNSKI, P.; MICINSKI, J. The evaluation of a fast and simple pesticide multiresidue method in various herbs by gas chromatography. **Journal of Natural Medicines**,v. 68, p.95-111, 2014.

ŁOZOWICKA, B.; JANKOWSKA, M.; KACZYNSKI, P. Pesticide residues in Brassica vegetables and exposure assessment of consumers. **Food Control**, v. 25, p. 561-575, 2012.

LU, D. et al. A fast and easy GC-MS/MS method for simultaneous analysis of 73 pesticide residues in vegetables and fruits. **Analytical Methods**, v. 5, p. 1721-1732, 2013.

LU, D. et al. Simultaneous determination of 45 pesticides in fruit and vegetable using an improved QuEChERS method and on-line gel permeation chromatography–gas chromatography/mass spectrometer. **Journal of Chromatography B**, v. 895- 896, p. 17– 24, 2012.

LUKASZEWICZ-HUSSAIN, A. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, p. 145–150, 2010.

MA, S. et al. Soxhlet-assisted matrix solid phase dispersion to extract flavonoids from rape (Brassica campestris) bee pollen. **Journal of Chromatography B**, v. 1005, p. 17–22, 2015.

MACLACHLAN, D. J.; HAMILTON, D. Estimation methods for Maximum Residue Limits for pesticides. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 58, p. 208–218, 2010.

MALIK, K. A.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Liquid chromatography–mass spectrometry in food safety. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4018–4040, 2010.

MANHITA, A. C.; TEIXEIRA, D. M.; COSTA, C. T. Application of sample disruption methods in the extraction of anthocyanins from solid or semi-solid vegetable samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1129, p. 14–20, 2006.

MAPA/ANVISA/IBAMA. **Manual de procedimentos**. Instrução Normativa Conjunta 01, de 16 de junho de 2014. (2015).

MARONI, M. et al. Organophosphorous pesticides. **Toxicology**, v. 143, p. 9-37, 2000.

MARONI, M. et al. Synthetic pyrethroids. **Toxicology**, v. 143, p. 53-59, 2000.

MARONI, M. et al. Synthetic pyrethroids. **Toxicology**, v. 143, p. 53-59, 2000.

MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, M. et al. Matrix solid phase dispersion-assisted BCR sequential extraction method for metal partitioning in surface estuarine sediments. **Talanta**, v. 83, p. 840–849, 2011.

MARTINS, M. L.; RIZZETTI, T. M.;KEMMERICH, A.; SAIBT, N.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Dilution standard addition calibration: A practical calibration strategy for multiresidue organic compounds determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1460, p. 84–91, 2016.

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

MATISOVÁ, E.; ŠKRABÁKOVÁ, S. Carbon sorbents and their utilization for the preconcentration of organic pollutants in environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 707, 145-179, 1995.

MENEZES FILHO, A.; NAVICKIENE, S.; DÓREA, H. S. Development of MSPD method for the determination of pesticide residues in tomato by GC-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 5, 874-879, 2006.

MÍGUEZ-FRAMIL, M. et al. Matrix solid-phase dispersion on column clean-up/pre-concentration as a novel approach for fast isolation of abuse drugs from human hair. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6342–6349, 2010.

MOL, H. G. J.; ROOSEBOOM A.; DAM, R.V.; RODING, M.; ARONDEUS, K.; SUNARTO, S. Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticides in produce. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 1715–1754, 2007.

MOLINER-MARTÍNEZ, Y.; GONZÁLEZ-FUENZALIDA, R.A.; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R.; CAMPÍNS-FALCÓ, P.; VERDÚ-ANDRÉS, J. Cleaning sorbents used in matrix solid-phase dispersion with sonication: Application to the estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons at ng/g levels in marine sediments. **Journal of Chromatography A**, v. 1263, p. 43– 50, 2012.

NAVICKIENE, S.; AQUINO, A.; BEZERRA, D. S. S. A matrix solid-phase dispersion method for the extraction of seven pesticides from mango and papaya. **Journal of Chromatographic Science**, v. 48, p. 750-754, 2010.

