

# Otimização e validação de método analítico para determinação de resíduos de agrotóxicos em pimentão

Shaiene Vieira Carmo I11  
Angélica Castanheira de Oliveira I11  
Lucia Helena Pinto Bastos I11  
Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso I11

[1] Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.  
Av. Brasil 4365, Mangunhos, Rio de Janeiro - CEP:31045-900.  
shaiene.carmo@incqs.fiocruz.br



## Resumo

O pimentão (*Capsicum annuum* L.) é uma das hortaliças de maior consumo no Brasil, principalmente pela região nordeste e sudeste. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), São Paulo e Minas Gerais são os principais estados produtores e respondem por cerca de 42 % da produção nacional. Atualmente são permitidos pela legislação brasileira 56 agrotóxicos de diferentes classes químicas para a cultura de pimentão. No último relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos de Alimentos (PARA) divulgado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o pimentão lidera a lista dos alimentos mais contaminados por agrotóxicos, 91,8 % das amostras analisadas apresentaram alguma contaminação. Considerando os riscos ambientais e a segurança alimentar é necessário desenvolver e validar métodos analíticos eficientes e seguros para a determinação de resíduos de agrotóxicos nos alimentos. Esse trabalho consistiu no desenvolvimento e validação de um método analítico quantitativo para a determinação multirresíduos de agrotóxicos em pimentão, usando método QuEChERS modificado com detecção por cromatografia gasosa acoplada a detector por micro captura de elétrons - CG- $\mu$ DCE. Foram avaliados seletividade, linearidade, faixa de trabalho, efeito matriz, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão. Na etapa de limpeza a mistura de fases que apresentou melhor resultado foi a MgSO<sub>4</sub>/PSA. O método proposto foi validado na matriz pimentão para 39 agrotóxicos, apresentando LD de 0,003 a 0,02  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> e LQ de 0,01 a 0,03  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. As recuperações variaram entre 70 a 120 % com CV  $\leq$  20 % para todos os agrotóxicos validados.

**Palavras-chave:** Agrotóxico. Pimentão. Validação. QuEChERS.

## Abstract

### **Optimization and validation of analytical method for determination of pesticide residues in pepper**

*The pepper (*Capsicum annuum* L.) is one of the most consumed vegetables in Brazil, especially the northeast and southeast. According to the Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), São Paulo and Minas Gerais are the main producing states with around 42 % of national production. Currently allowed by Brazilian law 56 pesticides of different chemical classes for pepper culture. In the latest report of the Program of Food Pesticide Residue Analysis (PARA) published by the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), the pepper leads the list of foods most contaminated by pesticides, 91.8 % of samples showed some contamination. Considering the environmental risks and food safety is necessary to develop and validate analytical methods efficient and safe for the determination of pesticide residues in food. This work was the development and validation of an analytical method for the determination pesticide multiresidues in peppers, using QuEChERS method modified with detection by gas chromatography micro electron capture detector - GC- $\mu$ ECD. Selectivity, linearity, working range, matrix effects, detection limit, quantification limit, precision and accuracy were evaluated. In the clean up step the mixture of phases that showed the best result was the MgSO<sub>4</sub>/PSA. The method proposed was validated in pepper matrix for 39 pesticides, with LD 0.003 to 0.02  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> and LQ 0.01 to 0.03  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Recoveries ranged from 70 to 120 % with CV  $\leq$  20% for all validated pesticides.*

**Keywords:** Pesticides. Pepper. Validation. QuEChERS.

## Introdução

O pimentão (*Capsicum annuum L.*) é uma das hortaliças de maior consumo no Brasil, principalmente pela região nordeste e sudeste. Seu sabor levemente picante é muito apreciado pelos brasileiros sendo consumido de diferentes maneiras. Possui poucas calorias e é fonte de vitaminas C e A, e minerais como cálcio, magnésio, fósforo, potássio e ferro (1-3).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), São Paulo e Minas Gerais são os principais estados produtores e respondem por cerca de 42 % da produção nacional, atingindo a marca de 115.262 toneladas no ano de 2006, estando entre as dez hortaliças mais importantes cultivadas no território brasileiro (4).

A agricultura é uma importante atividade econômica brasileira e seu processo produtivo agrícola está cada vez mais dependente dos agrotóxicos e fertilizantes químicos, sendo considerado nos últimos anos o maior mercado mundial de agrotóxicos (5).

O uso de agrotóxicos na agricultura tem como objetivo o controle e prevenção de pragas e doenças agrícolas, proporcionando o aumento de produção. Entretanto, o uso nos alimentos sem critérios técnicos adequados pode causar a ocorrência de resíduos e traços desses princípios ativos e de seus produtos de degradação. Com isso, houve a necessidade do estabelecimento de Limites Máximos de Resíduos (LMRs) que consiste na quantidade máxima de resíduo de agrotóxico, expresso em ppm ou mg kg<sup>-1</sup>, que pode estar legalmente presente nos alimentos em decorrência da aplicação adequada numa fase específica desde sua produção até o consumo. Os critérios para estabelecer o LMR de agrotóxicos

em alimentos estão relacionados a estudos supervisionados de campo, de acordo com as boas práticas agrícolas (6,7).

No Brasil, têm sido executados programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos estaduais ou de abrangência nacional - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (8).

O PARA tem como objetivo avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor. No último relatório do PARA divulgado pela ANVISA em 2013, o pimentão liderou o *ranking* dos alimentos mais contaminados por agrotóxicos, pois cerca de 90 % das amostras analisadas apresentaram problemas de contaminação (9).

