

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
Centro de Energia Nuclear na Agricultura**

**Validação de método de análises multiresíduo para determinação
de pesticidas em morango (*Fragaria ananassa* Duch) e quinoa
(*Chenopodium quinoa* Willd), por técnicas cromatográficas
CG- μ ECD e LC-MS/MS**

Franz Zirena Vilca

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Ecologia
Aplicada

**Piracicaba
2012**

Franz Zirena Vilca
Engenheiro Agrônomo

Validação de método de análises multiresíduo para determinação de pesticidas em morango (*Fragaria ananassa* Duch) e quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), por técnicas cromatográficas CG- μ ECD e LC-MS/MS

Orientador:
Prof. Dr. **VALDEMAR LUIZ TORNISIELO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Ecologia Aplicada

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Vilca, Franz Zirena

Validação de método de análises multiresíduo para determinação de pesticidas em morango (*Fragaria ananassa* Duch) e quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), por técnicas cromatográficas CG- μ ECD e LC-MS/MS / Franz Zirena Vilca. - - Piracicaba, 2012.

104 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 2012.

1. Contaminação 2. Cromatografia 3. Morango 3. Quinoa 4. Resíduos de pesticidas em plantas I. Título

CDD 634.75
V699v

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

À Samantha Rosidé Zirena Choque

OFEREÇO

Ao meu querido papai:

Ernesto Chambi Cruz

Minhas queridas mães:

Rosalinda Cruz Ordoñez

Judith Vilca Zapata *“in memoriam”*

Benedicta Zapata Fernandez *“in memoriam”*

Minha querida titia:

Clorinda Vilca Zapata

Aos meus irmãos:

Edgar Flores Vilca

Marianella Zirena Vilca

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de viver e ser parte da vida das pessoas que amo e por ter colocado aquele anjo no meu caminho chamado Ernesto;

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo e em especial, ao Laboratório de Ecotoxicologia por disponibilizar a estrutura e as condições necessárias e adequadas ao desenvolvimento do trabalho;

Ao professor orientador Dr. Valdemar Luiz Tornisielo, pelo apoio e orientação deste trabalho, pelos conselhos profissionais e pessoais;

A Maria Aparecida Costa, pelo carinho, consideração e correções do meu plano inicial e trabalho final da minha pesquisa;

A Carina Nazato pela ajuda na realização das análises e formatação do trabalho final;

A Mara Casarin, secretária do PPGI-EA pelo auxílio administrativo durante todo meu curso de doutorado;

Aos técnicos do Laboratório de Ecotoxicologia do CENA/USP, Carlos Dorelli e Rodrigo Pimpinato, pela amizade e auxílio na fase experimental;

Aos colegas: Nadia Hortense, Rafael Grossi, Rafael Leal, Sergio, Neide, Bruno, Marcela Viti, Paulo A. Toledo e Mayra, Flávia, Bruna Alexandre, Thais Campion, Alyne, Graziela, Aderbal, Débora, Carol e Felipe, Jeane Gisele, e Ademar pela amizade e colaboração;

Aos amigos: Maria Emilene Correia, Erick Espinoza, Marco Aurelio, Pedro Mansilla, Eleonora Zambrano, Carlos Baca, Luciana Custodio, Jane Jaisse, muito obrigado pela amizade;

Aos amigos colombianos, equatorianos, argentinos, brasileiros e peruanos e todos os que esqueci mencionar, todos eles estudantes dos programas da ESALQ/USP, pela amizade e momentos vividos;

Ao Engenheiro Roberto Valdivia e seus colaboradores da ONG CIRNMA no Perú, pelo apoio na coleta das amostras de quinoa;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa;

Ao CNPq e CAPES pela bolsa de estudos concedida;

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram com este trabalho.

"Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente destituído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão".

São Francisco de Assis

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
Referências	18
2 ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS EM QUINOA (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd) USANDO O MÉTODO QuEChERS COM CG- μ ECD.....	21
Resumo.....	21
Abstract.....	21
2.1 Introdução	22
2.2 Material e métodos.....	24
2.2.1 Reagentes e materiais.....	24
2.2.2 Equipamento	27
2.2.3 Preparo da amostra.....	27
2.2.4 Validação do método analítico	27
2.3 Resultados e discussão.....	28
2.3.1 Validação.....	28
2.3.2 Análises das amostras	31
2.5 Sugestões	34
Referências	34
3 EFEITO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS DE AMOSTRAS DE QUINOA (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd) NO PROCESSO DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE SETE AGROTÓXICOS COM USO DE CG- μ ECD.....	39
Resumo.....	39
Abstract.....	39
3.1 Introdução	40
3.2 Material e métodos.....	43
3.2.1 Reagentes e materiais químicos	43
Os padrões analíticos dos agrotóxicos clorotalonil, heptacloro, captan, α -endosulfan, dieldrin, β -endosulfam e endosulfan sulfato foram obtidos da ChemService (West Chester, PA, USA), com $\geq 98,9\%$ de pureza. A solução de mistura dos pesticidas foi	

preparada em tolueno grau HPLC e armazenada sob temperatura de -18°C. A solução de trabalho foi preparada diariamente.....	43
3.2.2 Equipamento.....	44
3.2.3 Preparo de amostras	44
3.3 Resultados e discussão	47
3.3.1 Validação do método analítico	47
3.3.2 Seletividade dos agrotóxicos no CG- μ ECD	50
3.3.3 Linearidade	50
3.3.4 Cálculo dos limites de detecção e quantificação do método.....	51
3.3.5 Recuperações.....	52
3.4 Conclusões	54
Referências.....	55
4 ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS EM MORANGO USANDO O MÉTODO QUECHERS COM CG- μ ECD	59
Resumo	59
Abstract.....	59
4.1 Introdução	60
4.2 Material e métodos	61
4.2.1 Reagentes e materiais	61
4.2.2 Equipamento.....	62
4.2.3 Preparo da amostra	62
4.2.4 Validação do método analítico	63
4.3 Resultados e discussão	63
4.3.1 Validação do método	63
4.3.2 Análises das amostras.....	67
4.4 Conclusões	68
4.5 Sugestões.....	68
Referências.....	68
5 VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE ANÁLISES MULTIRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM MORANGO USANDO LC-MS/MS.....	73
Resumo	73
Abstract.....	73
5.1 Introdução	74
5.2 Material e métodos	75

5.2.1 Reagentes e materiais.....	75
5.2.2 Equipamento	76
5.2.3 Preparo da amostra.....	78
5.2.4 Validação do método analítico	78
5.3 Resultados e discussão.....	79
5.3.1 Validação do método.....	79
5.3.2 Análises das amostras	79
5.4 Conclusões.....	84
Referências	84
6 ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM QUINOA (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd) USANDO O MÉTODO QuEChERS COM LC-MS/MS.....	89
Resumo.....	89
Abstract	89
6.1 Introdução	90
6.2 Material e métodos.....	92
6.2.1 Reagentes e materiais.....	92
6.2.2 Equipamento	94
6.2.3 Preparo da amostra.....	96
6.2.4 Validação do método analítico	97
6.3 Resultados e discussão.....	98
6.3.1 Validação do método.....	98
6.3.2 Análises das amostras	98
6.4 Conclusões.....	101
6.5 Sugestões	101
Referências	101

RESUMO

Validação de método de análises multiresíduo para determinação de pesticidas em morango (*Fragaria ananassa* Duch) e quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), por técnicas cromatográficas CG- μ ECD e LC-MS/MS

O método de extração QuEChERS, foi ajustado, validado e utilizado para a determinação de doze agrotóxicos organoclorados em 37 amostras de quinoa provenientes da colheita 2010-2011 de Puno - Peru e 36 amostras de morango provenientes de três varejões da cidade de Piracicaba do Estado de São Paulo – Brasil coletadas durante o período de outubro de 2010 até setembro de 2011, usou-se um sistema cromatográfico a gás acoplado a um detector de captura de elétrons μ ECD. Por outro lado para a determinação de 36 agrotóxicos nas amostras morango e 42 agrotóxicos em quinoa, o QuEChERS foi ajustado e validado para seu uso com um sistema cromatográfico líquido acoplado a espectrometria de massas LC-MS/MS; para o processo de validação usou-se amostras de quinoa e morango sem resíduos de agrotóxicos, os quais foram usados como branco de matriz. Os métodos mostraram linearidade de $r^2 \geq 0,99$; LQs na ordem de $0,001 \text{ mg kg}^{-1}$, foram realizados testes de recuperações considerando os LQs e dez vezes estes, sendo que as recuperações foram entre 70% e 120% na maioria das concentrações. Com o intuito de avaliar o efeito do tamanho de partículas de quinoa no processo de validação do método QuEChERS para a determinação de sete agrotóxicos com uso de CG- μ ECD, foram realizados três tipos de moagem usando processador de alimentos e um sistema de moagem criogênico, observou-se uma maior uniformidade das partículas e um incremento do efeito matriz nas amostras tratadas com sistema criogênico. Das 37 amostras de quinoa analisada uma amostra (Cabanillas) proveniente do sistema de produção orgânico (Salcedo INIA) mostrou contaminação por quatro agrotóxicos (OP DDE com $0,015 \text{ mg kg}^{-1}$, PP DDE $0,032 \text{ mg kg}^{-1}$, PP DDD $0,089 \text{ mg kg}^{-1}$ e endosulfan sulfato com $0,034 \text{ mg kg}^{-1}$) e das 36 amostras de morango seis apresentam contaminação por endosulfan sulfato nas concentrações de $0,003$ a $0,020 \text{ mg kg}^{-1}$ e uma amostra coletada no dia 15/04/2011 apresentou $0,011 \text{ mg kg}^{-1}$ de procloraz, compostos que não são permitidos para serem usados em morango. Conclui-se que o método QuEChERS usado com o sistema CG- μ ECD e LC-MS/MS é uma alternativa viável para a determinação de agrotóxicos em morango e quinoa.

Palavras-chave: Frutas; Grãos andinos; Contaminação; Agrotóxicos; Cromatografia

ABSTRACT

Validation of multiresidue analysis method for determination of pesticides in strawberry (*Fragaria ananassa*) and quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), by chromatographic techniques GC- μ ECD and LC-MS/MS.

The QuEChERS extraction method has been adjusted, validated and used for determination of twelve organochlorine pesticides on 37 quinoa samples from the harvested 2010-2011 from Puno – Perú and 36 strawberries samples from three markets from Piracicaba city in Sao Paulo State-Brazil collected during the period from October of 2010 to September of 2011, were used a gas chromatographic system coupled to an electron capture detector μ ECD. On the other hand, for the determination of 36 pesticides in strawberries samples and 42 quinoa samples, The QuEChERS method was adjusted and validated for use with a liquid chromatographic system coupled to mass spectrometer LC-MS/MS; for the validation process a quinoa and strawberries samples without pesticides residues, which were used as a blank. The methods were linear $r^2 \geq 0.99$; LQs in the order of 0.001 mg kg^{-1} , were carried out recoveries considering the LQs and ten times these, and the recoveries were between 70% and 120% in most of the concentrations. In order to evaluated the effect of the particle size of the quinoa on the validation process of the QuEChERS method for determination of seven pesticides using GC- μ ECD, were performed three types of milling using a food processor and cryogenic grinding, there were a greater uniformity of the particles and increase of the matrix effect in the samples treated with cryogenic system. From the 37 quinoa samples analyzed one sample (Cabanillas) coming from organic system production (Salcedo INIA) showed contamination by four pesticides (OP DDE with 0.015 mg kg^{-1} ; PP DDE 0.032 mg kg^{-1} ; PP-DDD 0.089 mg kg^{-1} and endosulfan sulfate with 0.034 mg kg^{-1}) and from the 36 strawberries samples six showed contamination by endosulfan sulfate in the concentrations of 0.003 to 0.020 mg kg^{-1} and one sample collected 15/04/2011 showed 0.011 mg kg^{-1} of prochloraz, compounds that are not permitted to be used in strawberries. We concluded that the QuEChERS method used with a system of GC- μ ECD and LC-MS/MS is a viable alternative to determinate pesticides in strawberries and quinoa.

Keywords: Fruits; Andean grains; Contamination; Pesticides; Chromatography

1 INTRODUÇÃO

A quinoa é uma importante cultura de grão, o qual é cultivado por mais de 5000 anos na região dos Andes da América do Sul, foi importante para os Incas por seu alto valor nutricional (GALWEY et al., 1990; REPO-CARRASCO; ESPINOZA; JACOBSEN, 2003; KUMPUN et al., 2011); o cultivo de quinoa recentemente está sendo introduzido em pequenas escalas em outros países (América do Sul, USA, Dinamarca, etc.); o interesse por esta cultura é devido a sua tolerância a solos pobres e com escassez de água. Por outro lado, a produtividade (0,4 até 2 ton ha⁻¹) é baixa em comparação com o trigo ou milho. Os grãos de quinoa são considerados como um rico alimento, devido ao seu elevado teor protéico e a qualidade destas, possuindo aminoácidos essenciais e ausência de glúten (DINI; TENORE; DINI, 2002, 2005).

O morango no Brasil destaca-se dentro do grupo de frutas de clima temperado, com produção de aproximadamente 105.000 toneladas, distribuídos em quatro mil hectares, sendo que o interesse pelo cultivo do morango é justificado pela alta rentabilidade da cultura, o amplo conhecimento e a aceitação da fruta pelo consumidor e pela diversidade de opções de comercialização e processamento do morango (polpa, sorvetes, geleias, compotas e sucos). O cultivo está concentrado nos Estados de Minas Gerais (41,4%), Rio Grande do Sul (25,6%), São Paulo (15,4%), Paraná (4,7%) e Distrito Federal (4%) (FACHINELLO et al., 2011).

A importância dos Agrotóxicos nos sistemas de produção agrícolas é indiscutível, uma vez que constituem parte dos insumos básicos. Entretanto, é fundamental que eles sejam adequadamente utilizados para que seja preservada a qualidade dos produtos colhidos (AYSAL et al., 2007; LESUEUR et al., 2008; NGUYEN et al., 2008). No Brasil um dos maiores produtores mundiais de alimentos, mais de 90% dos agricultores depende do uso de pesticidas nas lavouras (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2006), nos últimos anos o país lidera a lista de uso de agrotóxicos no mundo, com mais de 673 milhões de toneladas aplicados em 2008 (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL - ANDEF, 2009), Os órgãos governamentais estabeleceram limites máximos de resíduos (LMRs) para proteger o ambiente e a saúde dos consumidores (REGULATION (EC) NO. 396/2005), estas determinações de resíduos são realizadas em laboratórios especializados para este fim, utilizando métodos de

análises validados (EUROPEAN COMMISSION, 2012; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA - INMETRO, 2012).