OERKE, E.C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, v. 144, p. 31-43, 2006.

OLIVEIRA, C.M. et al. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, v. 56, p. 50-54, 2014.

OZCAN, S., TOR, A.; AYDIN, M. **Ultrasound application in analyses of organic pollutants in environment**. In: CHEN, D.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. Handbook on applications of ultrasound. Sonochemistry for sustainability, CRC Press, Nova York, 2012.

PENG, L.; LI, Q.; CHANG, Y.; AN, M.; YANG, R.; TAN, Z.; HAO, J.; CAO, J.; XU, J.; HU, S. Determination of natural phenols in olive fruits by chitosan assisted matrix solid-phase dispersion microextraction and ultrahigh performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1456, p. 68-76, 2016.

PENG, L.; LI, Q.; CHANG, Y.; AN, M.; YANG, R.; HAO, J.; CAO, J.; XU, J.; HU, S. Determination of natural phenols in olive fruits by chitosan assisted matrix solid-phase dispersion microextraction and ultrahigh performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 969, p. 205–212, 2014.

PICÓ, Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p.84-99, 2013.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Análise de resíduos de agrotóxicos em tomates empregando dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 92-98, 2009.

POPP, J.; PETŐ, K.; NAGY, J. Pesticide productivity and food security. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 33, p. 243–255, 2013.

POZO, M.; HERNÁNDEZ, L.; QUINTANA, C. A selective spectrofluorimetric method for carbendazim determination in oranges involving inclusion-complex formation with cucurbit[7]uril. **Talanta**, v. 81, p. 1542–1546, 2010.

PRAT, D.; WELLS, A.; HAYLER,J.; SNEDDON, H.; ELROY, C. R. M.; ABOU-SHEHADA, S.; DUNN, P. J. CHEM21 Selection Guide of Classical– and Less Classical – Solvents. **Green Chemistry**, 2013.

PRAT, D.; HAYLER, J.; WELLS, A. A survey of solvent selection guides. **Green Chemistry**, v.16, p. 4546-4551, 2014.

QI, X. Development of a matrix solid-phase dispersion-sonication extraction method for the determination of fungicides residues in ginseng extract. **Food Chemistry**, v. 121, p. 758–762, 2010.

QUINTANA, M. C. Determination of residual phenothiazines in liver by matrix solid phase dispersion combined with HPLC with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 33, p. 270–282, 2010.

RADIŠIĆ, M.; VASILJEVIĆ, T.; DUJAKOVIĆ, N. N.; LAUŠEVIĆ, M. Application of matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–ion trap mass spectrometry for the analysis of pesticide residues in fruits. **Food Analytical Methods**, v. 6, p.648-657, 2013.

RADIŠIĆ, M.; GRUJIĆ, S.; VASILJEVIĆ, T.; LAUŠEVIĆ, M. Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 113, p. 712-719, 2009.

RAMOS, L. **Matrix solid-phase dispersion**. In PAWLISZYN, J. Compreensive sampling and sample preparation, v. 1, Canadá: Elsevier, p. 299-309, 2012.

RAMOS, J.; RIAL-OTERO, R.; RAMOS, L.; CAPELO, J. R. Ultrasonic-assisted matrix solid-phase dispersion as an improved methodology for the determination of pesticides in fruits. **Journal of Chromatography A**, v. 1212, p. 145-149, 2008.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. **Open Chemistry**, v. 13, p. 980-1010, 2015.

REYNOLDS, S. L.; FUSSEL, R. J.; CALDOW, M. An inter-laboratory comparison study of two CEN multi-residue methods for use in the enforcement of maximum residue levels for pesticides in fruit, vegetables and grain within the European Union. **Pesticide Science**, v. 50, p. 164-166, 1997.

RODRIGUES, S. A; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. A simple; efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase dispersion with liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 678, p. 82-89, 2010.