Atualmente cerca de 509 ingredientes ativos (IA) são permitidos no Brasil de acordo com os critérios de uso e indicação estabelecidos em suas monografias. Para a cultura de pimentão, são permitidos pela ANVISA 56 agrotóxicos: **abamectina, acetato de 4,7- tridecatrienila, acetato de 4,7,10-tridecatrienila, azadiractina, azoxistrobina**, buprofezina, boscalida, casugamacina, ciantranilprole,  $\alpha$ -cipermetrina, cimoxanil, cleto-dim, **clomazona, clorfenapir, clorotalonil, compostos a base de cobre, cresoxim metílico, deltametrina, difenoconazol**, dimetomorfe, **1,4-dimetoxibenzozeno, ditiocarbamatos (mancozebe, metiram e propinebe)**, **enxofre**, espinetoram, **etiona**, fenamidona, fenpiroximato, fluo-

picolida, flutriafol, formetanato, fluxapiraxade, **11-hexadecenol, imidacloprido**, indoxacarbe, **iprodiona, iprovalicarbe**, lambda-cialotrina, **metconazol, metiocarbe, piraclostrobina, piriproxifem**, propamocarbe, tebuconazol, teflubenzurom, **tetradifona, tiabendazol, tiacloprido, tiametoxam**, trifloxistrobina, **trifluralina, 3,6,9-tricosatrieno** e zoxamida (10). Entretanto, há um conflito quanto à permissão do uso de alguns IA nessa cultura, no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) são permitidas 38 substâncias: acefato, estreptomina, oxitetraciclina e triclorfom, além das destacadas acima (11).

Considerando os riscos ambientais e a segurança alimentar, a preocupação pública com o excesso de resíduos de agrotóxicos ganhou relevância na última década. Assim, o desenvolvimento de métodos analíticos eficientes e seguros para a determinação de desses resíduos é essencial, tanto no contexto de programas de monitoramento para proteção da saúde pública quanto para a eliminação de barreiras técnicas nas relações comerciais entre países (12,13).

Análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos são caras e trabalhosas, devido à complexidade composição dos alimentos acarretando dificuldades para a quantificação dos agrotóxicos. Essas substâncias possuem diferentes propriedades físico-químicas e podem ocorrer em concentrações extremamente baixas na presença de altas concentrações de interferentes, os quais podem ser co-extraídos influenciando os resultados analíticos (14).

Os procedimentos envolvidos para a determinação de resíduos de agrotóxicos, envolvem etapas de extração e purificação, e a oti-



Shaiene Vieira Carmo I11  
Angélica Castanheira de Oliveira I11  
Lucia Helena Pinto Bastos I11  
Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso I11

mização dessas etapas é essencial para reduzir tempo e fontes de erro relacionadas ao procedimento. Na etapa de extração, as substâncias de interesse são isoladas dos interferentes presentes na matriz. Após a extração com solvente, pode ser necessária uma etapa de limpeza do extrato (*clean up*) para reduzir essas interferências (15,16).

As dificuldades envolvidas nas análises de resíduos de agrotóxicos foram minimizadas após o desenvolvimento de métodos multirresíduos, que foram capazes de analisar um grande número de agrotóxicos, sem interferência da matriz, de detectar e quantificar de forma inequívoca os analitos envolvidos, em baixos níveis de concentração, de forma precisa e com um pequeno número de medidas, reduzindo a produção de resíduos perigosos, tempo, trabalho empregado e custo por amostra analisada (15,16).

Atualmente, várias técnicas e métodos de preparo de amostra têm sido empregadas para a extração de agrotóxicos em matrizes complexas. Porém em 2003, com a intenção de superar as limitações dos métodos multirresíduos, o método de extração de resíduos de agrotóxicos em matrizes de frutas e legumes QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe* – rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro), foi proposto por Anastassiades e colaboradores (17), com modificações do

procedimento original descritas na literatura (15-18).

O método QuEChERS modificado é composto por três etapas principais: uma etapa de extração, uma etapa de partição e também, uma etapa de limpeza. A extração é feita com acetonitrila acidificada com 1 % de ácido acético, que proporciona uma extração ampla de agrotóxicos com diferentes polaridades e uma extração com menor quantidade de co-extrativos lipofílicos como gorduras. Na etapa de partição ocorre a adição de sais (sulfato de magnésio -  $MgSO_4$  e acetato de sódio -  $Na(C_2H_3O_2)$ ) para se obter o efeito “*salting-out*” que consiste na diminuição da solubilidade dos agrotóxicos em água bem como a diminuição de água na fase da acetonitrila. A etapa de limpeza consiste em uma extração em fase sólida dispersiva (D-SPE - *dispersive solid phase extraction*), permitindo a limpeza e redução de água residual, sendo efetuadas de uma forma rápida e simultânea (15-18).

Para o desenvolvimento deste trabalho algumas modificações foram estudadas a fim de se obter resultados mais adequados ao estudo proposto. Na etapa de extração o uso da acetonitrila não é adequado para análises em cromatografia gasosa no modo *splitless* devido a sua grande expansão de volume durante a vaporização, podendo interferir nos detectores seletivos e favorecer a degradação de alguns IA (18-20). Assim, ao fi-

nal do procedimento de extração, a acetonitrila (extrato orgânico) foi substituída por isooctano, solvente mais adequado à cromatografia gasosa acoplada a detector por micro captura de elétrons -  $Ni^{63}$  (CG- $\mu$ DCE). Na etapa de limpeza (D-SPE), diferentes e/ou mistura sorventes ( $C^{18}$ , PSA - *primary secondary amine* e carbono grafitizado) foram adicionados diretamente ao extrato orgânico, a fim de diminuir interferências, efeito matriz e a necessidade de manutenção do sistema cromatográfico (21).

O sorvente  $C^{18}$  é normalmente utilizado na remoção de interferentes apolares, como lipídeos. O PSA é um sorvente de troca aniônica, usado para remover ácidos graxos, açúcares e vários coextrativos da matriz que formam ligações de hidrogênio. O carbono grafitizado é utilizado para a redução do teor de pigmentos provenientes de amostras vegetais que possuem clorofila (21).

Assim, esse trabalho consistiu em desenvolver e validar um método analítico quantitativo para a determinação de multirresíduos de agrotóxicos em pimentão, utilizando o método de extração QuEChERS com detecção CG- $\mu$ DCE (22).