O processo de validação do método analítico deve demonstrar que o método é adequado para seu propósito. A avaliação deve seguir um plano que inclui o escopo do método, o desempenho do método características e os limites de aceitação. Os parâmetros normalmente analisados no processo de validação são os limites de detecção e quantificação, exatidão, precisão, seletividade, linearidade, intervalo e robustez. Um relatório de validação deve ser gerado com todas as condições experimentais e estatísticas completas. Quando métodos “standard” são usados no laboratório, seu alcance deve ser de acordo com o âmbito dos requisitos do laboratório, método e a adequação do todo o sistema de análise em laboratório o ambiente específico para o método deve ser verificado (AYSAL et al., 2007; EUROPEAN COMMISSION, 2012; INMETRO, 2012).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo ajustar e validar o método de análises multiresíduos QuEChERS para ser usado nas matrizes de morango e quinoa, usando sistemas cromatográficos a gás acoplado a detector de captura de elétrons CG- μ ECD e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas LC-MS/MS.

Referências

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL. **Tecnologia em primeiro lugar: defesa vegetal**. São Paulo, 2009. p. 16-17.

AYSAL, P.; AMBRUS, A.; LEHOTAY, S.J.; CANNAVAN, A. Validation of an efficient method for the determination of pesticides residues in fruits and vegetables using ethyl acetate for extraction. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, New York, v. 42, n. 5, p. 481–490, 2007.

DINI, I.; TENORE, G.C.; DINI, A. Oleanane saponins in “kancolla”, a sweet variety of *Chenopodium quinoa*. **Journal of Natural Products**, Ohio, v. 65, n. 7, p. 1023–1026, 2002.

_____. Nutritional and antinutritional composition of Kancolla seeds: an interesting and underexploited andine food plant. **Food Chemistry**, Barking, v. 92, n. 1, p. 125–132, 2005.

EUROPEAN COMMISSION 2012, **Guidance document on pesticide residue analytical methods**. Madrid, SANCO/12495/2011. p. 1-40

FACHINELLO, J.C.; PASA, M.S. de; SCHMTIZ, J.D.; BETEMPS, D.L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. esp. 1, p. 109-120, 2011.

GALWEY, N.W.; LEAKEY, C.L.A.; PRICE, K.R., FENWICK, G.R. Chemical composition and nutritional characteristics of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*). **Food Sciences and Nutrition**, Basingstoke, v. 42F, n. 4, p. 245–261, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo agropecuário**. 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/de_fau_t.shtm>. Acesso em: 14 jun. 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**: DOQ CGCRE-008 – Revisão 03. 2010. 20 p. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acessado em: 25 jan. 2012.

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

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

REPO-CARRASCO, R.; ESPINOZA, C.; JACOBSEN, S.E. Nutritional value and use of the andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). **Food Reviews International**, Philadelphia, v. 19, n. 1/2, p. 179–189, 2003.

2 ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS EM QUINOA (*Chenopodium quinoa* Willd) USANDO O MÉTODO QuEChERS COM CG- μ ECD

Resumo

O método QuEChERS, foi ajustado e usado para a determinação de resíduos de doze agrotóxicos organoclorados em amostras de quinoa, provenientes da colheita 2010-2011 de Puno - Perú. Foram analisadas 37 amostras provenientes de sistemas de produção: orgânicos, transitório e convencional. O método envolve uma extração com acetato de etila, partição sólida líquido com $MgSO_4$ e CH_3COONa seguido de **clean up** por dSPE com adsorvente PSA. As análises foram realizadas com uso de um equipamento CG- μ ECD utilizando uma coluna HP-5 30 m x 0,32mm x 0,25. O método foi validado usando uma amostra de quinoa sem resíduos de agrotóxicos, usado com branco de matriz, fortificado a 0,01 e 0,1 $mg\ kg^{-1}$, a recuperação média do método variou entre 55,5 a 121,3% com DPR % < 19%. O método mostrou linearidade $r^2 \geq 0,99$; os resultados obtidos indicam que o método é sensível (LQs de 0,001 a 0,01 $mg\ kg^{-1}$). Conclui-se que o método QuEChERS utilizando um sistema CG- μ ECD é uma alternativa para determinar resíduos de agrotóxicos organoclorados em quinoa. Uma amostra (Cabanillas) proveniente do sistema de produção orgânico (Salcedo INIA) mostrou contaminação por quatro agrotóxicos (OP DDE com 0,015 $mg\ kg^{-1}$, PP DDE 0,032 $mg\ kg^{-1}$, PP DDD 0,089 $mg\ kg^{-1}$ e endosulfan sulfato com 0,034 $mg\ kg^{-1}$).

Palavras-chave: Grãos andinos; Multirresíduo; Validação; Cultivo Inca; Agrotóxicos

Abstract

The QuEChERS method was adjusted and used for the determination of twelve organochlorine pesticides residues in Quinoa samples of the harvest 2010-2011 from Puno-Peru. A total of 37 samples, coming from organic, transitional and conventional production systems were analyzed. The method involved extraction with ethyl acetate, solid-liquid partition with $MgSO_4$ and CH_3COONa followed by dSPE cleanup with PSA sorbent. Analyses were carried out with GC- μ ECD equipment. HP-5 30 m x 0.32 mm x 0.25 μm column was used. The method was validated using a quinoa sample without pesticides residues used as a blank, spiked at 0.01 and 0.1 $mg\ kg^{-1}$; the average recovery by the method varied from 55.5 to 121.3 % with RSD% < 19 %. The method showed linearity $r^2 \geq 0.99$ and the LQ ranged from 0.001 to 0.01 $mg\ kg^{-1}$; the results indicated that the method is sensitive (LQs of 0.001 to 0.01 $mg\ kg^{-1}$). We conclude that the method QuEChERS used with a GC- μ ECD system is an alternative for the determination of organochlorine pesticides residues in quinoa. One sample (Cabanillas) coming from the organics production system (Salcedo INIA) showed contamination for four pesticides (OP DDE with 0,015 $mg\ kg^{-1}$, PP DDE 0,032 $mg\ kg^{-1}$, PP DDD 0,089 $mg\ kg^{-1}$ and endosulfan sulfate with 0,034 $mg\ kg^{-1}$).

Keywords: Andean grains; Multi-residue; Validation; Inca's crop; Pesticides

2.1 Introdução

A quinoa é uma importante cultura de grão, o qual é cultivado por mais de 5000 anos na região dos Andes da América do Sul, foi importante para os Incas por seu alto valor nutricional (GALWEY et al., 1990; REPO-CARRASCO; ESPINOZA; JACOBSEN, 2003; KUMPUN et al., 2011); o cultivo de quinoa recentemente está sendo introduzido em pequenas escalas em outros países (América do Sul, USA, Dinamarca, etc.); o interesse por esta cultura é devido a sua tolerância a solos pobres e com escassez de água. Por outro lado, a produtividade (0,4 até 2 ton ha⁻¹) é baixa em comparação com o trigo ou milho. Os grãos de quinoa são considerados como um rico alimento, devido ao seu elevado teor protéico e a qualidade destas, possuindo aminoácidos essenciais e ausência de glúten (DINI; TENORE; DINI, 2002, 2005). No mundo três são os maiores produtores deste grão, o Perú se destaca com a maior quantidade de grãos produzidos (Figuras 2.1 e 2.2) alcançando uma média de 25892,684 toneladas durante o período de 1992-2010 (FAOSTAT, 2012).

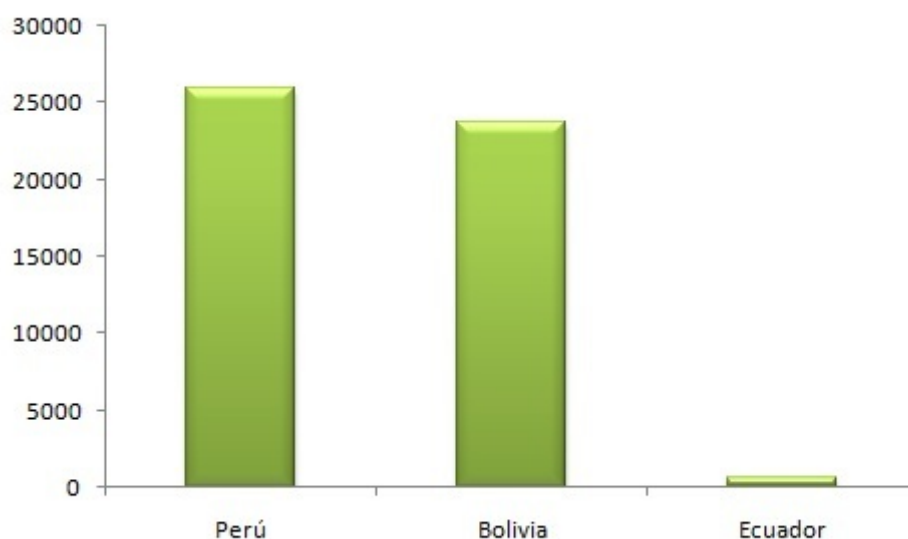


Figura 2.1 - Produção dos principais produtores mundiais de quinoa (média 1992-2010) expressado em toneladas

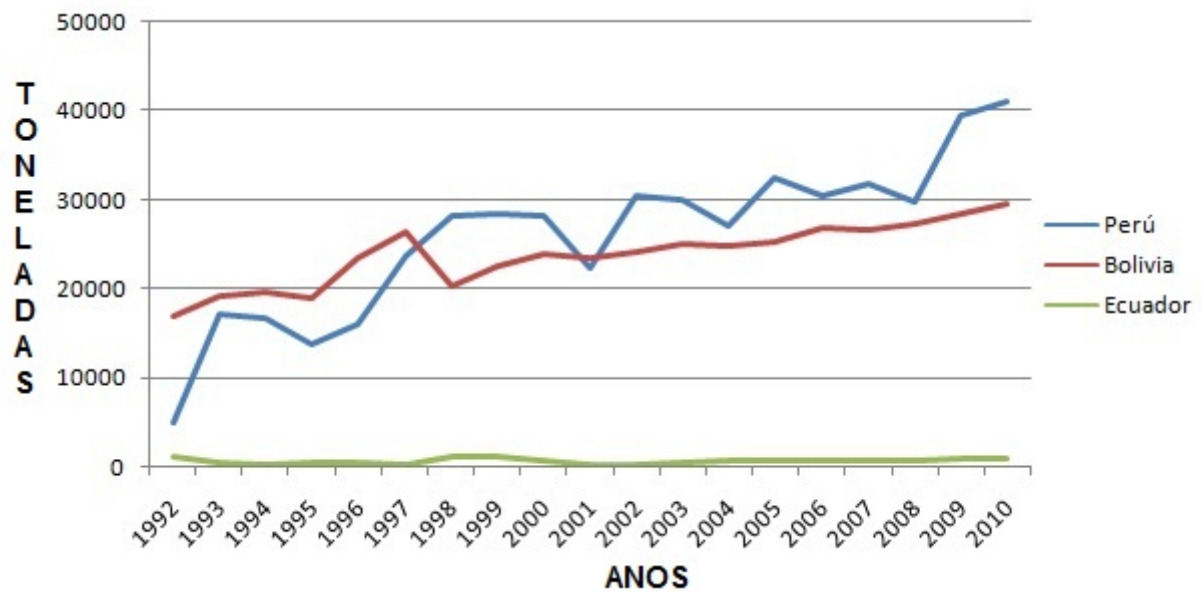


Figura 2.2 - Evolução da produção nos maiores produtores mundiais de quinoa desde o ano (1992-2010)

Centenas de agrotóxicos são utilizadas em práticas agrícolas no mundo, não é raro encontrar resíduos de destes compostos em produtos alimentícios, especialmente em frutas e vegetais. Os órgãos governamentais estabeleceram limites máximos de resíduos (LMRs) para proteger o ambiente e a saúde dos consumidores (REGULATION (EC) NO. 396/2005), a determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentares tornou-se uma exigência devido à toxicidade e estabilidade destes compostos (BRO-RASMUSSEM, 1996), a sua presença nos alimentos é um risco para a saúde humana; por tanto a União Européia desenvolveu uma serie de legislações que regulam a presença de agrotóxicos em alimentos (REGULATION (EC) NO. 396/2005).

Os poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), agrotóxicos (DDT, aldrin, dieldrin, endrin, heptacloro, hexacolorobenzeno (HCB) e toxafeno) são substâncias químicas que persistem no ambiente, acumulando-se em concentrações altas no tecido adiposo e são biomagnificadas na cadeia alimentar. Conseqüentemente eles constituem sérios riscos ao ecossistema, aos invertebrados e à saúde humana (PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE, 2002).

Durante a última década, estudos têm sido realizados no Perú, relacionados ao uso e impacto de agrotóxicos no ambiente e na saúde humana. Em um desses estudos, a Rede de Ação sobre Alternativas ao Uso de Agrotóxicos (RAAA)

concluíram que nos Estados de Huancayo e San Martin, inseticidas e fungicidas são aplicados indiscriminadamente, o que levou ao aparecimento de novas pragas (GOMERO, 2003). Além disso, este estudo conclui que agrotóxicos alta e extremadamente tóxicos, baseados em compostos organofosforados e carbamatos são usados com frequência, causando riscos para a saúde e o ambiente. O estudo também demonstrou que, a maioria dos agricultores não toma medidas de proteção individual por falta de informação.

O método de extração QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) introduzido por Anastassiades et al. (2003); originalmente foi desenvolvido para amostras com mais de 75% de umidade (DIEZ et al., 2006), está sendo aplicado em vários estudos ao redor do mundo para análises de resíduos em diferentes matrizes principalmente usado em sistemas cromatográficos acoplados a espectrometria de massas LC/MS/MS e GC/MS (AYSAL et al., 2007; HÚŠKOVÁ; MATISOVÁ; KIRCHNER, 2008; LEHOTAY, 2007; LEHOTAY et al., 2005b; LEHOTAY; MASTOVSKÁ; YUN, 2005a; LESUEUR et al., 2008; LOOSER et al., 2006; MASTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004; NGUYEN et al., 2007., 2008).