ROMBALDI, C.; ARIAS, J. L. O.; HERTZOG, G. I., CALDAS, S.S.; VIEIRA, J. P.; PRIMEL, E. G. New environmentally friendly MSPD solid support based on golden mussel shell: characterization and application for extraction of organic contaminants from mussel tissue. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 4805-4814, 2015.

RUBERT, J.; SOLER, C.; MAÑES, J. Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-mycotoxin determination in different flours using LC–MS/MS. **Talanta**, v. 85, p. 206–215, 2011.

SANCHEZ-PRADO, L. et al. Determination of suspected fragrance allergens in cosmetics by matrix solid-phase dispersion gas chromatography–mass spectrometry analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 5055–5062, 2011.

SANCHEZ-SANTED, F.; COLOMINA, M. T.; HERNANDEZ, E. H. Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. **Cortex**, v. 74, p. 417-426, 2016.

SANTE, Comission of the European Communities. Document nº SANCO/11945/2015. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 01/01/2016.

SEBASTIÀ, N. et al. Occurrence of aflatoxins in tigernuts and their beverages commercialized in Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2609–2612, 2010.

SEIDI, S.; YAMINI, Y. Analytical sonochemistry; developments, applications, and hyphenations of ultrasound in sample preparation and analytical techniques. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 938-976, 2012.

SHAFER, T. J.; MEYER, D. A.; CROFTON, K. M. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: Critical review and future research needs. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n 2, p. 123-136, 2005.

SHANER, D.L. Herbicide safety relative to common targets in plants and mammals. **Pest Management Science**, v. 60, p. 17-24, 2003.

SIGMA-ALDRICH- Ficha de informações de segurança de produtos químicos - Celite, 2017.

SILVA, R. L.; SILVA, C . P.; NAVICKIENE, S. Multiresidue determination of carbamate, organochlorine, organophosphorus, and dicarboximide pesticides in lettuce by GC/MS. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 45, p. 589-594, 2010.

SOBHANZADEH, E. et al. Low temperature followed by matrix solid-phase dispersion-sonication procedure for the determination of multiclass pesticides in palm oil using LC-TOF-MS. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, p. 1308-1313, 2011.

TADEO J.L.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; GONZÁLEZ, L. **Pesticides: Classification and properties**. In: TADEO, J .L. Analysis of pesticides in food and environmental samples. Nova York: CRC Press, 2008. p. 1-34.

TANO, Z. J. **Identity, physical and chemical properties of pesticides**. In: STOYTCHEVA, M. Pesticides in the modern world – Trends in pesticides analysis. 1a ed. Rijeka, Croacia: InTech, 2011. p. 1-19.

TEIXEIRA, D. M. et al Comparison between sample disruption methods and solid–liquid extraction (SLE) to extract phenolic compounds from Ficus carica leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, p. 22-28, 2006.

TEIXEIRA, D. M.; COSTA, C. T. Novel methods to extract flavanones and xanthones from the root bark of Maclura pomifera. **Journal of Chromatography A**, v. 1062, p. 175–181, 2005.

The Netherlands. Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs. General Inspectorate for Health Protection. Ministry of Public Health, Welfare and Sports. 6 ed., 1996.

TSOCHATZIS, E. D. et al. A multi-residue method for pesticide residue analysis in rice grains using matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography–diode array detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 2181–2190, 2010.

USEPA (2011). **Pyrethrins/pyrethroid cumulative risk assessment**. U.S. Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs. October 4. 2011. URL <http://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=EPA-HQ-OPP- 2011-0746-0003 Acessado em 03.10.16.

USEPA (2006). **Organophosphorus cumulative risk assessment – 2006 update**. U.S. Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs July 31, 2006. URL <http://www.epa.gov/oppsrrd1/cumulative/2006-op/op_cra_main. pdf> Acessado em 03.10.16.

VALE, A., LOTTI, M., 2015. Chapter 10 - organophosphorus and carbamate insecticide poisoning. In: MARCELLO, L., MARGIT, L.B. (Eds.), Handbook of Clinical Neurology. Elsevier, 2015.