Os parâmetros de validação e aceitação avaliados neste trabalho foram: seletividade, linearidade, faixa de trabalho, efeito matriz, limite de detecção, limite de quantificação, precisão como repetibilidade e exatidão como recuperação (23,24).

## Materiais e métodos / parte experimental

As determinações analíticas foram realizadas utilizando as boas práticas de laboratório.

### Amostras

Aproximadamente 1 kg de pimentão foi adquirido no mercado local do município do Rio de Janeiro. Os pimentões foram processados (25), identificados e armazenados em freezer, sob congelamento entre -10 °C à -25 °C, até o momento de sua utilização.

### Agrotóxicos avaliados

Os agrotóxicos foram selecionados pelo critério de ser analisável através da técnica sugerida, disponibilidade no laboratório, uso permitido em culturas de hortifrutigranjeiros e de uso proibido, de modo a avaliar a aplicação de boas práticas agrícolas no campo.

Os quarenta e nove agrotóxicos selecionados para o trabalho são apresentados na Tabela 1, com suas respectivas classes e LMRs.

### Equipamentos utilizados

Para o preparo das soluções e das amostras, foi utilizado um liqüidificador com copo de vidro; balança analítica modelos XP 205 e AG 245 (ambas Mettler Toledo); centrífuga modelo TJ6 (Beckman); agitador vórtex MS3 Digital (IKA); unidade evaporadora Reacti-Vap III n° 18785 (Pierce) e cromatógrafo a gás HP7890® (Agilent Technologies), equipado com detector por micro captura de elétrons (Ni<sup>63</sup>), sistema de injeção automático e estação de trabalho com o software *ChemStation*.

**Tabela 1.** Agrotóxicos estudados no processo de validação com suas respectivas classes e LMR<sup>1</sup>.

Agrotóxico	Classe	LMR (mg kg <sup>-1</sup> )	Agrotóxico	Classe	LMR (mg kg <sup>-1</sup> )
azoxistrobina	estrobilurina	0,5	forato	organofosforado	ME
clorotalonil	isoflotalonitrila	5,0	heptacloro -exo-epóxido	organoclorado	ME
deltametrina	piretróide	0,01	2,4'-DDD	organoclorado	ME
lambda-cialotrina	piretróide	0,2	2,4'-DDE	organoclorado	ME
tetradifona	clorodifenilsulfona	1,0	2,4'-DDT	organoclorado	ME
trifluralina	dinitroanilina	0,05	4,4'-DDD	organoclorado	ME
alaclo	cloroacetanilida	NA	4,4'-DDE	organoclorado	ME
bifentrina	piretróide	NA	4,4'-DDT	organoclorado	ME
captana	dicarboximida	NA	α-endossulfam	clorociclodieno	ME
ciflutrina	piretróide	NA	α-HCH	organoclorado	ME
clorpirifós	organofosforado	NA	aldrin	organoclorado	ME
dicofol	organoclorado	NA	β-endossulfam	clorociclodieno	ME
esfenvalerato	piretróide	NA	β-HCH	organoclorado	ME
fenpropratrina	piretróide	NA	carbofenotona	organofosforado	ME
fenitrotiona	organofosforado	NA	clorpirifós metil	organofosforado	ME
fipronil	pirazol	NA	s-HCH	organoclorado	ME
folpete	dicarboximida	NA	dieldrin	organoclorado	ME
metidationa	organofosforado	NA	endossulfam sulfato	clorociclodieno	ME
oxifluorfem	éter difenílico	NA	endrin	organoclorado	ME
permetrina	piretróide	NA	g-HCH (Lindano)	organoclorado	ME
procimidona	dicarboximida	NA	HCB	organoclorado	ME
bioaletrina	piretróide	-	heptacloro	organoclorado	ME
cipermetrina	piretróide	-	metoxicloro	organoclorado	ME
fenvalerato	piretróide	-	mirex	organoclorado	ME
-	-	-	vinclozolina	dicarboximida	ME

1 - Consulta de LMR no site da ANVISA em 18/04/2016 (10); | NA - Monografia Não Autorizada para a cultura de pimentão; ME - Monografia Excluída.



### Condições cromatográficas

Temperatura do injetor e detector de 230 °C e 300 °C, respectivamente. Coluna 5 % fenil metil siloxano de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. Programação de temperatura do forno de 80 °C (0 min)<sup>@30 °C/min</sup> até 180 °C (8 min)<sup>@2 °C/min</sup> até 200 °C (5 min)<sup>@6 °C/min</sup> até 280 °C (15 min). Fluxo de gás carreador He (Hélio) de 1,2 mL min<sup>-1</sup>, fluxo da purga do septo de 2,9 mL min<sup>-1</sup>, fluxo total de 64,1 mL min<sup>-1</sup>, fluxo de gás *make up* (Nitrogênio) de 60 mL min<sup>-1</sup>, modo de injeção *splitless* com abertura da válvula de 0,75 min e volume de injeção de 1,0 µL. Tempo total de corrida de 60 min e integração pelo parâmetro de área de picos.

### Padrões e reagentes

Foram utilizados acetoneitrila (Merck), isooctano (Tedia) e acetato de etila (Tedia), solventes orgânicos de alta pureza e grau cromatográfico; ácido acético (Merck); MgSO<sub>4</sub> anidro (Merck); Na(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> anidro (Tedia), seco a 220 °C por 3 horas antes do uso; sorvente BONDESIL-PSA 40 µm (Varian); C<sub>18</sub> 55-105 µm (Waters) e carvão grafitizado PA (Merck).

Os padrões de agrotóxicos utilizados apresentam certificado de análise com grau de pureza superior a 92,0 % para os do fabricante *Dr. Ehrenstorfer* - Augsburg, Alemanha e superior a 97,5% para os do fabricante *AccuStandard*.