Na literatura científica não existem trabalhos relacionado à avaliação de resíduos de agrotóxicos em quinoa. Assim sendo, o que o objetivo deste trabalho foi ajustar e validar o método QuEChERS para a determinação de 12 agrotóxicos organoclorados usando CG- μ ECD em 37 amostras de quinoa provenientes de Puno-Perú.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Reagentes e materiais

Padrões analíticos de (α - BHC, β - BHC, heptacloro, dicofol, endosulfan lacton, OP' DDD, α - endosulfan, OP' DDE, PP' DDE, β - endosulfan, PP' DDD, endosulfan sulfato), com mais de 98,9% de pureza foram obtidos de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) e ChemService (West Chester, PA, USA). Foram preparadas soluções estoque individuais em uma concentração de (1 mg mL^{-1}) em tolueno grau HPLC e armazenadas a -18°C . As soluções de trabalho na diluição apropriada foram preparadas imediatamente antes do seu uso. Usou-se acetato de etila e tolueno de grau HPLC (J. T. Baker), ácido acético P.A, CH_3COONa e MgSO_4 anidro (J.T Baker) e PSA (Varian). Uma amostra de quinoa sem resíduos de agrotóxicos obtida no

Brasil foi utilizada como branco da matriz para o processo de validação do método. Foram analisadas 37 amostras de quinoa, provenientes de oito distritos agrícolas de Puno-Perú. As amostras analisadas foram colhidas na safra 2010-2011 (Tabela 2.1); três variedades e oito ecotipos deste grão andino foram coletadas no processo de amostragem (Tabela 2.2). Usou-se uma amostragem não-probabilística, tomando em consideração a importância da zona de produção; para o qual foi coletado cinco amostras de um quilograma, estas foram homogenizadas, e uma amostra contendo um quilograma foi separada para moagem, a amostra foi processada em processador de alimentos, separada uma sub amostra de 200 g que foi destinada para análise.

Tabela 2.1 - Origem das amostras de quinoa e a sua respectiva quantidade de cada sistema de produção

Distritos	Sistema de produção			Total Amostra (200g)
	Orgânico	Transitório	Convencional	
Cabanilla	5	1	2	8
Cabanillas	3	1	--	4
Cabana	8	1	--	9
Mañazo	3	1	--	4
Vilque	6	--	--	6
Achaya	--	--	1	1
Juli	--	--	3	3
Puno	--	--	2	2
Total	25	4	8	37

Tabela 2.2 - Número de amostras por variedades e ecotipos de cada distrito

Características	Distritos	Total
Variedades	Salcedo INIA	17
	Pasankalla	4
	Rosada Taraco	6
Ecotipos	Misa quinua	1
	Negra Collana	1
	Chullpi anaranjado	1
	Cuchiwila	3
	Blanca de Juli	2
	Yurac quinua	1
	Amarga amarilla	1

2.2.2 Equipamento

Um sistema cromatográfico de fase gasosa (Agilent, modelo 7890A), equipado com um micro detector de captura de elétrons (μ ECD) e coluna capilar Agilent HP (30 m x 320 μ m x 0.25 μ m) foi utilizado para a separação, detecção e quantificação dos agrotóxicos. O software ChemStation B.04.02 foi utilizado para o controle do instrumento e aquisição de dados. As condições de operação do sistema CG- μ ECD foram: forno com temperatura inicial de 150°C rampa de 210°C a 20°C min^{-1} mantido por 3 min; 210°C rampa de 230°C a 15 °C min^{-1} mantido por 5 min e 230°C rampa de 280°C a 20°C min^{-1} , gás de arraste (N_2) com um fluxo constante de 1 mL min^{-1} ; temperatura do detector 300°C, gás make-up (N_2) de 39 mL min^{-1} . Tempo total da corrida analítica foi de 15 min; a quantificação dos analitos foi realizada com curvas de calibração feitas no extrato da matriz.

2.2.3 Preparo da amostra

Foi utilizado acetato de etila como solvente para a extração com MgSO_4 e CH_3COONa anidro, seguido de um **clean up** por dispersão da fase sólida (dSPE) com absorvente PSA; foram pesadas 10 g de amostra de quinoa em um tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL e homogeneizada com 10 mL de água ultra pura; foi adicionado 15 mL de acetato de etila, 6 g de MgSO_4 e 1,5 g de CH_3COONa anidro. A amostra foi agitada manualmente por 1 min, centrifugada a 5000 rpm por 5 min. Para o **clean-up**, uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi tomado e transferido dentro de um tubo de polipropileno contendo 50 mg de PSA e 150 mg de MgSO_4 , agitados manualmente durante 30 segundos e centrifugado a 5000 rpm por 5 min, 500 μ L deste extrato foi colocado em um *vial* de 1,5 mL diluído com 500 μ L de acetato de etila, para depois injetar 1 μ L no sistema CG - μ ECD no modo (*pulsed split less*) para a análise.

2.2.4 Validação do método analítico

A validação do método analítico foi realizada seguindo os seguintes parâmetros: linearidade, limites de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e repetitividade (EUROPEAN COMMISSION, 2012; INMETRO, 2010). A linearidade foi determinada através da construção de curvas analíticas em diferentes

concentrações 0,001; 0,002; 0,005; 0,010; 0,050; 0,075; 0,100; 0,150 e 0,200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dois tipos diferentes de curvas de calibração foram preparados por uma série de diluições da solução estoque, uma em tolueno e outra no extrato da matriz quinoa. Este extrato foi obtido da extração de quinoa seguindo os procedimentos analíticos descritos (item 2.3).

Os estudos de recuperação foram realizados fortificando 10 g de amostra de quinoa homogeneizada, com a solução padrão dos pesticidas em dois níveis de fortificação (correspondentes aos LQs e 10 vezes estes valores). Os valores de recuperação foram estabelecidos para cada agrotóxico, com sete repetições para cada nível de fortificação. Depois da fortificação a amostra foi deixada em repouso por uma hora e extraída de acordo com o procedimento previamente descrito.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Validação

O coeficiente de correlação para todos os compostos estudados foram $r^2 \geq 0,99$. Não foi observado efeito matriz; os tempos de retenção (TR), limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) dos agrotóxicos analisados são mostrados na Tabela 2.3. Em um trabalho realizado por Walorczyk (2008) usando um sistema CG-MS/MS analisou 140 agrotóxicos dentre os quais organoclorados em amostras de cereais com LQs de 0,01 mg kg^{-1} ; por outro lado Kolberg et al. (2011) usando um sistema CG-MS analisou 24 agrotóxicos em grãos de trigo e farinha com LQs na ordem de 0,005 mg kg^{-1} para os compostos organoclorados; ambos trabalhos usaram QuEChERS como método de extração. Os LQs no presente trabalho encontram-se próximos aos logrados por Kolberg et al. (2011) e abaixo em comparação ao logrado por Walorczyk (2008).

Tabela 2.3 - Resultados da recuperação dos agrotóxicos estudados, tempos de retenção (TR), limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) e precisão DPR = Desvio padrão relativo

AGROTÓXICO	TR (min)	LD (mg kg ⁻¹)	LQ (mg kg ⁻¹)	RECUPERAÇÕES % (n=7)				INTERDIA PRECISÃO (n=7)	
				0,01	DPR	0,1	DPR	0,01	DPR
				(mg kg ⁻¹)	%	(mg kg ⁻¹)	%	(mg kg ⁻¹)	%
α – BHC	5,4	0,008	0,008	121,3	10,3	60,4	7,0	73,5	6,0
β – BHC	5,9	0,001	0,001	55,5	12,9	71,2	8,0	75,1	12,8
Heptacloro	7,5	0,007	0,010	103,2	2,6	77,5	13,6	73,5	4,9
Dicofol	8,3	0,001	0,002	104,4	14,8	81,2	14,6	92,5	6,5
endosulfan lacton	9,1	0,052	0,106	96,2	10,3	63,3	8,5	77,0	10,9
OP DDD	9,9	0,007	0,008	118,0	10,4	88,2	11,0	55,6	10,4
α - endosulfan	10,2	0,003	0,003	92,3	11,6	71,0	12,4	70,3	9,4
OP DDE	10,8	0,006	0,006	107,0	14,5	73,6	6,9	82,2	15,4
PP DDE	11,2	0,001	0,001	70,9	10,0	71,4	19,0	73,8	11,7
β - endosulfan	12,2	0,001	0,001	87,8	13,7	42,2	15,9	92,9	8,0
PP DDD	12,5	0,001	0,001	76,7	13,4	70,7	6,2	87,4	7,8
endosulfan sulfato	13,9	0,002	0,003	67,0	14,2	71,1	7,8	89,9	9,0

Os experimentos de recuperações realizados nas concentrações de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$ obteve-se recuperações na ordem de 70 e 120% para a maioria dos compostos, valores que estão dentro dos parâmetros estabelecidos pela comunidade europeia e o Brasil (EUROPEAN COMMISSION, 2012; INMETRO, 2010), observou-se uma recuperação de 55,5 % na concentração de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ para o composto β - BHC; baixas recuperações podem ser devido ao tipo de pH típico da matriz (ANASTASSIADES et al., 2003; LEHOTAY et al., 2005b, 2007). Recuperações similares para: α - endosulfan, β - endosulfan e endosulfan sulfato foi reportada por Furlani et al. (2011) e Yavuz et al. (2010). Os desvios padrões relativos das recuperações realizadas a zero e sete dias após foram $\leq 19\%$ o qual mostra que o método é preciso e exato (EUROPEAN COMMISSION, 2012; INMETRO, 2010).

A Figura 2.3 mostra um cromatograma do extrato fortificado na matriz quinoa com os doze agrotóxicos, onde há uma separação eficiente para os compostos em estudo. Na Figura 2.2. É apresentado um cromatograma onde não são observados picos no tempo de retenção dos compostos em estudo o qual garante a seletividade do método.

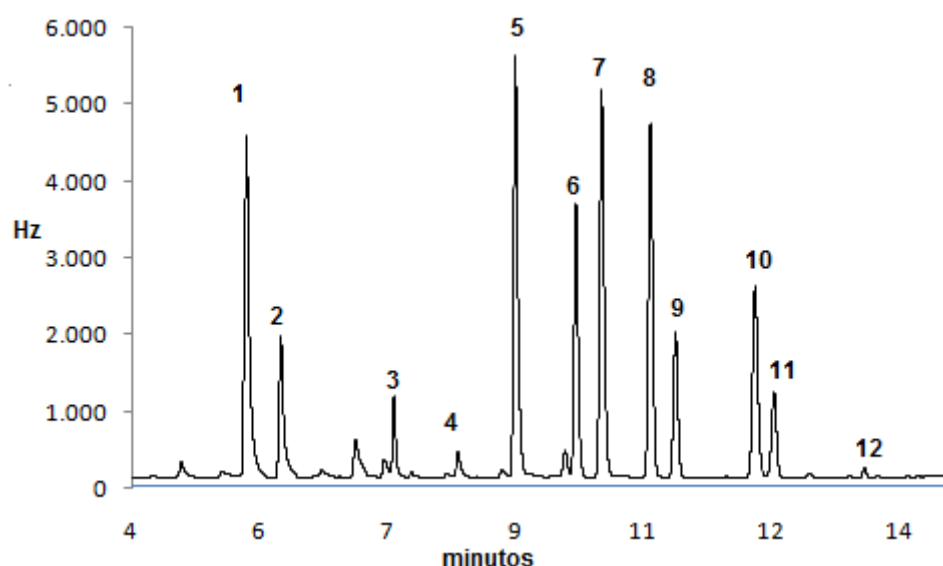


Figura 2.3 - Cromatograma obtido do CG- μ ECD na concentração de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$: (1) α - BHC, (2) β - BHC, (3) heptacloro, (4) Dicofol, (5) endosulfan lacton, (6) OP DDD (7) α - endosulfan, (8) OP DDE, (9) PP DDE, (10) β - endosulfan, (11) PP DDD, (12) endosulfan sulfato

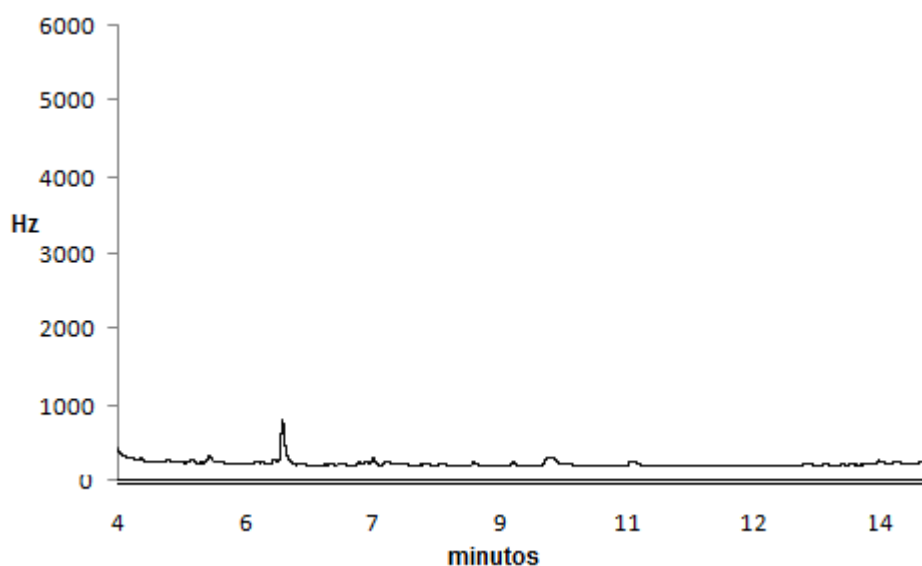


Figura 2.4 - Cromatograma do branco da matriz de quinoa

2.3.2 Análises das amostras

Foram analisadas 37 amostras, das quais 23 mostraram contaminação com um ou mais dos doze agrotóxicos monitorados, sendo que β - BHC foi o agrotóxico mais encontrado (Tabela 2.4). O valor médio encontrado de β - BHC para as 20 amostras foi de $0,014 \text{ mg kg}^{-1}$. Szokolay, Rosival e Madaric (1977) reporta acumulação de BHC em amostras de batata em concentrações 3,5 vezes maiores em comparação aos resíduos encontrados no solo. Há a suspeita que as amostras de quinoa contaminadas com este produto podem ser originárias de áreas com solos contaminados com BHC. Em um trabalho realizado por Xué, Hao e Peng (2007) encontraram resíduos de β - BHC em 18 das 208 mostras de plantas medicinais.

Observou-se contaminação por DDE, PP DDE e PP DDD em uma amostra proveniente de um sistema de produção orgânico, a presença destes compostos pode estar relacionado ao seu uso indiscriminado no passado nesta região (ARICA et al., 2006) e à estabilidade destes compostos (PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE, 2002).