VIANA, E.; MOLTÓ, J. C.; FONT, G. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the analysis of pesticide residues in vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 437-444, 1996.

VILLAVERDE-DE-SÁA, E. et al. Matrix solid-phase dispersion combined to liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of paraben preservatives in mollusks. **Journal of Chromatography A**, v. 1459, p. 57–66, 2016.

XU, J. et al. Metal oxides in sample pretreatment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 41–56, 2016.

YANG, C.; HAMEL, C.; VUJANOVIC, V.; GAN, Y. Fungicide: Modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. **ISRN Ecology**, 2011.

YOUSOF, N. S. M. Physical and chemical effects of acoustic cavitation in selected ultrasonic cleaning applications. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 568–576, 2016.

WANG Z.; SUNA, R.; WANG, Y.; LI, N.; LEI, L.; YANG, X.; YUB, A.; QIU, F.; ZHANG, H. Determination of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by silica-supported ionic liquid-based matrix solid phase dispersion extraction high performance liquid chromatography-diode array detection. **Journal of Chromatography B**, v. 969, p. 205–212, 2014.

WANG, X. Z. et al. Simultaneous determination of nine trace organophosphorous pesticide residues in fruit samples using molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 3821−3827, 2013.

WELLS, M J. M. Principles of extraction and the extraction of semivolatile organics from liquids. In: MITRA, S. Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., v. 162, 2003.

WIANOWSKA, D.; DAWIDOWICZ, A. L. Can matrix solid phase dispersion (MSPD) be more simplified? Application of solvent less MSPD sample preparation method for GC–MS and GC–FID analysis of plant essential oil components. **Talanta**, v. 151, p. 179–182, 2016.

WIANOWSKA, D.; TYPEK, R.; DAWIDOWICZ, A. L. How to eliminate the formation of chlorogenic acids artefacts during plants analysis? Sea sand disruption method (SSDM) in the HPLC analysis of chlorogenic acids and their native derivatives in plants. **Phytochemistry**, v. 117, p. 489–499, 2015.

ZHANG, L.; LIU, S.; CUI, X.; PAN, C.; ZHANG, A.; CHEN, F. A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 900-925, 2012.

ZHONG, Z. Ultrasound-assisted matrix solid-phase dispersive liquid extraction for the determination of intermediates in hair dyes with ion chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 752, p. 53–61, 2012.

ZHU, G.; HE, X.; CAI, B.; WANG, H.; DING, J.; YUAN, B.; FENG, Y. In-syringe dispersive solid phase extraction: a novel format for electrospun fiber based microextraction. **Analyst**, v. 139, p. 6266-6271, 2014.

WHO (2005). Safety of pyrethroids for public health use.

http://ec.europa.eu/(Legislação europeia)

http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-PARA(Legislação brasileira)

http://www.fao.org/(Legislação códex)