### Preparo das soluções analíticas

As soluções estoque (SE) de concentração nominal de 100 µg mL<sup>-1</sup> foram preparadas, individualmente, pela dissolução do padrão sólido em diferentes solventes (isooctano e acetato de etila), considerando sua solubilidade e o grau de pureza, identificadas, armazenadas em frasco âmbar e estocadas sob congelamento no freezer (-10 °C à -25 °C), até o momento de uso.

A partir dessas soluções foram preparadas em solvente isooctano soluções intermediárias (SI) de mistura de agrotóxicos em diferentes faixas de concentrações, a fim de

serem utilizadas para fortificação - 3 níveis (N1: 0,15 µg mL<sup>-1</sup>; N2: 1,0 µg mL<sup>-1</sup> e N3: 2,0 µg mL<sup>-1</sup>) e para curva de calibração - 6 pontos (P1: 0,005 µg mL<sup>-1</sup>; P2: 0,01 µg mL<sup>-1</sup>; P3: 0,05 µg mL<sup>-1</sup>; P4: 0,1 µg mL<sup>-1</sup>; P5: 0,15 µg mL<sup>-1</sup>; P6: 0,2 µg mL<sup>-1</sup>).

Os agrotóxicos avaliados foram divididos em três misturas - 1, 2 e 3, como apresentado na Tabela 2. A escolha dos agrotóxicos para compor cada mistura foi feita de modo a acomodar todos os analitos pesquisados sem sobreposição de tempo de retenção, possibilitando uma separação inequívoca de todas as substâncias avaliadas.

**Tabela 2.** Agrotóxicos avaliados por mistura – mistura 1, 2 e 3.

AGROTÓXICOS		
Mistura 1	Mistura 2	Mistura 3
trifluralina	forato	α-HCH
HCB	β-HCH	γ-HCH (Lindano)
clorotalonil	σ-HCH	clorpirifós metil
vinclozolina	alacloro	heptacloro
fenitrotiona	clorpirifós	aldrin
dicofol	hepta-exo-epóxido	fipronil
captana	bioaletrina	procimidona
folpete	metidationa	4,4'-DDE
2,4'-DDE	α-endossulfam	oxifluorfem
dieldrin	2,4'-DDD	2,4'-DDT
β-endossulfam	4,4'-DDD	carbofenotiona
endrin	4,4'-DDT	fempropatrina
endossulfam	metoxicloro	lambda-cialotrina
bifentrina	mirex	cipermetrina
tetradifona	ciflutrina	deltametrina
permetrina	esfenvalerato	-
fenvalerato	-	-
azoxistrobina	-	-

### Método de extração

O procedimento de extração multirresíduos utilizado neste estudo foi o método QuEChERS modificado composto de três etapas: a extração com acetonitrila acidificada, seguida de partição, promovida pela adição de sais e limpeza da amostra com sorventes (15-21).

Foi realizada a pesagem de  $\pm 15,0$  g de amostra em um tubo de centrifuga de polipropileno – tipo “falcon” (capacidade 50,0 mL). Para a etapa de fortificação, foi adicionado 1,0 mL de solução de fortificação com concentração conhecida para cada um dos três níveis de cada mistura estudada à amostra processada. Agitou-se no vórtex por 30 s e aguardou-se 15 min. Em seguida, na etapa de extração, 15 mL de acetonitrila (MeCN) contendo 1 % (v/v) de ácido acético (HAc) foram adicionados, seguido por agitação em vórtex por 30 s. Após, para a realização da etapa de partição, foram adicionados 6,0 g de  $MgSO_4$  e 1,5 g de  $Na(C_2H_3O_2)$ , repetida a agitação e o tubo foi centrifugado a 3000 rpm durante 7 min.

Para a etapa de purificação, uma

alíquota de 2,0 mL do sobrenadante (extrato orgânico) foi retirada e transferida para um outro tubo de centrifuga de polipropileno (capacidade 15,0 mL) contendo a D-SPE escolhida na otimização, apresentada a seguir, seguido pela a agitação e centrifugação. Uma alíquota de 1,0 mL do extrato orgânico final foi retirada, transferida para um vial contendo uma pedra de *carborundum* e evaporada sob leve fluxo de nitrogênio ( $N_2$ ) até a secura. Após, o extrato seco foi ressuscitado em 1,0 mL de isooctano para a análise cromatográfica, de acordo com as condições estabelecidas.

### Otimização da etapa de purificação

Um estudo prévio na etapa de limpeza foi realizado, para avaliar a influência da etapa de purificação na exatidão do método. Foram efetuadas diferentes combinações de sorventes, buscando uma melhor eficiência nessa etapa, empregando a técnica de D-SPE. Foram testadas, na mistura 1, quatro diferentes fases:  $MgSO_4/PSA$ ,  $MgSO_4/PSA/C_{18}$ ,  $MgSO_4/PSA/C_{18}/carvão$  ativo e  $MgSO_4/PSA/carvão$  ativo (21).

A escolha da melhor combinação de sorventes em fase estacionária para a etapa de limpeza da D-SPE, teve como parâmetro ideal percentuais de recuperação entre 70 e 120%, e esta foi à utilizada para validação (24). O fluxograma da extração pelo método QuEChERS modificado utilizado para essa validação encontra-se apresentado na Figura 1.