Foram detectados resíduos de dicofol em três amostras de quinoa sendo que duas apresentaram valores maiores ao LMR referencial de $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ (REGULATION (EC) NO. 396/2005). O LMR referencial para endosulfan para quinoa

é $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$, sendo que os resíduos encontrados nas amostras contaminadas por este composto estão abaixo deste valor.

O uso de endosulfan no Perú é proibido (SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGRARIA - SENASA, 2012); o endosulfan sulfato é um metabolito estável (MARTENS, 1976; MILES et al., 1979) por outro lado há estudos que mostram que a meia vida do endosulfan sulfato é estimada em 120 dias até vários meses, (RAO; MURTHY, 1980; AWASTHI et al., 2000), com o que suspeita-se que este produto está sendo utilizado ilegalmente nesta região.

Tabela 2.4 - Procedência, sistema de produção, variedade e resíduos de agrotóxicos nas amostras de quinoa analisadas

DISTRITO	SISTEMA DE PRODUÇÃO	VARIEDADE ECOTIPO	COMPOSTOS (mk kg ⁻¹)					Eendosulfan sulfato
			β BHC	dicofol	OP DDE	PP DDE	PP DDD	
Cabanilla	Transição	Salcedo INIA	0,006	----	----	----	----	----
Cabanilla	Orgânica	Pasankalla	0,023	0,070	----	----	----	0,015
Cabanilla	Orgânica	Salcedo INIA	0,006	----	----	----	----	----
Cabanilla	Convencional	Pasankalla	0,009	0,023	----	----	----	0,004
Cabanilla	Orgânica	Ros Taraco	0,014	----	----	----	----	----
Cabanilla	Convencional	Misa quinua	0,031	----	----	----	----	----
Cabanillas	Orgânica	Ros. Taraco	0,019	----	----	----	0,006	----
Cabanillas	Transição	Salcedo INIA	----	----	----	----	----	0,014
Cabanillas	Orgânica	Salcedo INIA	----	----	0,015	0,032	0,089	0,034
Cabana	Orgânica	Pasankalla	0,008	----	----	----	----	----
Cabana	Orgânica	Ros. Taraco	0,011	----	----	----	----	0,002
Cabana	Orgânica	Salcedo INIA	0,023	----	----	----	----	----
Cabana	Orgânica	Cuchiwila	0,018	0,016	----	----	----	0,008
Cabana	Orgânica	Blanca Juli	0,005	----	----	----	----	----
Mañazo	Orgânica	Salcedo INIA	0,015	----	----	----	----	----
Mañazo	Orgânica	Pasankalla	0,023	----	----	----	----	----
Mañazo	Orgânica	Salcedo INIA	----	----	----	----	----	0,015
Mañazo	Orgânica	Salcedo INIA	0,008	----	----	----	----	----
Vilque	Orgânica	Salcedo INIA	0,006	----	----	----	----	----
Vilque	Orgânica	Salcedo INIA	0,009	----	----	----	----	----
Juli	Convencional	Ros. Taraco	0,016	----	----	----	----	----
Puno	Convencional	Cuchiwila	0,016	----	----	----	----	----
Puno	Convencional	Cuchiwila	0,014	----	----	----	----	----

2.4 Conclusões

Neste trabalho, um método rápido e simples para a identificação de agrotóxicos organoclorados foi otimizado usando um sistema GC- μ ECD, validada por meio de uma abordagem orientada a CG, e usada para análises direto de amostras de quinoa depois de uma seleção de uma melhor condição para este fim. Conclui-se que o método QuEChERS usado com um equipamento GC- μ ECD é uma alternativa para a determinação de agrotóxicos organoclorados em quinoa. Os resultados obtidos indicam que este método é sensível (LQ de 0,001 mg kg⁻¹ foi o valor mais baixo) e não apresenta efeito matriz.

Foi constatada a contaminação de quinoa pelos agrotóxicos β - BHC, dicofol, OP DDE, PP DDE, PP DDD e endosulfan sulfato, sendo que o β - BHC endosulfan sulfato foram os mais encontrados.

2.5 Sugestões

Realizar monitoramentos periódicos de resíduos de agrotóxicos para obter informação da quantidade destes agrotóxicos em grão de quinoa.

Realizar uma avaliação das áreas produtoras de quinoa, relacionado aos resíduos de agrotóxicos organoclorados para poder evitar possíveis contaminações nos grãos.

Referências

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

ARICA, D.; KROSCHE, J.L.; FORBES, G.; SAINT PERE, K. **Persistent organic pollutants and hazardous pesticides in andean farming communities in Peru:** project implemented by The Internacional Potato Center (CIP) Funded by the Canada POPs Fund World Bank, Lima, 2006. Disponível em: <http://www.spipm.cgiar.org/c/document_library/get_file?p_l_id=17828&folderId=18430&name=DLFE-78.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2011.

AYSAL, P.; AMBRUS, A.; LEHOTAY, S.J.; CANNAVAN, A. Validation of an efficient method for the determination of pesticides residues in fruits and vegetables using ethyl acetate for extraction. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, New York, v. 42, n. 5, p. 481–490, 2007.

AWASTHI, N.; AHUJA, R.; KUMAR, A. Factors influencing the degradation of soil applied endosulfan isomers. **Soil Biology & Biochemistry**, Weinheim, v. 32, n. 11/12, p. 1697–1705. 2000.

BRO-RASMUSSEN, F. Contamination by persistent chemicals in food chain and human health. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 188, n. 1, p. 45–60, 1996.

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

DINI, I.; TENORE, G.C.; DINI, A. Oleanane saponins in “kancolla”, a sweet variety of *Chenopodium quinoa*. **Journal of Natural Products**, Ohio, v. 65, n. 7, p. 1023–1026, 2002.

_____. Nutritional and antinutritional composition of Kancolla seeds: An interesting and underexploited andine food plant. **Food Chemistry**, Barking, v. 92, n. 1, p. 125–132, 2005.

EUROPEAN COMMISSION 2012. **Guidance document on pesticide residue analytical methods**. Madrid, SANCO/12495/2011, 2012. p. 1-40

FAO. **FAOSTAT**: statistical databases. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 25 mar. 2012.

FURLANI, R.P.Z.; MARCILIO, K.M.; LEME, F.M.; TFOUNI, S.A.V. Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection. **Food Chemistry**, Barking, v. 126, p. 1283–1287, 2011.

GALWEY, N.W.; LEAKEY, C.L.A.; PRICE, K.R.; FENWICK, G.R. Chemical composition and nutritional characteristics of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*). **Food Sciences and Nutrition**, Basingstoke, v. 42F, n. 4, p. 245–261, 1990.

GOMERO, L. **Diagnostico de plaguicidas y salud en los corredores económicos de Jaen, Tarapoto y Huancayo**: estudio solicitado por CRS/CARITAS. Perú, 2003. 100 p.

HÚŠKOVÁ, R.; MATISOVÁ, E.; KIRCHNER, M. Fast GC–MS pesticide multiresidue analysis of apples. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 68, n.1, p. 49-55, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**: DOQ-CGCRE-008 – Revisão 03. 2010. 20 p. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 25 jan 2012.

- KOLBERG, D.I.; PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC–MS. **Food Chemistry**, Barking, v. 125, p. 1436–1442, 2011.
- KUMPUN, S.; MARIA, A.; CROUZET, S.; EVRARD-TODESCHI, N.; GIRAULT, J.; LAFONT, R. Ecdysteroids from *Chenopodium quinoa Willd.*, an ancient Andean crop of high nutritional value. **Food Chemistry**, Barking, v. 125, n. 4, p. 1226–1234, 2011.
- LEHOTAY, S.J. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 90, n. 2, p. 485–520, 2007.
- LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKÁ, K.; YUN, S.J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 88, n. 2, p. 630–638, 2005a.
- LEHOTAY, S.J.; KOK, A. de; HIEMSTRA, M.; VAN BODEGRAVEN, P. Validation of a fast and easy method for the determination of 229 pesticide residues in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 88, n. 2, p. 595–614, 2005b.
- LESUEUR, C.; KNITTL, P.; GARTNER, M.; MENTLER, A.; FUERHACKER, M. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. **Food Control**, Surrey, v. 19, n. 9, p. 906–914, 2008.
- LOOSER, N.; KOSTELAC, D.; SCHERBAUM, E.; ANASTASSIADES, M.; ZIPPER, H. Pesticide residues in strawberries sampled from the market of the Federal State of Baden-Württemberg in the period between 2002 and 2005. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherh**, Birkhäuser, v. 1, n. 2, p. 135–141, 2006.
- MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1040, n. 2, p. 259–272, 2004.
- MARTENS, R. Degradation of (8–9 14C) endosulfan by soil microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 31, n. 6, p. 853–858, 1976.
- MILES, J.R.W.; MOY, P. Degradation of endosulfan and its metabolites by a mixed culture of soil microorganisms. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 23, n. 1, p. 13–19, 1979.

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

NGUYEN, T.D.; LEE, B.S.; LEE, B.R.; LEE, D.M.; LEE, G.H. A multiresidue method for the determination of 109 pesticides in rice using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) sample preparation method and gas chromatography/mass spectrometry with temperature control and vacuum concentration. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 21, n. 18, p. 3115–3122, 2007.

PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE.

Evaluación regional sobre sustancias tóxicas persistentes: informe regional de Sudamérica oriental y occidental. Ginebra Suiza, 2002.79 p,

RAO, D.M.R.; MURTHY, A.S. Persistence of endosulfan in soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.28, n.6, p. 1099–1101, 1980.

REGULATION (EC) NO. 396/2005 of The European Parliament and of The Council of 23 February 2005 on Maximum Residue Levels of Pesticides in or on Food and Feed of Plant and Animal Origin and Amending Council Directive 91/414/EEC, Off. J. Eur. Communities L70/1, 16.3.2005. Disponível em: <http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm>. Acesso em: 29 out. 2011.

REPO-CARRASCO, R.; ESPINOZA, C.; JACOBSEN, S.E. Nutritional value and use of the andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). **Food Reviews International**, Philadelphia, v. 19, n. 1/2, p. 179–189, 2003.

SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGRARIA. **Plaguicidas restringidos y prohibidos en el Perú**. Disponível em:

<http://www.senasa.gob.pe/0/modulos/JER/JER_Interna.aspx?ARE=0&PFL=3&JER=193>. Acesso em: 20 maio 012.

SZOKOLAY, A.; ROSIVAL, J.U.; MADARIC, A. Dynamics of benzene hexachloride (BHC) isomers and other chlorinated pesticides in the food chain and in human fat. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 1, n. 3, p. 349-359, 1977.

UNITED STATES. Department of Agriculture. **Foreign agricultural service**: maximum residue limit database. Disponível em: <www.fas.usda.gov/http/MRL.asp>. Acesso em: 24 out. 2011.

WALORCZYK, S. Development of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry II. Improvement and extension to new analytes. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1208, n. 1/2, p. 202–214, 2008.

XUE, J.; HAO, L.; PENG, F. Residues of 18 organochlorine pesticides in 30 traditional Chinese medicines. **Chemosphere**, Oxford, v. 71, n. 6, p. 1051-1055, 2007.

YAVUZ, H.; GULER, G.O.; AKTUMSEK, A.; CAKMAK, Y.S.; OZPARLAK, H. Determination of some organochlorine pesticide residues in honeys from Konya, Turkey. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 168, n. 1/4, p. 277–283, 2010.

3 EFEITO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS DE AMOSTRAS DE QUINOA (*Chenopodium quinoa* Willd) NO PROCESSO DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE SETE AGROTÓXICOS COM USO DE CG- μ ECD

Resumo

O tamanho das partículas no processo de preparo de amostras melhora a uniformidade e a representatividade das mesmas, possibilitando resultados mais exatos nas análises. Contudo, foram testados, neste trabalho, os efeitos de três tipos de moagens (M1, M2 e M3) no preparo de amostras de grão de quinoa, no processo de validação do método QuEChERS para sete agrotóxicos (clorotalonil, heptacloro, captan, α -endosulfan, dieldrin, β -endosulfam e endosulfan sulfato) utilizando um CG- μ ECD. O método alcançou uma boa separação cromatográfica para os sete compostos em uma corrida cromatográfica de 17 minutos. O método QuEChERS foi ajustado trocando o tipo de solvente usado para o processo de extração por uma mistura de acetato de etila e 1% ácido acético glacial. De acordo com os resultados observados, conclui-se que a sensibilidade do método QuEChERS foi influenciada pelo tamanho das partículas, mostrando um incremento do efeito matriz para quatro dos sete compostos estudados e o tamanho da partícula moído ao tamanho de 10 μ m por dois métodos utilizando moagem criogênica, melhorou as porcentagens de recuperações do método.

Palavras-chave: Grão andino; Pesticidas; Cromatografia a gás; Efeito matriz

Abstract

The size of the particles in the sample preparation process improves the uniformity and representatives of the same, enabling more accurate results in the analysis. However, they were tested in this work, the effects of three types of mills (M1, M2 and M3) in the preparation of samples of quinoa grain in the method validation process of QuEChERS were tested for seven pesticides (chlorothalonil, heptachlor, captan, α -endosulfan, dieldrin, β -endosulfan and endosulfan sulfate), using an GC- μ ECD. The method tested achieved a good chromatographic separation for the seven compounds in one chromatographic run of 17 minutes. The QuEChERS method was adjusted by changing type of solvent used for extraction process of a mixture of ethyl acetate and 1% of glacial acetic acid. According to the results observed, we concluded that the sensitivity of QuEChERS was influenced by particle size, showing an increase of matrix effect for four of the seven compounds studied and the size of the particle size of 10 μ m to the ground by two methods using cryogenic grinding improved the percentage of recoveries of the method.

Keywords: Andean grain; Pesticides; Gas chromatography; Matrix effect

3.1 Introdução

Um dos pontos críticos nas análises de compostos químicos em baixas concentrações, além do tipo de ferramenta analítica a ser usada, é a etapa de preparo das amostras. Os métodos de análise requerem pequenas quantidades dessas amostras, geralmente entre 10 a 500 µg. No entanto, é fundamental que o material moído apresente distribuição homogênea de tamanho das partículas (EBDON; FOULKES; SUTTON, 1997). A homogeneização é um importante processo na etapa de preparo da amostra para análise direta de sólidos e é facilmente alcançada por procedimentos de moagem. Em geral, quanto mais estreita a faixa de distribuição do tamanho de partícula e menor o seu diâmetro ($< 10 \mu\text{m}$), melhor será a homogeneidade da amostra e maior a superfície de contato dela (BRO-RASMUSSEN, 1996). A moagem é necessária, pois as amostras finamente moídas são mais homogêneas, podendo ser subdivididas mantendo-se a representatividade, se suas alíquotas forem cuidadosamente homogeneizadas (KRUG, 2008).