APÊNDICE A - Cromatogramas

Figura 26 - Cromatograma dos íons totais da areia de Bojuru

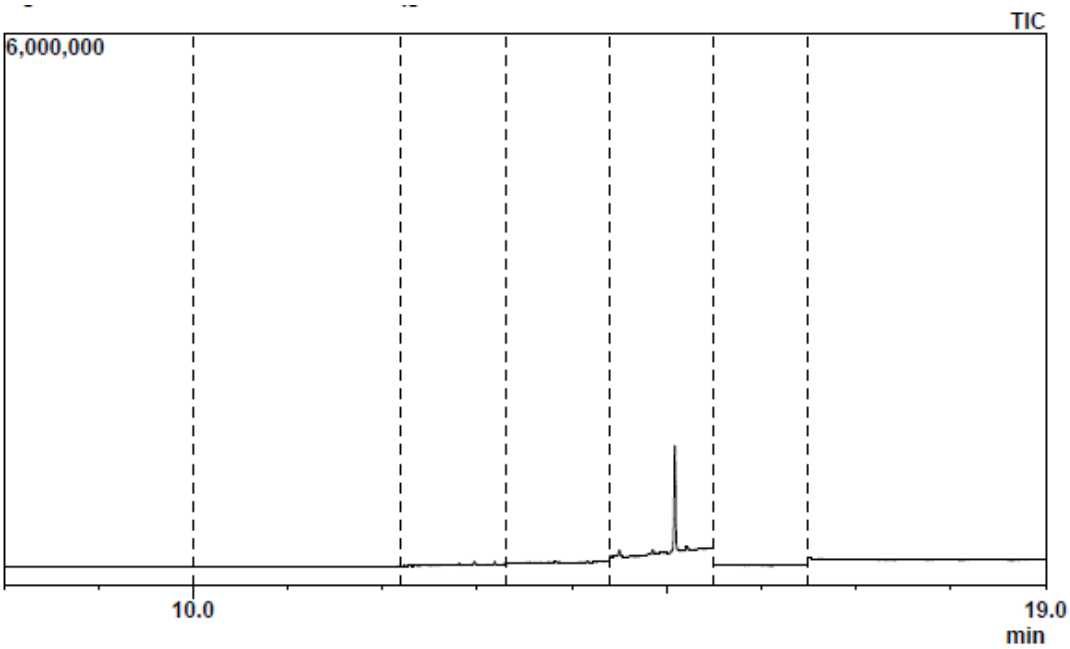


Figura 27 - Cromatograma dos íons totais da areia da praia do Cassino

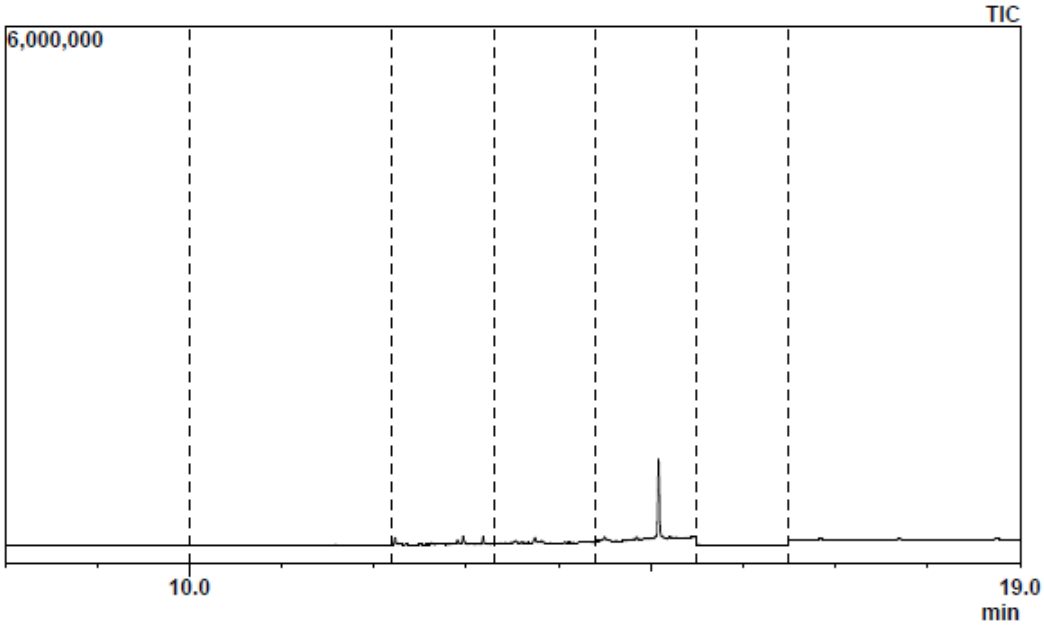
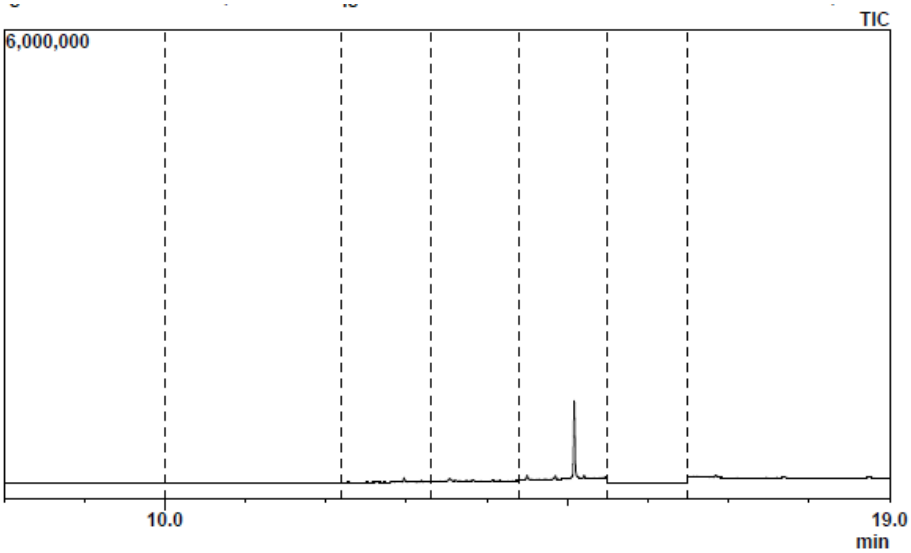