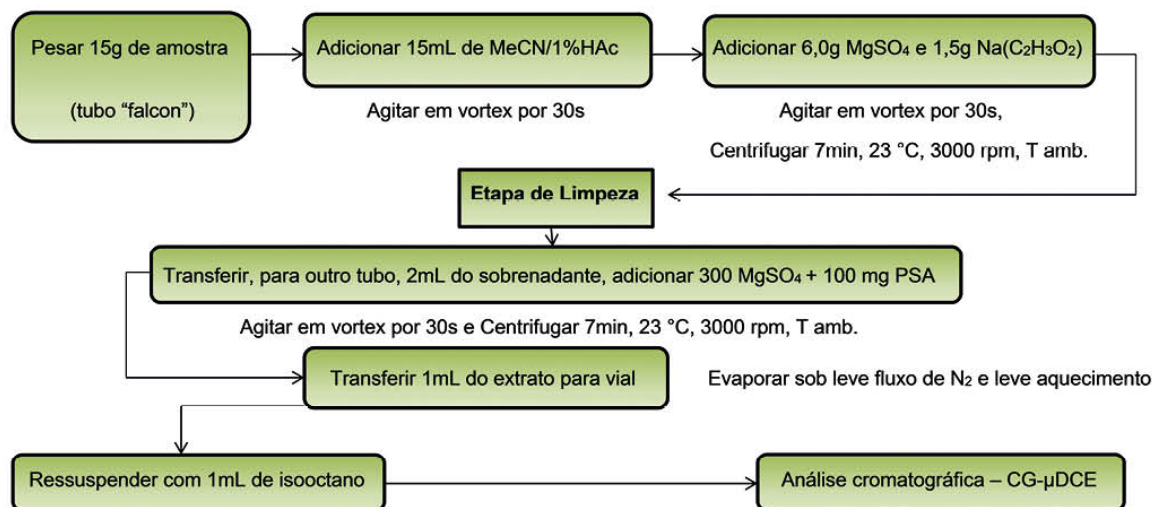
### Validação do método de ensaio

Os parâmetros avaliados na validação foram seletividade, linearidade, faixa de trabalho, efeito matriz, LD, LQ, precisão e exatidão. A avaliação de desempenho e critérios de aceitação dos resultados obtidos foram avaliados em função dos parâmetros estudados e critérios de aceitação definidos no CO-DEX e no SANTE (23,24).

#### • Seletividade

A seletividade foi verificada a partir da análise de duas alíquotas do extrato orgânico da polpa de pimentão quanto à ausência de resíduos de agrotóxicos estudados identificados por CG- $\mu$ DCE, que

Figura 1. Fluxograma da extração pelo método QuEChERS modificado utilizado na validação.





Shaiene Vieira Carmo I11  
 Angélica Castanheira de Oliveira I11  
 Lucia Helena Pinto Bastos I11  
 Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso I11

possam interferir na sua determinação, apresentando um resultado positivo com a ausência do agrotóxico (avaliação do branco).

- **Linearidade, Faixa de trabalho Efeito Matriz**

Para avaliação desses parâmetros, foram construídas curvas analíticas em solvente isooctano e no extrato orgânico da polpa de pimentão. Para preparação da curva na matriz, 1 mL do extrato orgânico do branco da polpa de pimentão foi evaporado sob atmosfera de N<sub>2</sub> e após secura dissolvido em 1 mL da mistura de agrotóxico em solvente com concentração correspondente ao ponto da curva analítica. Esse procedimento foi realizado para os seis pontos da curva - três misturas estudadas - preparadas em solvente e matriz e injetadas duas vezes no CG- $\mu$ DCE. As concentrações referentes ao intervalo de trabalho estudado, foram as utilizadas na faixa de preparo da curva analítica.

A linearidade da faixa de trabalho foi verificada através da leitura da curva analítica utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários de acordo com relação linear, verificando a existência de valores aberrantes (teste de *Grubbs* -  $p = 0,05$ ), a homogeneidade na variância dos resíduos da regressão (método de Cochran) e a significância da regressão ( $r \geq 0,98$  e  $R^2 \geq 0,95$ ).

Para avaliação do efeito matriz,

comparou-se o conjunto de áreas medidas das soluções da curva analítica preparada em solvente isooctano com as preparadas com o extrato branco da polpa de pimentão para cinco níveis de concentração, dentre os seis pontos estudados, excluindo o menor ponto. Foram aplicados aos dados os testes F (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e o teste t (*Student*) de comparação de médias, através do aplicativo Excel®.

- **Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)**

Os LD e LQ do método foram calculados a partir da avaliação da relação da razão sinal/ruído (S/N) para cada agrotóxico avaliado, ou seja, o sinal produzido através da resposta de injeção de uma concentração conhecida do analito de interesse é 3 vezes maior para o LD e 10 vezes maior para o LQ, do que o sinal produzido pelo ruído da linha de base do sistema cromatográfico.

Para calcular estes parâmetros, foram injetados seis vezes 1  $\mu$ L de uma amostra de pimentão fortificado com as misturas 1, 2 e 3, no P2 da faixa linear, contendo os 49 agrotóxicos na concentração nominal entre 0,01 a 0,04  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.

- **Precisão e Exatidão**

Para avaliação da precisão (estudo de repetibilidade) e da exatidão (estudo de recuperação), preparou-se amostras em cinco

replicatas de polpa de pimentão fortificado com as três misturas de estudo nos 3 níveis diferentes de concentração e injetadas duas vezes cada. O primeiro nível de fortificação - N1 (correspondente ao P2 da curva analítica) sendo este utilizado para confirmação do LQ do método calculado a partir dos valores observados através da relação S/N.

A repetibilidade foi expressa pela dispersão dos resultados entre todas as replicatas em cada nível de concentração estudada, o valor do coeficiente de variação (CV) aceitável é de  $\leq 20$  %. A taxa de recuperação foi calculada pela divisão entre a concentração média experimental com a concentração média teórica multiplicada por 100. A faixa de variação aceitável é de 70 – 120 % para as concentrações estudadas e foi expressa para cada nível de concentração estudada (24).