A escolha do sistema de moagem a ser empregado pode variar dependendo das propriedades da amostra, tais como a dureza, conteúdo de fibras e gorduras. A moagem criogênica, introduzida por Lyengar e Kasperek em 1977, tem como princípio fundamental o aumento da dureza do material e inserção de falhas na estrutura cristalina, que facilitam o processo de trituração (KOGLIN; BACKHAUS; SCHLADOT, 1997; LYENGAR; KASPEREK, 1977). Desde a sua proposição, a moagem criogênica tem sido intensamente empregada em diferentes tipos de amostras (NOMURA et al., 2005; SANTOS et al., 2003). A moagem criogênica é uma técnica que utiliza nitrogênio líquido para congelar as amostras antes da moagem, tornando-as quebradiças e, dessa forma, reduzindo a energia requerida nos moinhos mecânicos ou o esforço do analista para moagem em almofariz, esta técnica serve para evitar a degradação do analito de interesse devido ao incremento da temperatura durante a moagem. Com a otimização da metodologia, pode-se obter um número maior de amostras processadas e partículas mais homogêneas (SANTOS et al., 2003).

Resíduos em agrotóxicos ocorrem em produtos alimentícios, especialmente em frutas e vegetais. Autoridades estabeleceram controles para Limites Máximos Residuais (LMRs) ou tolerância para proteger o ambiente e principalmente à saúde

dos consumidores (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA REGULATION EC/396/2005), a determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentares está sendo necessária devido à toxicidade e estabilidade desses xenobióticos (BRO-RASMUSSEN, 1996). Para tanto, a União Europeia desenvolveu uma série de legislações que regulamentam a presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2011). Atualmente mais de 1100 substâncias são registradas como agrotóxicos (SANTOS et al., 2003), as quais são definidas pela United States Federal Insecticide Fungicides Rodenticides Act (FIFRA) como “qualquer substância ou mistura de substância, naturais ou sintéticas, formulada para controlar ou repelir qualquer peste, sendo pestes definidas como, organismos que possam ser prejudiciais para o homem ou o ambiente, incluindo outros vertebrados não humanos, invertebrados, plantas, fungos e microorganismos”.

Devido a esta necessidade de analisar agrotóxicos em alimentos que houve a necessidade de analisar os compostos presentes na quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) (Figuras 3.2 e 3.1). A quinoa é um grão cultivado há mais de 5000 anos na região dos Andes, e tem sido importante na alimentação dos povos Incas devido a seu alto valor nutricional (GALWAY et al., 1990; KUMPUN et al., 2011). O seu cultivo vem sendo introduzido em pequenas escalas em outros países da América do Sul, Estados Unidos da América, Dinamarca, dentre outros. O interesse nessa cultura é devido ao fato de se desenvolver em solos mais pobres em nutrientes e com pouca disponibilidade de água. Por outro lado, seu rendimento é baixo quando comparado ao trigo ou ao milho, variando entre 0,42 até 2,00 t/ha. Os grãos de quinoa são considerados como um rico alimento, devido ao seu elevado teor protéico e a qualidade destas, possuindo aminoácidos essenciais e ausência de glúten (DINI; TENORE; DINI, 2002, 2005). O Peru é o maior produtor de quinoa no mundo (FAO, 2012).

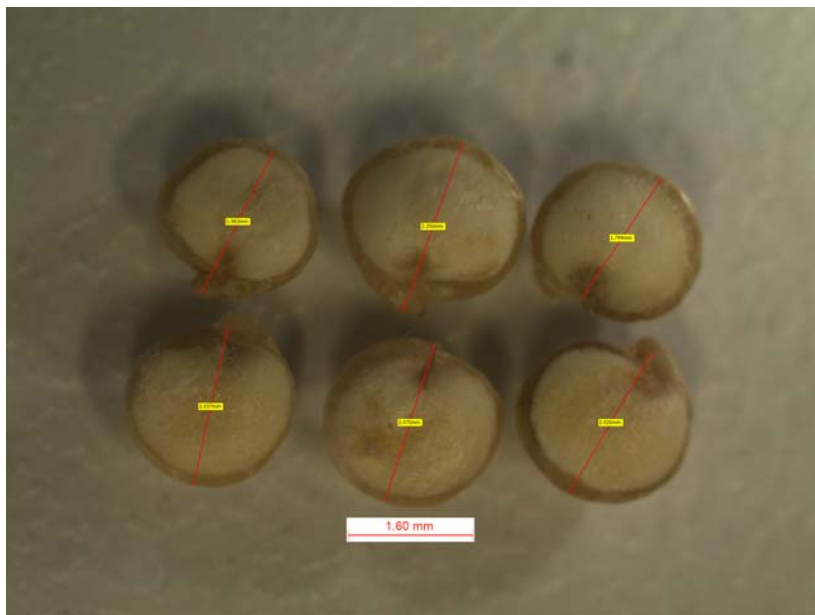


Figura 3.1 - Grãos de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd)

Para analisar agrotóxicos em amostras de quinoa, utilizou-se o método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe). Desde seu desenvolvimento, o método QuEChERS revolucionou a forma de análises de agrotóxicos multiresíduos (LEHOTAY; MAJORS; ANASTASSIADES, 2010; LEHOTAY; MASTOVSKA; LIGHTFIELD, 2005). Este método tornou-se rapidamente o mais utilizado por laboratórios para a análise de resíduos de agrotóxicos e foi recentemente, estabelecido como método multiresíduos oficial na Europa (European Norm EN 15662: 2009-02: Foods of plant origin determination of pesticide residues using GC-MS or LC-MS/MS following acetonitrile extraction partition and cleanup by dispersive SPE - QuEChERS-method).

Este método pode ser utilizado com análises simultâneas por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM). Comparado aos métodos tradicionais de análise, o método QuEChERS possui várias vantagens, como boas recuperações (>85%) e resultados com boa exatidão (verdadeiros e precisos). Além disso, o método é totalmente robusto, pois o “clean up” do extrato é feito para remover ácidos orgânicos, o custo dos reagentes são baixos e são necessários poucos dispositivos no preparo de amostras (LEHOTAY; MASTOVSKA; LIGHTFIELD, 2005).

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica que, por mais de meio século, vem sendo utilizada intensamente em muitas áreas da ciência. Esta técnica de separação e análise é muito utilizada devido à sua capacidade de determinar a quantidade de componentes e a proporção de cada um deles em um extrato de amostra, possuir a capacidade de determinar a natureza e a estrutura química destes compostos separados e quantificados. Todos estes aspectos dependem do uso de detectores espectroscópicos, tais como o espectrômetro de massas (BAKER, 2010; GROB, 1999). A espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa é considerada como uma boa base técnica para oferecer melhor resolução cromatográfica.

Contudo, o principal fator limitante do método QuEChERS é o fato de ter sido desenvolvido para ser utilizado com detectores de massa, sendo poucos os trabalhos com o uso de cromatografia gasosa acoplada a detector de captura de elétrons CG- μ ECD.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tamanho das partículas em amostras de grãos de quinoa, submetidos a diferentes tipos de moagens com processador de alimentos normal e duas sequências de moagem criogênica, no processo de validação do método QuEChERS para determinação de sete agrotóxicos (clorotalonil, heptacloro, captan, α -endosulfam, dieldrin, β -endosulfam e sulfato- endosulfam) com o uso de CG- μ ECD.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Reagentes e materiais químicos

Os padrões analíticos dos agrotóxicos clorotalonil, heptacloro, captan, α -endosulfam, dieldrin, β -endosulfam e endosulfam sulfato foram obtidos da ChemService (West Chester, PA, USA), com $\geq 98,9\%$ de pureza. A solução de mistura dos pesticidas foi preparada em tolueno grau HPLC e armazenada sob temperatura de -18°C . A solução de trabalho foi preparada diariamente.

Os reagentes utilizados no experimento foram acetato de etila grau HPLC (MTedia, EUA), tolueno grau HPLC (MTedia, EUA), ácido acético grau P.A., acetato de sódio anidro e sulfato de magnésio anidro (J.T. Baker) e PSA (Varian).

As amostras de quinoa foram adquiridas no Brasil, advindas da empresa Vitalin Produtos Naturais, e foram utilizadas como branco para o processo de validação do método analítico.

3.2.2 Equipamento

Para a identificação e quantificação dos agrotóxicos avaliados foi utilizado um sistema cromatográfico a gás (Agilent, modelo 7890A) acoplado ao detector de captura de elétrons (μ ECD), constituído de coluna Agilent HP (30m x 320 μ m x 0,25 μ m) e, para a aquisição e integração dos dados foi utilizada uma workstation (Agilent Technologies ChemStation, versão B.04.02) e o processamento estatístico dos mesmos foi realizado por meio do Microsoft Excel 2007. A programação da rampa de temperatura do forno foi de 180°C a 230°C (10°C/min) mantido durante 5 min, depois foi aquecido até 280°C a 20°C por minuto, mantendo por 5 min, totalizando 17,5 minutos o tempo da corrida cromatográfica, com 40 mL/min de fluxo de gás, o sistema de injeção foi o “pulsed splitless” a 300°C com fluxo do gás de 59 mL/min.

3.2.3 Preparo de amostras

As amostras de quinoa foram submetidas a três processos de moagem, sendo que para o primeiro sistema de moagem (M1) foi realizado utilizando um processador para alimentos simples, marca Oster e potência de 600 W. O segundo (M2) e o terceiro (M3) sistemas de moagens foram realizados com moinho criogênico SPEX modelo 6800 com nitrogênio líquido sendo que para M2 a programação foi de 5 minutos de pré-congelamento, duas moagens de 2 minutos cada, e 1 minuto de congelamento entre cada moagem (Figura 3.2); M3 teve duração de 5 minutos de pré-congelamento, 15 moagens de 2 minutos cada, e 1 minuto de congelamento entre cada moagem (Figura 3.3).

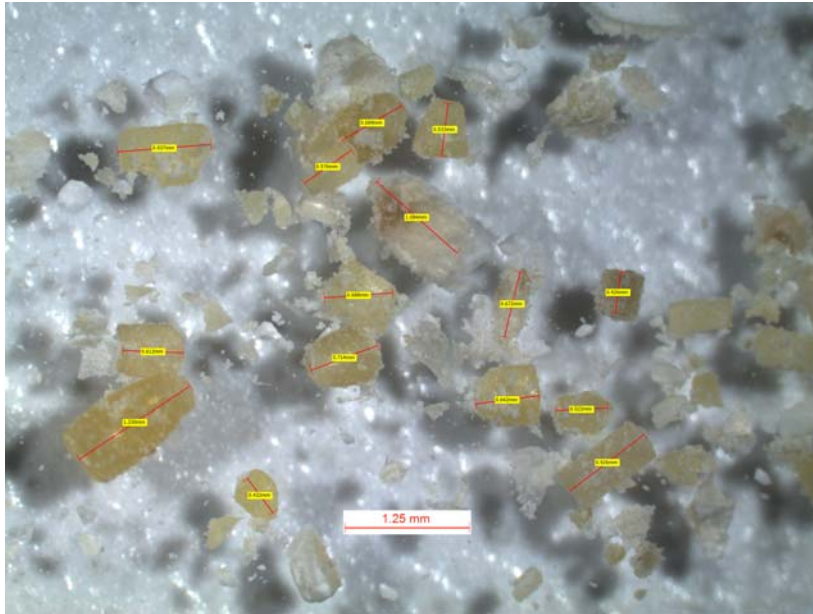


Figura 3.2 - Tamanho de partícula após moagem com processador de alimento simples, marca Oster e potência de 600W (M1)

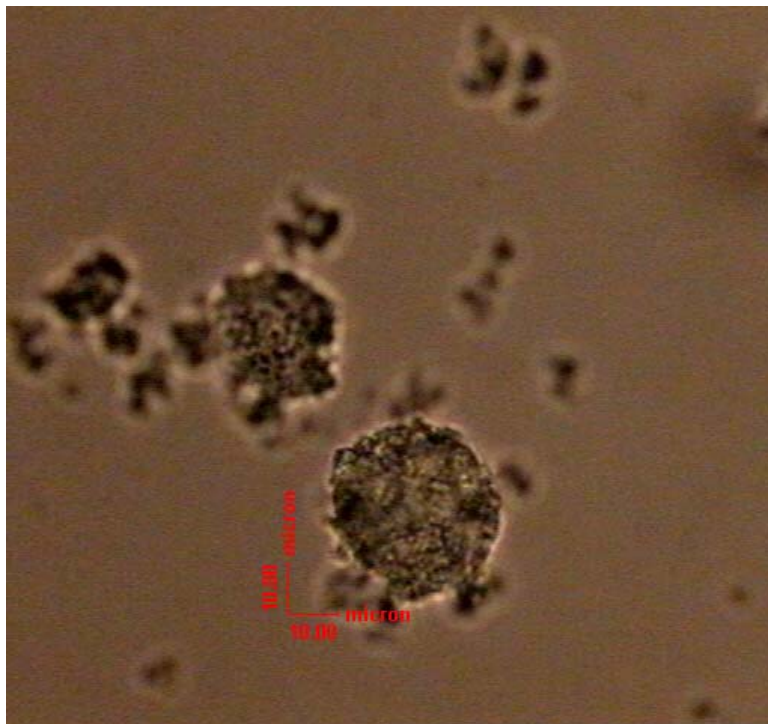


Figura 3.3 - Tamanho de partícula de amostra processada com o primeiro ciclo de moagem criogênica (M2)

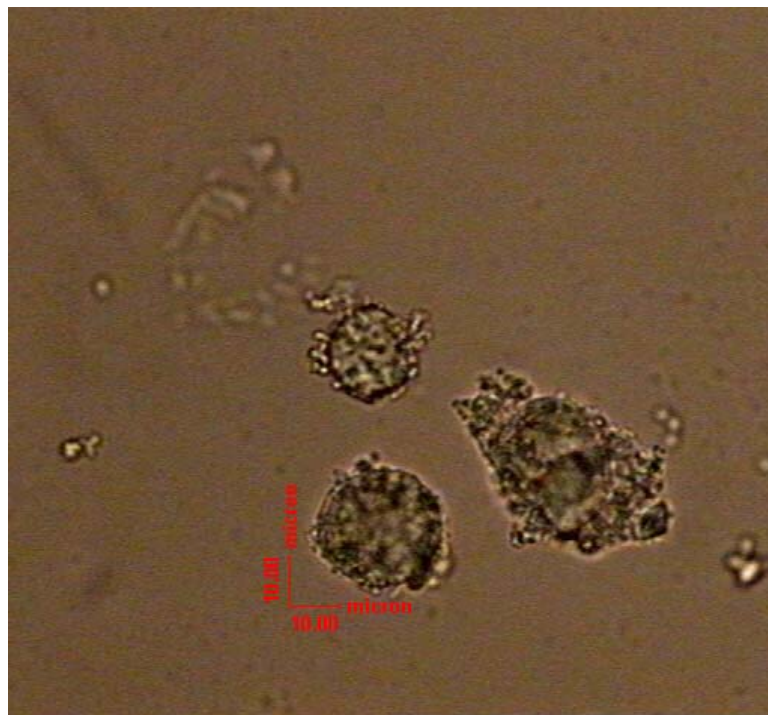


Figura 3.4 - Tamanho de partícula de amostra processada com o segundo ciclo de moagem criogênica (M3)

Os estudos de recuperação foram realizados fortificando 5 g de amostra de quinoa homogeneizada, com a solução padrão dos pesticidas em dois níveis de fortificação (correspondentes aos LQs e 10 vezes estes valores). Os valores de recuperação foram estabelecidos para cada agrotóxico, com sete repetições para cada nível de fortificação. Depois da fortificação a amostra foi deixada em repouso por uma hora e extraída de acordo com o procedimento previamente descrito.