Figura 28 - Cromatograma dos íons totais da areia da localidade da Quitéria



APÊNDICE B – Questionário

Nº 1

Universidade Federal de Rio Grande
Escola de Química e Alimentos
Laboratório de Análise de Contaminantes Orgânicos e Metais

MONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS E COMPOSTOS FUNCIONAIS EM ALIMENTOS PRODUZIDOS NO MUNICIPIO DE RIO GRANDE E INCENTIVO A AGRICULTURA ORGÂNICA E BOAS PRÁTICAS AGRÍCOLAS

Nome:_____

Endereço:_____

Área produzida:_____

Questionário:

1)Que vegetais são produzidos na propriedade?

_____

_____

_____

_____

2)Utiliza agrotóxicos para produção de alimentos?_____

3)Quais agrotóxicos são utilizados na lavoura?

_____

_____

_____

_____

_____

4)Utiliza agricultura orgânica na propriedade?_____

5)Tem interesse em conhecer novas formas de manejo menos tóxicas?_____

6)Tem interesse em utilizar técnicas de manejo orgânicas?_____

Observações:_____

_____

____

APÊNDICE C – Programa de pró-mobilidade CAPES/AULP

Durante o período de 25 de fevereiro a 29 de abril de 2015, foi realizada a missão de estudos através do Programa de Pró-mobilidade CAPES/AULP em Cabo Verde. O objetivo deste trabalho foi interagir com as comunidades de pequenos produtores rurais em Cabo Verde e com os estudantes das escolas secundárias e universitários do curso de Engenharia Química e Biológica da UniCV, demonstrando a importância de produzir alimentos seguindo as Boas Práticas Agrícolas, garantindo a qualidade desses produtos para a população e para as próximas gerações.

Projeto de Pesquisa:
"ESTUDO DA CONTAMINAÇÃO EM FRUTAS E HORTALIÇAS"

Introdução

Cabo Verde é um país de ecossistemas frágeis cuja agricultura de subsistência não cobre a demanda alimentar da população. Devido aos escassos recursos naturais o país deve adotar uma política de gestão sustentável dos mesmos (PANA II).
Apenas 10% da superfície do país, ou seja, 40.000 hectares tinha atividade agrícola. As condições climáticas constituem uma ameaça permanente sobre a agricultura cabo-verdiana. A raridade e irregularidade das chuvas provocam secas cada vez mais longas, que são as causas de um deficit hídrico permanente e do avanço da desertificação. Nestas condições excepcionalmente difíceis, a produção alimentar é constantemente deficitária. Cabo Verde importa mais de 80% dos alimentos de que necessita (DECRP, 2004).