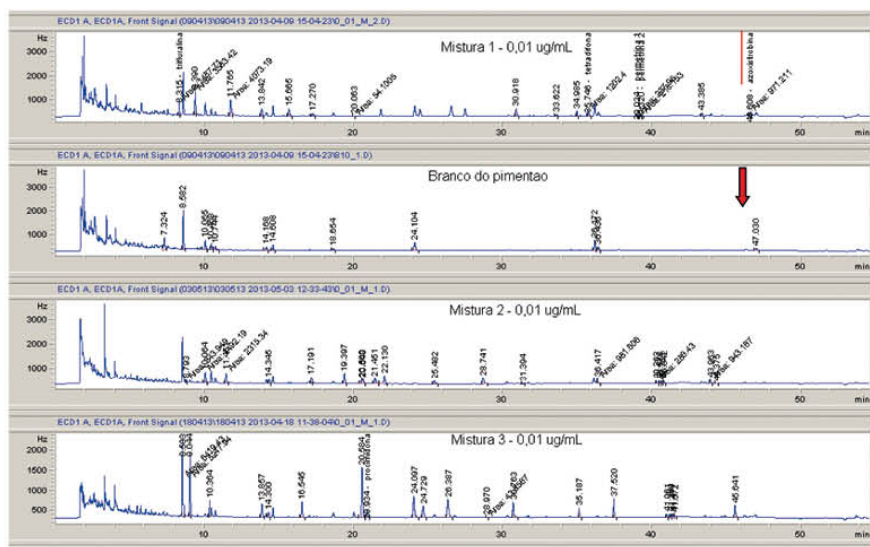
## **Resultados e discussão**

### **Otimização da etapa de purificação**

Para o estudo realizado antes da validação, mistura 1, que testou quatro diferentes fases sólidas dispersivas na etapa de limpeza para avaliação da influência na exatidão do método, a mistura de fases que apresentou melhor resultado foi a MgSO<sub>4</sub>/PSA, sendo utilizada na etapa de validação. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos neste estudo preliminar.

**Tabela 3.** Recuperação das diferentes fases empregadas na etapa de limpeza (%).

AGROTÓXICOS	MgSO <sub>4</sub> + PSA		MgSO <sub>4</sub> + PSA + C18		MgSO <sub>4</sub> + PSA + C18 + carvão		MgSO <sub>4</sub> + PSA + carvão	
	curva solvente	curva matriz	curva solvente	curva matriz	curva solvente	curva matriz	curva solvente	curva matriz
trifluralina	99	96	97	94	61	59	49	47
HCB	93	88	79	75	1	1	1	1
clorotalonil	138	95	148	103	-	-	-	-
vinclozolina	117	101	115	99	74	63	63	54
fenitrotiona	135	99	135	99	42	31	33	24
dicofol	102	93	72	66	28	26	31	28
captana	76	65	82	70	16	14	17	14
folpete	123	70	133	76	12	7	8	5
2,4'-DDE	103	98	103	97	51	48	44	41
dieldrin	85	101	86	102	72	85	66	78
β-endossulfam	92	101	94	104	72	80	70	77
endrin	97	99	98	100	68	69	62	63
endossulfan	100	102	103	105	87	89	87	89
bifentrina	111	101	116	105	26	23	21	19
tetradifona	133	105	139	110	14	11	12	9
permetrina	137	99	143	103	7	5	5	4
fenvalerato	153	109	160	115	7	5	5	3
azoxistrobina	165	127	174	134	40	31	31	24



Fonte: Agilent ChemStation Rev B.04.01

**Figura 2.** Cromatogramas do branco da polpa de pimentão e das misturas 1, 2 e 3 na concentração correspondente ao segundo ponto da curva analítica em matriz.

**Seletividade**

A amostra branco de pimentão avaliada apresentou sinal no tempo de retenção do agrotóxico azoxistrobina não sendo, desse modo, este analito empregado para o estudo de validação. Para os demais agrotóxicos a polpa de pimentão foi considerada adequada para a execução da metodologia proposta.

Na Figura 2 são apresentados os cromatogramas da amostra branco de pimentão e do segundo ponto da curva analítica preparada em matriz.

**Linearidade, Faixa de trabalho e Efeito Matriz**

O teste de *Grubbs* foi aplicado as respostas representadas pelas

áreas cromatográficas, não obtendo nenhum valor considerado como aberrante.

A condição de homoscedasticidade dos resíduos foi confirmada para 48 agrotóxicos na utilização da curva em matriz contendo cinco pontos (P2 ao P6) exceto para o **metoxicloro** que apresen-





Shaiene Vieira Carmo I11  
 Angélica Castanheira de Oliveira I11  
 Lucia Helena Pinto Bastos I11  
 Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso I11

tou esta condição na curva com quatro pontos (P3 ao P6). Alguns agrotóxicos apresentaram a condição de homocedasticidade na curva em solvente também para 5 ou 6 pontos.

As curvas analíticas preparadas em solvente isoocetano e no extrato orgânico da polpa de pimentão mostraram-se linear – regressão significativa, na faixa de concentração estudada para todos os 49 agrotóxicos estudados apresentando na maioria dos casos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) maiores ou iguais a 0,95. Considerando a avaliação da curva preparada em matriz com cinco pontos apenas a **captana** e **4,4'-DDT** apresentaram o valor de R<sup>2</sup> abaixo de 0,95.

O efeito da matriz avaliado pelo modelo proposto foi observado para quatro agrotóxicos em questão – **captana**, **bioaletrina**, **esfenvalerato** e **2,4'-DDT**. Assim a curva analítica a ser utilizada para avaliação de 45 agrotóxicos, dentre os 49 objetos de estudo, em polpa de pimentão pode ser construída no solvente ou na matriz.

#### Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os valores de LD e LQ do método calculados estão de acordo com o laboratório no que se refere ao o equipamento CG- $\mu$ DCE e abaixo dos LMRs estabelecidos pela ANVISA para as substâncias clorotalonil (LMR = 5,0 mg kg<sup>-1</sup>),

lambda-cialotrina (LMR = 0,2 mg kg<sup>-1</sup>), tetradifona (LMR = 1,0 mg kg<sup>-1</sup>), trifluralina (LMR = 0,05 mg kg<sup>-1</sup>) e azoxistrobina (LMR = 0,5 mg kg<sup>-1</sup>). Para a **deltametrina** (LMR = 0,01 mg kg<sup>-1</sup>) o valor do LQ do método calculado e testado está acima do LMR (10).