Para a extração dos pesticidas foi realizada uma adaptação do método QuEChERS (ANASTASSIADES et al., 2003), foram pesadas 5 g da amostra de quinoa previamente moída, a qual foi colocada em um tubo de polipropileno com base cônica de 50 mL com tampa, contendo 6 g de $MgSO_4$ e 1,5 g de CH_3COONa . Adicionou-se 10 mL de água ultrapura e 15 mL de acetato de etila com 1% de ácido acético (solução extratora). Agitou-se manualmente por 1 minuto e centrifugada por 5 minutos a 5000 rpm. Para o processo de *clean-up*, uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi transferido dentro de um tubo de polipropileno de 2 mL, contendo 50 mg de PSA e 150 mg de $MgSO_4$. Agitou-se manualmente por 30 segundos e centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm, 500 μ L deste extrato foi colocado em um vial

de 1,5 mL diluído com 500 μ L de acetato de etila, para depois injetar 1 μ L no sistema CG - μ ECD no modo (*pulsed split less*) para a análise.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Validação do método analítico

O processo de validação do método analítico do presente trabalho foi realizado segundo as orientações do INMETRO (DOQ-CGCRE – 008, 2010). Como branco foi utilizado uma amostra de quinoa livre de agrotóxicos. Sendo realizadas curvas no extrato da matriz e no solvente (Figuras 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10 e 3.11), com sete concentrações e três repetições cada. As recuperações e DPR (desvio padrão relativo) foram determinadas para todos os compostos (clorotalonil, heptacloro, captan, α endossulfan, β endossulfan, dieldrin e endossulfan sulfato), em três níveis de fortificação, a 0,08; 0,20 e 0,40 mg kg^{-1} e com três repetições cada nível.

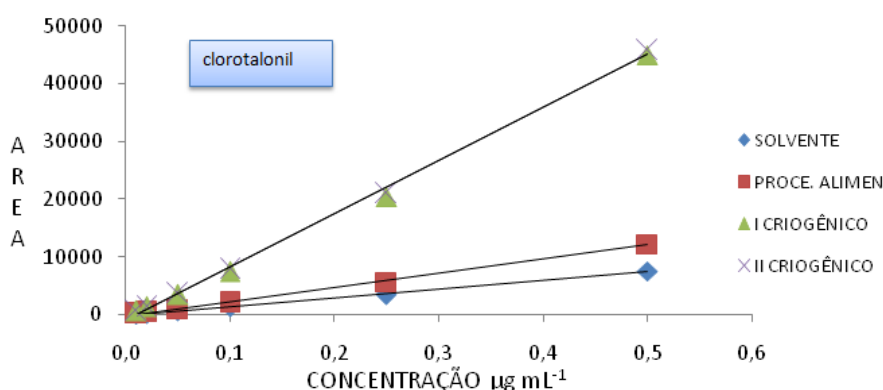


Figura 3.5 - Curvas analíticas para o composto clorotalonil entre cada tratamento. Área de resposta versus concentração do analito

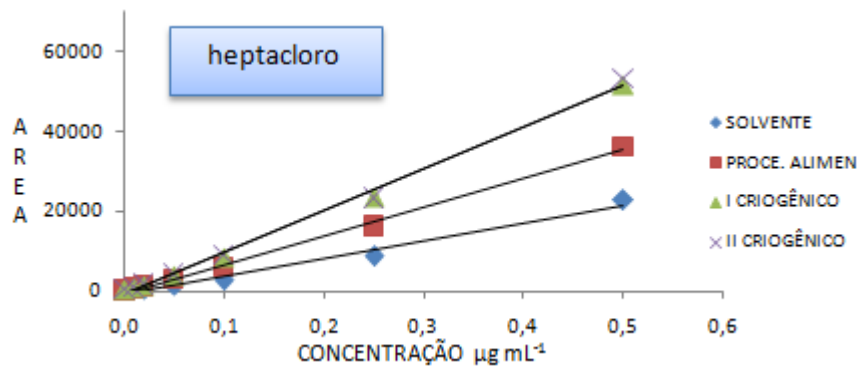


Figura 3.6 - Curvas analíticas para o composto heptacloro entre cada tratamento. Área de resposta versus concentração do analito

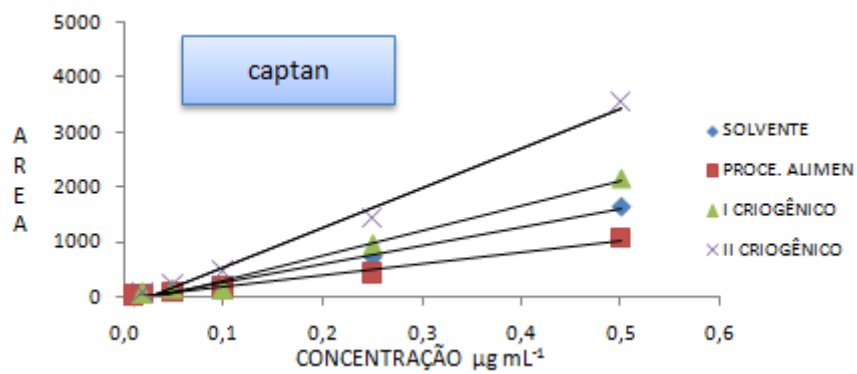


Figura 3.7 - Curvas analíticas para o composto captan entre cada tratamento. Área de resposta versus concentração do analito

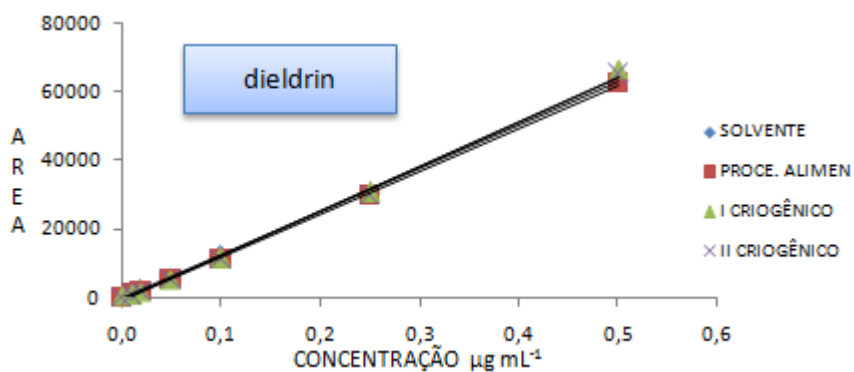


Figura 3.8 - Curvas analíticas para o composto dieldrin entre cada tratamento. Área de resposta versus concentração do analito

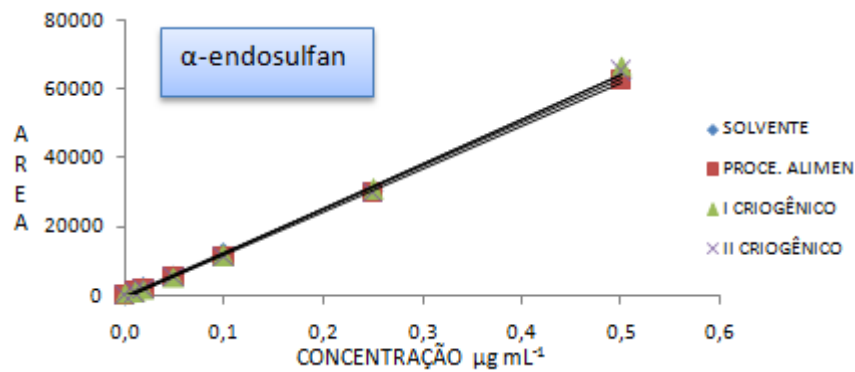


Figura 3.9 - Curvas analíticas para o composto α -endosulfan entre cada tratamento. Área de resposta versus concentração do analito

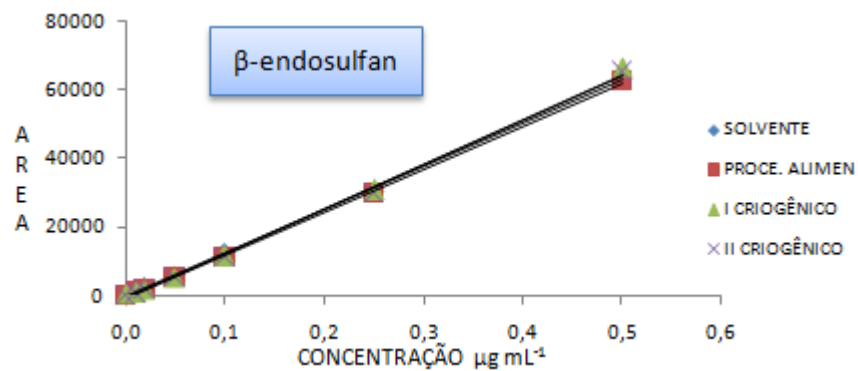


Figura 3.10 - Curvas analíticas para o composto β -endosulfan entre cada tratamento. Área de resposta versus concentração do analito

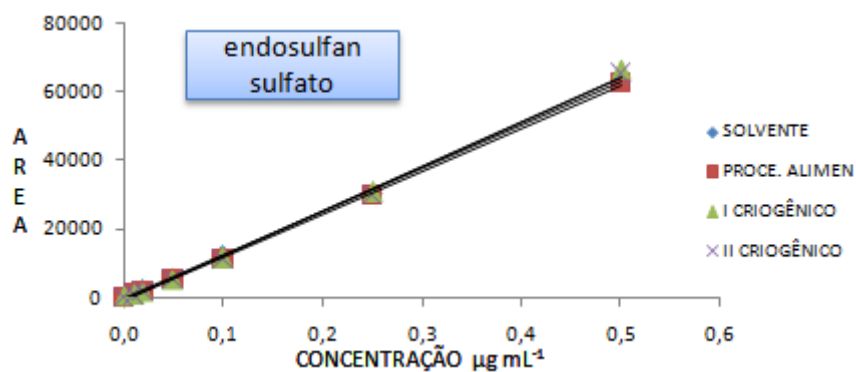


Figura 3.11 - Curvas analíticas para o composto endosulfan sulfato entre cada tratamento. Área de resposta versus concentração do analito

3.3.2 Seletividade dos agrotóxicos no CG- μ ECD

A determinação dos tempos de retenção de cada composto no sistema cromatográfico foi realizada injetando os padrões individualmente. Com a finalidade de avaliar a separação cromatográfica dos agrotóxicos em estudo, foi preparada uma solução padrão mix na concentração de $0,2 \mu\text{ mL}^{-1}$, da qual se obteve uma boa separação cromatográfica dos sete compostos, assim como mostrado na Figura 3.12.

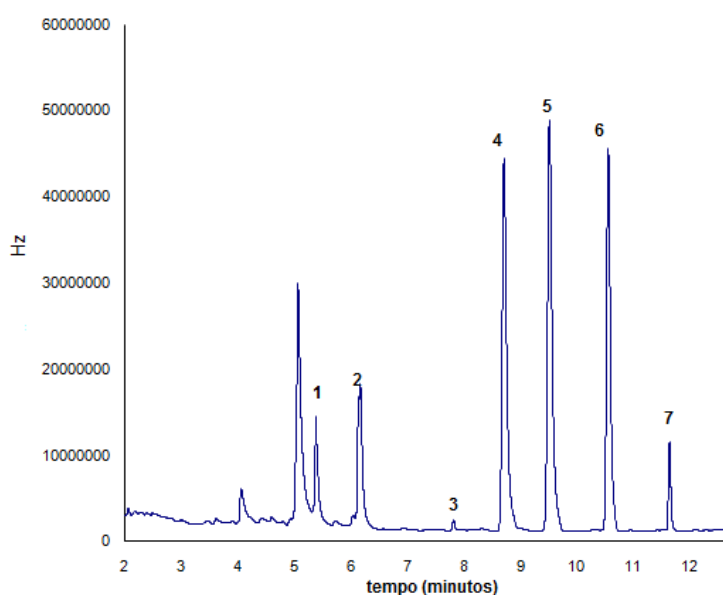


Figura 3.12 - Cromatograma do método mostrando a separação dos sete compostos analisados (1) clorotalonil, (2) heptachloro, (3) captan, (4) α -endosulfan, (5) dieldrin, (6) β -endosulfan e (7) endosulfan sulfato

3.3.3 Linearidade

Todos os compostos mostraram um coeficiente de correlação (r^2) $\geq 0,99$ tanto no solvente como nos extratos da matriz, observou-se a presença do efeito matriz para os compostos clorotalonil (Figura 3.6), heptachloro (Figura 3.7), captan (Figura 3.8) e sulfato de endosulfan (Figura 3.11). Esse efeito é observado exclusivamente nos compostos de origem organofosforados (ERNEY; GILLESPIE; GILVYDIS, 1993; POLE, 2007). No entanto, os resultados discordam dos encontrados por outros autores, pois o clorotalonil é um composto do tipo cloronitrilo, heptachloro são organoclorados; o captan é phthalimide e o sulfato de endosulfan também é

organoclorado. Mostrando assim, que o efeito matriz não é exclusivo dos compostos organofosforados. Observou-se que os tipos de moagem influenciam na presença e intensidade desse efeito. A presença deste efeito pode levar a falsas estimativas de presença de um composto durante as análises de resíduos de pesticidas (POLE, 2007).