A agricultura ocupa uma escassa parte da superfície total do país com uma distribuição desigual entre as ilhas. Uma característica crucial da agricultura de Cabo Verde tem a ver com a extrema fragilidade do seu ecossistema (fortes declives, chuvas irregulares e torrenciais, vento permanente, escassez de água). Esta situação é também o resultado da escolha de culturas por parte dos camponeses cabo-verdianos, como é o caso do cultivo do milho em zonas de acentuado declive e as práticas culturais que aceleram a degradação dos solos.

De acordo com a Agenda 21 das Nações Unidas, as ilhas são casos especiais para ambiente e desenvolvimento dadas às particularidades que apresentam. O isolamento a que se encontram sujeitas determina a limitação de recursos naturais e económicos, tornando-as muito vulneráveis ecológica e economicamente (UNEP, 1992). São regiões muito suscetíveis a desastres ambientais e naturais (aumento do nível do mar e mudanças climáticas) e a biodiversidade é das mais ameaçadas no mundo (UNEP, 1994). De fato, as ilhas são sistemas extremamente sensíveis a qualquer intervenção externa, apresentam um elevado número de espécies endémicas (exclusivas), muito valiosas no contexto da biodiversidade global, e elevadas taxas de extinção. Por serem únicas, as espécies endémicas uma vez extintas, num determinado local, elevam o nível de perda ao contexto mundial.

O limitado espaço disponível nas regiões insulares conduz a grande interdependência entre os seus componentes naturais, o que significa que qualquer impacto negativo imposto sobre um dos seus elementos é facilmente e rapidamente sentido em toda a ilha (WTO, 2004).

A agricultura em Cabo Verde é uma agricultura familiar de micro-proprietários com uma superfície média que não ultrapassa os 1-1,5 hectares. A pequena dimensão das áreas agrícolas não é suficiente para assegurar a subsistência das famílias rurais (DECRP, 2004).

O crescimento sustentável da agricultura deverá basear-se numa abordagem de desenvolvimento integrado e participativo dos diferentes setores agrícolas (produção vegetal, animal e silvícola) e não agrícolas (turismo rural etc.), capaz de otimizar retornos econômicos sustentáveis com base nas potencialidades das diferentes zonas agroecológicas. Os principais eixos desta política compreendem: i) a valorização durável e integrada dos recursos hídricos e fundiários, ii) a valorização dos produtos agrícolas, iii) o reforço das capacidades técnicas humanas e sociais (PANA II).

Justificativa

O setor agrícola, motivado pela globalização e pelo desenvolvimento de novas tecnologias, tem sido submetido a grandes mudanças, como a necessidade

de uma profunda caracterização dos alimentos devido a crescente preocupação com resíduos de agrotóxicos (STEFANO et al., 2012).

A combinação de fatores como a extração descontrolada de inertes, alta densidade de poços, agricultura de sequeiro nas encostas, construção civil descontrolada, proliferação de lixeiras selvagens, uso indiscriminado de agrotóxicos e fertilizantes, agravam a degradação de solos. Além de ter um impacto negativo direto sobre o solo, esses comportamentos reduzem a eficácia de medidas de conservação de solos e água introduzidos no país.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um programa de extensão, visando informar aos estudantes quanto à importância de manejo visando preservar a biodiversidade, e auxiliando através de ações que incentive o manejo dentro das boas práticas agrícolas.

Sendo assim os objetivos específicos foram:

1. Conhecer a forma de manejo de alimentos em Cabo Verde;
2. Realizar palestras nas escolas secundárias visando salientar quanto à necessidade de cuidado na utilização de agrotóxicos no cultivo de alimentos;
3. Realizar palestra na UniCV sobre estudos de contaminantes agrícolas no cultivo de frutas e hortaliças;
4. Realizar aulas teóricas sobre análise de contaminantes por GC-MS e sobre validação de metodologia analítica;
5. Realizar aulas práticas sobre a técnica de preparo de amostra de alimentos, MSPD (Dispersão da Matriz em Fase Sólida), para análise de resíduos de agrotóxicos;
6. Ministrar um Curso de Segurança Química em Laboratórios, abordand o os seguintes temas: prevenção de acidentes e intoxicações, equipamentos de Proteção Coletiva, Boas Práticas de Laboratório, Armazenamento de Produtos Químicos, descarte de resíduos, FISPQ’s.