Embora os valores das razões S/N produzidas terem sido superiores a 3 - com exceção da **captana**, **folpete**, **4,4'-DDT**, **2,4'-DDT** e **metoxicloro** - decidiu-se manter a concentração nominal de 0,003 a 0,02  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> como base para cálculos do parâmetro limite de detecção do método e de 0,01 a 0,03  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> para limite de quantificação do método que corresponde ao nível testado de fortificação.

#### Precisão (repetibilidade) e Exatidão (taxa de recuperação)

De acordo com os critérios estabelecidos para resíduos de agrotóxicos por órgãos internacionais, os valores de CV % calculados estão dentro do aceitável  $\leq 20$  %, exceto para **captana** (solvente), **forato** (solvente e matriz), **metoxicloro** (solvente e matriz) e **4,4'-DDT** (matriz).

Para a maioria dos agrotóxicos estudados através da curva em matriz a taxa de recuperação está de acordo com as indicadas pela legislação para resíduos de agrotóxicos. Entretanto, observou-se que essas taxas se apresentaram fora da faixa determinada (70 a 120 %)

para: **HCB**, **clorotalonil**, **dicofol**, **azoxistrobina**, **forato**, **4,4'-DDT**, **metoxicloro** e **2,4'-DDT** nos níveis estudados.

Na Tabela 4 pode-se observar a taxa de recuperação, os desvios padrão e os CVs (%) calculados para cada agrotóxico.

Com os resultados obtidos no processo de validação, o método proposto foi considerado validado para: **2,4'-DDD**, **2,4'-DDE**, **4,4'-DDD**, **4,4'-DDE**,  $\alpha$ -**endossulfam**,  $\beta$ -**HCH**, **alacolor**, **aldrin**,  $\beta$ -**endossulfam**,  $\beta$ -**HCH**, **bifentrina**, **bioaletrina**, **carbofenotona**, **ciflutrina**, **cipermetrina**, **clorpirifós**, **clorpirifós metil**,  $\sigma$ -**HCH**, **dieldrin**, **endossulfam sulfato**, **endrin**, **esfenvalerato**, **fenpropratrina**, **fenitrotiona**, **fenvalerato**, **fipronil**, **folpete**,  $\gamma$ -**HCH** (**Lindano**), **heptacloro**, **heptacloro-exo-epóxido**, **lambda-cialotrina**, **metidationa**, **mirex**, **oxifluorfem**, **permetrina**, **procimidona**, **tetradifona**, **trifluralina** e **vinclozolina**.

#### Conclusão

O método de extração QuE-ChERS modificado com determinação por CG- $\mu$ DCE, proposto neste trabalho, foi validado na matriz pimentão permitindo a determinação multirresíduos para 39 agrotóxicos, dos 49 agrotóxicos avaliados, atendendo os critérios estabelecidos para resíduos de agrotóxicos em alimentos por órgãos internacionais e pela legislação nacional.

**Tabela 4.** Taxa de recuperação e CV (%).

Agrotóxicos	Em solvente						Em matriz					
	Recuperação - %			CV - %			Recuperação - %			CV - %		
	Média			N1	N2	N3	Média			N1	N2	N3
	N1	N2	N3				N1	N2	N3			
2,4'-DDD	141	114	106	2	2	4	101	106	105	2	3	4
2,4'-DDE	104	100	106	2	13	1	91	91	96	2	1	1
2,4'-DDT	241	54	16	11	14	16	125	199	81	11	14	15
4,4'-DDD	150	124	115	2	2	4	95	102	103	2	2	4
4,4'-DDE	87	15	84	9	3	3	87	91	105	8	3	3
4,4'-DDT	-	87	28	-	0	11	78	128	84	22	0	10
$\alpha$ -endossulfam	105	104	101	1	2	3	96	106	105	1	2	3
$\alpha$ -HCH	98	80	80	10	1	4	83	85	88	10	1	4
alacoloro	140	122	113	3	1	3	101	113	109	3	1	3
aldrin	88	84	87	10	2	2	88	88	92	10	2	2
azoxistrobina	735	303	221	3	5	5	184	121	99	3	5	5
$\beta$ -endossulfam	92	92	90	1	3	2	96	101	100	1	3	2
$\beta$ -HCH	687	207	132	7	6	3	110	119	98	7	6	3
bifentrina	119	109	114	2	2	3	100	100	101	2	2	2
bioaletrina	161	130	121	2	2	3	101	110	108	2	2	3
captana	80	5	1	22	0	35	100	102	105	18	4	6
carbofenotiona	116	101	100	8	4	2	90	92	95	8	4	2
ciflutrina	0	237	207	-	4	4	107	108	111	4	3	2
cipermetrina	196	161	131	10	2	2	90	99	98	10	2	2
clorotalonil	81	45	64	9	12	7	56	39	68	9	11	7
clorpirifós	136	122	112	2	2	3	102	111	105	1	2	3
clorpirifós metil	149	131	124	9	2	2	95	98	98	9	2	1
deltametrina	218	182	150	7	5	2	96	91	87	7	5	2
$\alpha$ -HCH	215	155	141	5	3	4	108	104	104	5	3	4
dicofol	109	125	96	15	11	11	48	87	71	15	11	10
dieldrin	96	95	93	2	3	2	96	101	100	1	2	2
endossulfam	100	90	86	1	2	3	91	96	95	1	2	2
endrin	122	82	75	3	2	3	116	91	89	3	3	3
esfenvalerato	912	382	326	4	8	2	118	118	106	5	6	2
fempropatrina	121	104	100	9	3	2	93	99	99	9	2	2
fenitrotiona	191	128	140	2	2	1	90	93	98	3	2	1
fenvalerato	194	166	166	3	3	6	94	98	94	3	3	6
fipronil	157	123	104	9	3	20	107	99	89	9	3	20
folpete	674	74	24	4	4	8	118	115	119	4	4	9
forato	67	80	75	21	19	5	54	76	69	21	19	5
$\gamma$ -HCH (Lindano)	108	73	68	9	4	2	77	77	77	9	4	3
HCB	82	71	86	8	12	6	79	64	82	8	11	6
heptacloro	86	62	56	10	3	4	70	71	71	11	3	4
heptacloro-exo-epóxido	114	107	102	1	2	3	99	104	102	1	2	3
lambda-cialotrina	129	113	104	11	2	1	95	93	94	11	2	1
metidationa	915	400	332	4	3	10	112	111	110	4	3	3
metoxicloro	-	22	33	-	22	8	-	53	80	-	22	8
mirex	99	90	80	6	2	4	94	102	97	5	2	3
oxifluorfen	113	99	97	12	4	2	95	98	99	8	4	2
permetrina	180	132	150	5	3	20	90	99	101	5	4	4
procimidona	59	67	71	8	4	1	95	104	104	8	4	2
tetradifona	149	125	124	4	2	3	93	94	95	3	2	3
trifluralina	90	84	103	6	5	12	87	81	102	6	5	12
vinclozolina	126	115	120	1	2	1	98	98	99	1	2	1