3.3.4 Cálculo dos limites de detecção e quantificação do método

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental, de acordo com ICH (1995) e DOQ-CGCRE-008 (2010). Usando o método baseado na curva de analítica o LD (RIBANI et al., 2004), pode ser expresso pela fórmula:

$$LD = 3,3 \frac{s}{S}$$

Em que:

s = desvio padrão estimado da resposta ou o coeficiente linear da equação.

S = inclinação coeficiente angular da curva analítica.

Na Tabela 3.1 temos os LD e LQ os quais foram influenciados pelos tipos de moagem, mesmo que a inclinação da curva seja um parâmetro para o cálculo deles, existe influencia negativa com relação a este parâmetro, tornando o método menos eficiente com relação à capacidade de detecção e quantificação dos compostos em baixas concentrações.

Tabela 3.1 - Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para cada composto em função de cada tipo de moagem

Limites para matriz quinoa com diferentes tipos de moagem (mg kg ⁻¹)						
Composto	M1		M2		M3	
	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ
Clorotalonil	0,049	0,060	0,138	0,140	0,049	0,050
Heptacloro	0,049	0,051	0,047	0,049	0,049	0,052
Captan	0,077	0,115	0,106	0,127	0,130	0,144
Alfa endosulfan	0,024	0,025	0,031	0,031	0,034	0,034
Dieldrin	0,023	0,023	0,030	0,031	0,035	0,035
Beta endosulfan	0,019	0,020	0,025	0,025	0,027	0,027
Endosulfan sulfato	0,040	0,043	0,039	0,051	0,035	0,046

3.3.5 Recuperações

Os resultados obtidos mostram que o método foi menos eficiente quando a amostra que foi submetida à moagem normal foi analisada em comparação aos outros tipos de tratamentos (Tabela 3.2).

Segundo (EUROPEAN COMMISSION, 2012), as recuperações nas concentrações de $> 0,1 \text{ mg kg}^{-1} \leq 1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ tem que estar na faixa de 70 a 110% com DPR de 15%. O tipo de moagem empregado para as amostras tem uma relação direta com a recuperação dos compostos, conseguindo-se boas recuperações para seis dos setes compostos estudados (Figura 3.13). No entanto, o endosulfan sulfato apresentou baixas recuperações, que pode ter sido ocasionada pela liberação de interferentes da matriz da amostra que impedem a liberação desde composto, o qual fica ligado em alguma área ativa gerada pela matriz (ERNEY; GILLESPIE; GILVYDIS, 1993). Ocorreu ainda ausência de recuperação para o captan nos dois primeiros níveis de fortificação com sistema de moagem M1, já com as moagens M2 e M3 ocorreram recuperação no segundo e terceiro nível. Isso pode ocorrer com as amostras devido ao fato do captan ser um composto de difícil recuperação e que pode apresentar um elevado efeito matriz (ERNEY; GILLESPIE; GILVYDIS, 1993).

A partícula medida inicialmente da quinoa apresentou diâmetro de, aproximadamente, 1,60 mm e, com a moagem M1 passou a ser 1,25 mm e, com as

moagens M2 e M3 passou a 10 μm de diâmetro. Contudo, o processo de moagem influenciou diretamente nas recuperações dos analitos em estudo.

As recuperações foram melhoradas nos tratamentos com moagem criogênica (M2 e M3), observando-se recuperações uniformes no primeiro nível de fortificação, a 0,08 mg kg^{-1} (Tabela 3.2). Já na fortificação a 0,20 mg kg^{-1} (Tabela 3.3), a moagem M3 apresentou melhores recuperações para todos os agrotóxicos, assim como na fortificação a 0,40 mg kg^{-1} a moagem M3 foi o nível que melhor apresentou recuperações para os analitos em estudo (Tabela 3.4).

Os grãos, de diâmetro menor, para os sete agrotóxicos avaliados, apresentaram maior recuperação dos analitos, devido ao fato de ter sido aumentada sua área de contato com o solvente com a moagem mais fina.

Tabela 3.2 - Recuperações do método analítico na fortificação a 0,08 mg kg^{-1} , para as moagens M1, M2 e M3

Agrotóxico	Recuperações da fortificação (n=7) de 0,08 mg kg^{-1}					
	M1		M2		M3	
	Média	CV(%)	Média	CV(%)	Média	CV(%)
Clorotalonil	67,1	1,0	101,7	6,5	119,2	6,4
Heptacloro	96,4	8,0	116,7	11,1	145,1	2,7
Captan	-	-	-	-	201,7	2,5
α -Endosulfan	59,8	2,0	84,3	5,6	115,0	3,0
Dieldrin	57,7	3,0	82,5	7,7	112,2	3,6
β -Endosulfan	55,1	3,0	78,3	6,8	103,8	3,3
Sulf Endosulfan	50,0	11,0	9,5	67,6	33,9	11,3

Tabela 3.3 - Recuperações do método analítico na fortificação a $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$, para as moagens M1, M2 e M3

Agrotóxico	Recuperações da fortificação (n=7) de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$					
	M1		M2		M3	
	Média	CV(%)	Média	CV(%)	Média	CV(%)
Clorotalonil	32,7	8,0	50,8	2,9	62,3	4,2
Heptacloro	63,6	8,0	57,4	2,2	93,3	0,4
Captan	-	-	52,9	3,9	88,6	2,6
α -Endosulfan	43,8	4,0	56,3	6,1	79,0	0,1
Dieldrin	41,9	5,0	54,3	6,2	76,9	0,2
β -Endosulfan	42,6	6,0	54,4	6,3	76,1	0,1
Sulf Endosulfan	73,7	8,0	26,4	12,7	45,7	1,3

Tabela 3.4 - Recuperações do método analítico na fortificação a $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$, para as moagens M1, M2 e M3

Agrotóxico	Recuperações da fortificação (n=7) de $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$					
	M1		M2		M3	
	Média	CV(%)	Média	CV(%)	Média	CV(%)
Clorotalonil	20,0	7,0	52,5	1,9	62,2	3,4
Heptacloro	45,0	4,0	54,9	5,2	74,3	10,2
Captan	-	-	47,3	12,7	51,9	4,5
α -Endosulfan	35,7	4,0	51,0	3,2	75,0	2,9
Dieldrin	34,7	4,0	50,2	3,1	68,9	8,1
β -Endosulfan	35,7	4,0	51,2	2,9	68,2	8,1
Sulf Endosulfan	102,8	13,0	50,9	3,5	69,3	5,4

3.4 Conclusões

Os tamanhos das partículas apresentam maior uniformidade na moagem criogênica e isto influenciou diretamente a qualidade dos resultados obtidos e na validação do método QuEChERS, que pode apresentar efeito matriz devido ao maior tamanho das partículas dos outros tipos de moagens testadas, como o modo

criogênico M1 (com processador de alimentos) e M2 (criogênico com 10 minutos de moagem).

Os grãos, de diâmetro menor, para os sete agrotóxicos avaliados, apresentaram maior recuperação dos analitos, devido ao fato de ter sido aumentada sua área de contato com a moagem mais fina. Isto se deve, também, ao fato de as amostras estarem em temperaturas mais baixas, o que favorece a preservação dos analitos nas partículas de quinoa moídas.

A partir dos dados dos estudos das três moagens M1 (com processador de alimentos); M2 (criogênico com 10 minutos de moagem) e M3 (criogênico com 36 minutos de moagem), sugere-se a utilização de partículas moídas de quinoa ao tamanho de 10 µm para melhorar a sensibilidade da metodologia QuEChERS, possibilitando maior precisão dos resultados.

Referências

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

BAKER, J. **Mass spectrometry**. 2nd ed. New York: John Wiley, 1999. 515 p.

BARROS, C.B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 175-177, 2002.

BRO-RASMUSSEN, F. Contamination by persistent chemicals in food chain and human health. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 188, p. 45–60, 1996. Supplement.

DINI, I.; TENORE, G.C.; DINI, A. Oleanane saponins in “kancolla”, a sweet variety of *Chenopodium quinoa*. **Journal of Natural Products**, Ohio, v. 65, n. 7, p. 1023-1026, 2002.

_____. Nutritional and antinutritional composition of Kancolla seeds: an interesting and underexploited andine food plant. **Food Chemistry**, Barking, v. 92, n. 1, p. 125–132, 2005.

DOQ-CGCRE-008 Orientação sobre validação de métodos analíticos. Revisão 03. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 15 maio 2010

EBDON, L.; FOULKES, M.; SUTTON, K. Slurry nebulization in plasmas. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 12, n. 2, p. 213-229, 1997.

ERNEY, D.R.; GILLESPIE, A.M.; GILVYDIS, D.M. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with split less or hot on-column injection and flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 638, n. 1, p. 57-63, 1993.

EUROPEAN COMMISSION 2012, **Guidance document on pesticide residue analytical methods**: SANCO/12495/2011. Madrid, 2011. p. 1-40.

EUROPE PESTICIDES DATABASE. 2005. REGULATION (EC) NO. 396/2005 of The European Parliament and of The Council of 23 February 2005 on Maximum Residue Levels of Pesticides in or on Food and Feed of Plant and Animal Origin and Amending Council Directive 91/414/EEC, Off. J. Eur. Communities L70/1, 16.3.2005. Disponível em: <http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm>. Acesso em: 29 out. 2011.

FAO. **FAOSTAT**: statistical databases. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 25 out. 2011.

GALWEY, N.W.; LEAKEY, C.L.A.; PRICE, K.R., FENWICK, G.R. Chemical composition and nutritional characteristics of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*). **Food Sciences and Nutrition**, Basingstoke, v. 42F, n. 4, p. 245-261, 1990.

GROB, R. **Modern practice of gas chromatography**. 3rd ed. New York: Wiley, 1999. 1043 p.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Validation of analytical procedures**: methodology. Q2B (CPMP/1CH/281/95) 1995. Disponível em: <http://www.uam.es/personal_pas/txrf/MU5.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2010.

ISO/CEI 17025 General Requirements for the Competence of Testing and calibration Laboratories, International Organization for Standardization (ISO), Genova, 2005. Disponível em: <http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=39883>. Acesso em: 20 dez. 2010.

KOGLIN, D.; BACKHAUS, F.; SCHLADOT, J.D. Particle size distribution in ground biological samples. **Chemosphere**, Oxford, v. 34, n. 9/10, p. 2041-2047, 1997.

KRUG, F. **Métodos de preparo de amostras**. Piracicaba: CENA, 2008. p. 2-63

KUMPUN, S.; GIRAULT, J.P.; DINAN, L.; BLAIS, C.; MARIA, A.; DAUPHIN-ILLEMANT, C.; YINGYONGNARONGKUL, B.; SUKSAMRARN, A.; LAFONT, R. The metabolism of 20-hydroxyecdysone in mice: relevance to pharmacological effects and gene switch applications of ecdysteroids. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 126, n. 1/2, p. 1-9, 2011.

LEHOTAY, S.J. Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe approach for determining pesticide residues. In: VIDAL, M.; FRENICH, J.L.G. **Methods in biotechnology pesticide protocols**. Totowa: Humana Press, 2005. v. 19, p. 239-261.

LEHOTAY, S.J.; ANASTASSIADES, M.; MAJORS, R.E. The Quechers revolution. **LC GC EUROPE**, Madrid, v. 23, n. 8, p. 418, 2010.

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

LYENGAR, G.V.; KASPEREK, K.J. Application of the brittle fracture technique (BFT) to homogenise biological samples and some observations regarding the distribution behaviour of the trace elements at different concentration levels in a biological matrix. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Amsterdam, v. 39, n. 1/2, p. 301-316, 1977.

MANDALAKIS, M.; APOSTOLAKI, M.; STEPHANOU, E.G. Trace analysis of free and combined amino acids in atmospheric aerosols by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 2, p. 143–150, 2010.

NOMURA, C.S.; SILVA, C.S.; OLIVEIRA, P.V.; NOGUEIRA, A.R.A. Bovine liver sample preparation and micro-homogeneity study for Cu and Zn determination by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, Oxford, v. 60, n. 5, p. 673-680, 2005.

POOLE, C.F.J. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1158, n. 1/2, p. 241–250, 2007.

REPO-CARRASCO, R.; ESPINOZA, C.; JACOBSEN, S.E. Nutritional value and use of the andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). **Food Reviews International**, Philadelphia, v. 19, n. 1/2, p. 179–189, 2003.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H. JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SANTOS, D.; BARBOSA, F.; SOUZA, S. S.; KRUG, F. J. Cryogenic sample grinding for copper, lead and manganese determination in human teeth by slurry sampling GFAAS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Piccadilly, v. 18, n. 8, p. 939-94, 2003

SANTOS, D. Jr.; BARBOSA, F. Jr.; TOMAZELLI, A.C.; KRUG, F.J.; NÓBREGA, J.A.; ARRUDA, M.A.Z. Determination of Cd and Pb in food slurries by GFAAS using cryogenic grinding for sample preparation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 373, n. 3, p. 183-189, 2002.

UNITED STATES. Department of Agriculture. **Foreign agricultural service:** maximum residue limit database. Disponível em: <www.fas.usda.gov/http/MRL.asp>. Acesso em: 24 out. 2011.

4 ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS EM MORANGO USANDO O MÉTODO QUECHERS COM GC- μ ECD

Resumo

Agrotóxicos organoclorados foram utilizados intensivamente nas últimas décadas contra pragas e doenças transmitidas por vetores em vegetais e animais. Devido as propriedades físico química, estes compostos têm contaminado o ambiente e a cadeia alimentar. O consumo destes produtos em baixas concentrações representa um perigo potencial à saúde humana. O método QuEChERS foi ajustado e usado para a determinação de resíduos de doze agrotóxicos organoclorados (α - BHC, β - BHC, heptacloro, dicofol, endosulfan lacton, OP DDD, α - endosulfan, OP DDE, PP DDE, β - endosulfan, PP DDD, endosulfan sulfato) em 36 amostras de morango de três varejões na cidade de Piracicaba do estado de São Paulo – Brasil, durante o período de outubro de 2010 até setembro de 2011. O método envolve uma extração com acetato de etila, partição sólida líquida com $MgSO_4$ e CH_3COONa seguido por “clean up” por dSPE com PSA. As análises foram realizadas com um equipamento GC- μ ECD utilizando uma coluna HP-5 30 m x 0,32 mm x 0,25 μ m. O método foi validado usando uma amostra de morango sem resíduos de agrotóxicos, usado como branco, fortificado a 0,01 e 0,1 $mg\ kg^{-1}$; a recuperação media do método variou entre 72,9 a 120 % com $RSD\% < 9,6\%$. O método mostrou linearidade $r^2 \geq 0,99$ e os LQs variaram entre 0,001 a 0,01 $mg\ kg^{-1}$. Os resultados obtidos indicam que o método é sensível e não existe efeito matriz. Pode-se concluir que o método QuEChERS utilizando GC- μ ECD é uma alternativa para determinar resíduos de pesticidas orgaoclorados em morango; seis amostras mostraram contaminação por endosulfan sulfato nas concentrações de 0,003 a 0,02 $mg\ kg^{-1}$.