Metodologia

Foram realizadas palestras nas escolas secundárias na Ilha de Santiago, obtendo grande participação dos alunos do 3º ano sobre a regulamentação sobre o

uso de agrotóxicos, programas de monitoramento de resíduos, Boas Práticas Agrícolas, limites máximos de resíduos, etc...

Na palestra ministrada na UniCV foram abordados temas quanto aos procedimentos analíticos para análise de resíduos, importância da produção de alimentos seguros, limites máximos de resíduos, técnicas de preparo de amostra.

Nas aulas teóricas foram abordados temas quanto aos conceitos básicos de cromatografia, as figuras de mérito para validação de técnicas analíticas.

Nas aulas práticas foi apresentada aos alunos a técnica da dispersão da matriz em fase sólida para análise de agrotóxicos em amostras de tomate.

O curso de segurança em laboratórios de Química teve grande repercussão em toda UniCV, contando com a participação de enfermeiros da Universidade e bombeiros da cidade da Praia.

Resultados e Discussões

Na palestra ministrada na UniCV, na Quinta da Química, houve a participação dos alunos do curso de Engenharia Química e Biológica. Os temas abordados foram discutidos com os alunos com a finalidade de demonstrar a importância da produção de alimentos seguros e de técnicas de preparo de amostra para análise de rotina.

Nas aulas teóricas foram abordados temas quanto aos conceitos básicos de cromatografia, as figuras de mérito para validação de técnicas analíticas. Estes assuntos nunca haviam sido abordados nos cursos de Engenharia Química e Biológica, sendo de vital importância para o desenvolvimento da química analítica em Cabo Verde.

Nas aulas práticas foi realizada a determinação de agrotóxicos através da técnica da dispersão da matriz em fase sólida para análise de agrotóxicos em amostras de tomate. Técnicas de preparo de amostra até o momento eram desconhecidas pelos acadêmicos, assim foi de grande interesse de todos.

O curso de segurança em laboratórios de Química teve participação dos acadêmicos de forma efetiva nos questionamentos quanto aos procedimentos a serem tomados em caso de acidentes. Foi realizada também uma simulação de acidente químico, o que possibilitou a interação com todos os presentes e posterior discussão a cerca dos procedimentos corretos em caso de acidente.

Conclusões

O programa propiciou aos acadêmicos envolvidos uma formação qualificada em nível de pós-graduação, permitindo desenvolver trabalhos na área de química analítica ambiental. Ao mesmo tempo, a proposta possibilitou aos estudantes e pesquisadores uma visão de “fora do laboratório”, relacionando diretamente a importância e aplicação dos estudos desenvolvidos pelo grupo, integrando conhecimento científico e populares.

Referências bibliográficas

DECRP- Documento de estratégia de crescimento e de redução da pobreza. Ministério das Finanças e do Planeamento, República de Cabo Verde (2004).

PANA- Programa de Acção Nacional para o Ambiente II. Ministério do Ambiente, Agricultura e Pescas, República de Cabo Verde (2004-2014).

STEFANO, V.D. et al. Applications of HPLC–MS for food analysis. Journal of Chromatography A, v. 1259, p. 74-85, 2012.

UNEP (1992). Agenda 21. United Nations Conference on Environment & Development. Rio de Janeiro (Brasil), UNEP.

UNEP (1994). Programme of Action for the Sustainable Development of Small Island States. Conference on the Sustainable Development of Small Island Developing States, Bridgetown (Barbados), UNEP.

WTO (2004). Making Tourism Work for Small Island Developing States. Madrid (Espanha), WTO, 87pp.