## Referência

(1) EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Capsicum pimentas e pimentões no Brasil. Brasília, [2001]. Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/capsicum/especies.htm>>. Acesso em 18 de abril de 2016.

(2) IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 – Aquisição alimentar domiciliar per capita. Rio de Janeiro, 2010. 282 f.

(3) IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 – Tabelas de composição nutricional dos alimentos consumidos no Brasil. Rio de Janeiro, 2011. 351 f.

(4) IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário de 2006. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <[http://ftp://ftp.ibge.gov.br/Censos/Censo\\_Agropecuario\\_2006/Segunda\\_Apuracao/censoagro2006\\_2apuracao.pdf](http://ftp://ftp.ibge.gov.br/Censos/Censo_Agropecuario_2006/Segunda_Apuracao/censoagro2006_2apuracao.pdf)>. Acesso em 18 de abril de 2016.

(5) ABRASCO. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. Rio de Janeiro, 2012. 101 f.

(6) JARDIM, O, N. A.; CALDAS, D. E. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. Química nova, Brasília, v. 32, n. 7, p. 1898-1909, 27 jul. 2009.

(7) BRASIL. Presidência da República – Casa Civil. Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Publicado no Diário Oficial da União, Brasília, DF, 08 de Janeiro de 2002. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/2002/d4074.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm)>. Acesso em 18 de abril de 2016.

(8) EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Análise das Violações encontradas em Alimentos nos Programas Nacionais de Monitoramento de Agrotóxicos. São Paulo, jun. 2013. 19 f.



Shaiene Vieira Carmo I11  
 Angélica Castanheira de Oliveira I11  
 Lucia Helena Pinto Bastos I11  
 Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso I11

results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of AOAC International*, v. 88, n. 2, p. 615–629, 2005.

(9) ANVISA. Relatório de atividades de 2011 e 2012 – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Brasília, 29 out. 2013. 44 f.

(10) ANVISA. Monografias de Agrotóxicos. Brasília, [2014]. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos>>. Acesso em 18 de abril de 2016.

(11) MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Relatório Consolidado de Ingredientes Ativos. Brasília, [2014]. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em 18 de abril de 2016.

(12) PANG, G. -F.; CAO, Y. -Z.; ZHANG, J. -J.; FAN, C. -L.; LIU, Y. -M.; LI, X. -M.; JIA, G. -Q.; LI, Z. -Y.; SHI, Y. -Q.; WU, Y. -P.; GUO, T. -T. Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography cleanup/gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, China*, v. 1125, p. 1-30, 2006.

(13) MUNÓZ, J. A.; GONZÁLEZ, L. F.; GARCIA-AYUSO, L. E.; CASADO, A. G.; CUADROS-RODRIGUEZ, L. A new approach to qualitative analysis of organophosphorus pesticide residues in cucumber using a double gas chromatographic system: GC-pulsed-flame photometry and retention time locking GC/mass spectrometry. *Talanta, Espanha*, v. 60, p. 433-77, 2003.

(14) WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuE-ChERS methodology. *Food Chemistry, Polônia*, v. 125, n. 3, p. 803-812, 01 abr. 2011.

(15) PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuE-ChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova, Santa Maria*, v. 32, n. 4, p. 1620-1634, 28 jul. 2009.

(16) PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Scientia Chromatographica, Santa Maria*, v. 3, n. 1, p. 51-64, 2011.

(17) ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, v. 86, p. 412-431, 2003.

(18) LEHOTAY, S. J.; DE KOK, A.; HIE-MSTRA, M.; ODENGRAVEN, P. V. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *Journal of AOAC International*, v. 88, n. 2, p. 595–614, 2005.

(19) LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve

(20) BASTOS, L. H. P.; GOUVÊA, A. V.; MÁLAGA, F.; CARDOSO, M. H. W. M.; JACOB, S. C.; NÓBREGA, A. W. Implementação de método analítico para determinação de resíduos de organofosforados em leite por cromatografia a gás com detector fotométrico de chama. *Química Nova*, v. 35, n. 8, p. 1657-1663, 2012.

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

(22) CARMO, S.V. Implementação, Validação e Análise de Resíduos de Agrotóxicos em matriz pimentão. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialista em Vigilância Sanitária). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015. 79f.

(23) CODEX, Alimentarius Commission. Guidelines on Good Laboratory Practice in Residue Analysis - CAC/GL 40-1993. Rev.01. Rome: FAO/WHO Joint Publications, 2003. Disponível em: <[http://www.codexalimentarius.net/download/standards/378/cxg\\_040e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/378/cxg_040e.pdf)>. Acesso em 18 de abril de 2016.

(24) SANTE, European Commission. Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed - Document n° SANTE/11945/2053. Europa, 01 Jan. 2016. 48 f.

(25) CODEX, Alimentarius Commission. Pesticide Residues in Food - Methods of Analysis and Sampling. v. 2A, part 1. Second Edition. Rome, 2000. 106 f