Palavras-chave: Frutas; Multiresíduo; Validação; Agrotóxicos; Cromatografia gasosa

Abstract

Organochlorine pesticides (OCPs) were used intensively in recent decades against vegetal and animal pests and vector-borne diseases. Due their physical en chemical properties, these compounds have contaminated the environment and food chain. The consume of this products at low concentration dose represent a potential hazards to human health. The QuEChERS method was adjusted and used for the determination of twelve organochlorine pesticides (α - BHC, β - BHC, heptachlor, dicofol, endosulfan lacton, OP DDD, α - endosulfan, OP DDE, PP DDE, β - endosulfan, PP DDD, endosulfan sulfate) residues in 36 strawberries samples from three markets of the Piracicaba city in the state of Sao Paulo – Brazil, during the period of October 2010 until September 2011. The method involved extraction with ethyl acetate, solid-liquid partition with $MgSO_4$ and CH_3COONa followed by dSPE “clean up” with PSA sorbent. Analyses were carried out with GC- μ ECD equipment. A HP-5 30 m x 0.32mm x 0.25 μ m column was used. The method was validated using a strawberry sample without pesticides residues used as blank, spiked at 0.01 and 0.1 $mg\ kg^{-1}$; the average recovery by the method varied between 72.9 to 120% with

RSD% < 9.6%. The method showed linearity $r^2 \geq 0.99$ and the LQ ranged from 0,001 to 0.01 mg kg⁻¹. It could be concluded that QuEChERS method used with GC- μ ECD is an alternative to determine organochlorine pesticides in strawberries. The results obtained indicate that this method sensitive and has no matrix effect; six samples showed contamination by endosulfan sulfate at the concentrations of 0.003 to 0.02 mg kg⁻¹.

Keywords: Fruit; Multi-residue; Validation; Pesticides; Gas chromatography

4.1 Introdução

O morango no Brasil destaca-se dentro do grupo de frutas de clima temperado, com produção de aproximadamente 105.000 toneladas, distribuídos em quatro mil hectares, sendo que o interesse pelo cultivo do morango é justificado pela alta rentabilidade da cultura, o amplo conhecimento e a aceitação da fruta pelo consumidor e pela diversidade de opções de comercialização e processamento do morango (polpa, sorvetes, geleias, compotas e sucos). O cultivo está concentrado nos Estados de Minas Gerais (41,4%), Rio Grande do Sul (25,6%), São Paulo (15,4%), Paraná (4,7%) e Distrito Federal (4%) (FACHINELLO et al., 2011).

Centenas de agrotóxicos são utilizadas em práticas agrícolas no mundo, não é raro encontrar resíduos de agrotóxicos em produtos alimentícios, especialmente em frutas e vegetais. Muitas autoridades de controle estabeleceram limites máximos residuais (LMRs) para proteger o ambiente e a saúde dos consumidores (USDA, 2010; REGULATION EC/396/2005;). A determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentares tornou-se uma exigência, tendo em conta a toxicidade e estabilidade destes xenobióticos (BRO-RASMUSSEM, 1996), a sua presença nos alimentos é um risco para a saúde humana. A União Européia tem um número de leis que regulamentam a presença de agrotóxicos em alimentos (EUROPEAN COMMISSION 2012; REGULATION (EC) NO. 396/2005)

Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), tais como os pesticidas (DDT, Aldrin, Dieldrin, Endrin, Heptaclorine, Hexacolorobenzeno (HCB) e Toxafeno) são substâncias químicas que persistem no ambiente, acumulando-se em concentrações altas no tecido adiposo e que é biomagnificado através da cadeia alimentar. Conseqüentemente eles constituem sérios riscos ao ecossistema, aos invertebrados e a saúde humana (PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE, 2002). Os agrotóxicos organoclorados têm uma ampla gama de efeitos agudos e crônicos para os seres humanos, dentro deles danos neurológicos, câncer

e efeitos congênitos, muitos destes compostos são suspeitos de atuar como disruptores endócrinos (GONZALES et al., 2003; HOH et al., 2009). Particularmente o controle de agrotóxicos organoclorados em frutas e vegetais é importante para que agências de controle possam alertar sobre a presença de resíduos destes agrotóxicos (GUAN et al., 2010) especialmente por que esses alimentos na maioria dos casos, são consumidos crus e muitas sem lavagem.

O método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) foi introduzido por ANASTASSIADES et al., (2003) e esta sendo aplicado em vários estudos ao redor do mundo para análises de resíduos em diferentes matrizes; principalmente usado com sistemas cromatográficos acoplados a espectrometria de massas LC/MS/MS e GC/MS (AYSAL et al., 2007; HÚŠKOVÁ; MATISOVÁ; KIRCHNER, 2008; LEHOTAY et al., 2005b; LEHOTAY, 2007; LESUEUR, et al., 2008; LEHOTAY; MASTOVSKÁ; YUN, 2005a; LOOSER et al., 2006; MASTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004; NGUYEN et al., 2007, 2008). O objetivo deste trabalho foi ajustar e validar o método QuEChERS para a determinação de 12 agrotóxicos organoclorados usando CG- μ ECD e monitoração de 36 amostras de morango provenientes de três varejões da cidade de Piracicaba no estado de São Paulo, Brasil.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Reagentes e materiais

Padrões analíticos de (α -BHC, β -BHC, heptacloro, dicofol, endosulfan lacton, OP DDD, α - endosulfan, OP DDE, PP DDE, β - endosulfan, PP DDD, endosulfan sulfato), com mais de 98,9% de pureza foram obtidos de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) e ChemService (West Chester, PA, USA). Foram preparadas soluções estoque individuais numa concentração de (1 mg mL^{-1}) em tolueno grau HPLC e armazenadas numa temperatura de $-18 \text{ }^\circ\text{C}$. As soluções de trabalho na diluição apropriada foram preparadas antes do seu uso. O acetato de etila e tolueno foram de grau HPLC (J. T. Baker) e o ácido acético P.A, CH_3COONa e MgSO_4 anidro (J.T Baker) e PSA (Varian), foram adequados para análises de resíduos. Uma amostra de morango proveniente do sistema de produção orgânica, sem resíduos de pesticidas, obtida na cidade de Piracicaba foi utilizada como amostra branca, para o processo de validação do método. Foram analisadas 36 amostras de morango, provenientes de três varejões da cidade de Piracicaba no estado de São Paulo –

Brasil, amostras coletadas no período de outubro de 2010 até setembro de 2011. Foi coletado um quilograma de amostra de morango; a amostra foi processada em processador de alimentos, separada uma sub amostra de 200 g que foi destinada para análise.

4.2.2 Equipamento

Um sistema cromatográfico de fase gasosa (Agilent, modelo 7890A), equipado com um micro detector de captura de elétrons (μ ECD) e coluna capilar Agilent HP (30 m x 320 μ m x 0.25 μ m) foi utilizado para a separação, detecção e quantificação dos agrotóxicos. O software ChemStation B.04.02 foi utilizado para o controle do instrumento e aquisição dos dados. As condições de operação do sistema CG- μ ECD foram: forno com temperatura inicial de 150 °C aumentando para 210 °C a 20 °C min⁻¹ mantido por 3 min; 210 °C aumentando para 230 °C a 15 °C min⁻¹ mantido por 5 min e 230 °C aumentando para 280 °C a 20 °C min⁻¹, gás de arraste (N₂) com um fluxo constante de 1 mL min⁻¹; temperatura do detector 300 °C, gás make-up (N₂) de 39 mL min⁻¹. O tempo total da corrida analítica foi de 15 min; a quantificação dos analitos foi realizada com curvas de calibração feitas no extrato da matriz.

4.2.3 Preparo da amostra

Foi utilizado acetato de etila como solvente para a extração com MgSO₄ e CH₃COONa anidro seguido de um **clean up** por dispersão da fase sólida (dSPE) com adsorvente PSA; 15 g de amostra de morango foram pesadas em um tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL; foi adicionado 15 mL de acetato de etila, 6 g de MgSO₄ e 1,5 g de CH₃COONa anidro. A amostra foi agitada manualmente por 1 min, e em seguida centrifugada a 5000 rpm por 5 min. Para o **clean-up**, uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de centrifuga de 2 mL contendo 50 mg de PSA e 150 mg de MgSO₄, agitada manualmente durante 30 segundos e centrifugada a 5000 rpm por 5 min; 500 μ L deste extrato foi colocado em um *vial* de 1,5 mL diluído com 500 μ L de acetato de etila, foi injetado 1 μ L no sistema CG- μ ECD no modo (*pulsed split less*) para a análise.

4.2.4 Validação do método analítico

A validação do método analítico foi realizada seguindo os seguintes parâmetros: linearidade, limites de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e repetitividade (INMETRO, 2010; EUROPEAN COMMISSION, 2012). A linearidade foi determinada através da construção de curvas analíticas em diferentes concentrações 0,0010; 0,0025; 0,0050; 0,0100; 0,0500; 0,0750; 0,1; 0,1500 e 0,2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dois tipos diferentes de curvas de calibração foram preparados por uma série de diluições da solução estoque, uma em tolueno e outra no extrato da matriz morango. Este extrato foi obtido da extração do morango seguindo os procedimentos analíticos descritos.

Os estudos de recuperação foram realizados fortificando 15 g de amostra de morango homogeneizada, com a solução padrão dos pesticidas em dois níveis de fortificação (correspondentes aos LQs e 10 vezes estes valores). Os valores de recuperação foram estabelecidos para cada agrotóxico, com sete repetições para cada nível de fortificação. Depois da fortificação a amostra foi deixada em repouso por uma hora e as amostras foram extraídas de acordo com o procedimento previamente descrito.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Validação do método

O coeficiente de correlação para todos os compostos estudados foram $r^2 \geq 0,99$. Não foi observado efeito matriz significativo; os tempos de retenção (TR), limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) dos agrotóxicos analisados são mostrados na Tabela 4.1. Assim como no trabalho realizado por Gebara, Ciscato e Monteiro (2011) os limites de quantificação foram na ordem de $0,001 \text{ mg kg}^{-1}$ para análises de organoclorados em morangos sendo que o *clean up* utilizado pelos autores foi GPC (Cromatografia por Permeação a Gel), com o que conseguem uma boa limpeza da amostra e limites de quantificação ótimos.

No Brasil não existem limites máximos residuais (LMR) para compostos organoclorados na matriz morango. A comunidade europeia (REGULATION (EC) NO. 396/2005) estabelece LMR referenciais para estes tipos de compostos nesta matriz, sendo que os limites de quantificação do presente trabalho (Tabela 4.3) estão abaixo do menor LMR referencial estabelecido, que é de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$.

Os experimentos de recuperações realizados nas concentrações de 0,01 mg kg⁻¹ e 0,1 mg kg⁻¹ apresentaram recuperações na ordem de 72,3 e 120,3 %, que estão dentro dos parâmetros estabelecidos pela comunidade europeia e o Brasil (INMETRO, 2010; EUROPEAN COMMISSION, 2012;), observou-se uma recuperação de 148,3 % na concentração de 0,01 mg kg⁻¹ para o composto heptacloro; este efeito 28 % acima do limite estabelecido pode ser atribuído a uma leve interferência da matriz para esta concentração (ERNEY; GILLESPIE; GILVYDIS, 1993; POLE, 2007). Os desvios padrões relativos das recuperações realizadas no tempo zero e sete dias após foram $\leq 9,6$ % o qual mostra que o método é preciso e exato (INMETRO, 2010; EUROPEAN COMMISSION, 2012).

Tabela 4.1 - Resultados da fortificação dos agrotóxicos estudados, tempos de retenção (TR), limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ), recuperações e precisão, RSD = Desvio padrão relativo

AGROTÓXICO	TR (min)	LD (mg kg ⁻¹)	LQ (mg kg ⁻¹)	RECUPERAÇÕES % (n=7)				INTERDIA PRECISÃO (n=7)	
				0,01 (mg kg ⁻¹)		0,1 (mg kg ⁻¹)		0,01 (mg kg ⁻¹)	
					RSDs %		RSDs %		RSDs %
α – BHC	5,4	0,005	0,006	95,7	2,3	72,9	3,2	73,5	7,6
β - BHC	5,9	0,001	0,002	72,3	3,0	78,2	4,6	77,5	8,2
Heptachlor	7,5	0,007	0,011	148,3	2,5	94,3	3,4	75,7	3,3
Dicofol	8,3	0,002	0,003	113,2	4,8	80,2	6,6	75,5	5,6
Endosulfan Lacton	9,1	0,052	0,106	96,0	7,0	83,5	3,0	86,8	6,9
OP DDD	9,9	0,001	0,001	83,1	3,4	73,3	5,2	77,7	0,9
α - endosulfan	10,2	0,003	0,005	88,2	2,0	78,5	3,5	74,3	3,0
OP DDE	10,8	0,003	0,005	120,3	1,3	86,0	3,3	103,1	8,3
PP DDE	11,2	0,003	0,004	112,3	1,9	81,3	4,1	126,2	2,8
β - endosulfan	12,2	0,003	0,005	114,3	9,6	83,3	3,3	101,9	7,7
PP DDD	12,5	0,001	0,003	100,6	2,3	81,8	3,1	101,1	7,4
Endosulfan sulfato	13,9	0,001	0,003	96,1	5,9	79,3	3,1	81,7	5,3

A Figura 4.1 mostra um cromatograma do extrato fortificado na matriz morango com os doze agrotóxicos, onde há uma separação eficiente para os compostos em estudo. Na Figura 4.2 é apresentado um cromatograma onde não são observados picos no tempo de retenção de cada composto em estudo o qual garante a seletividade do método.

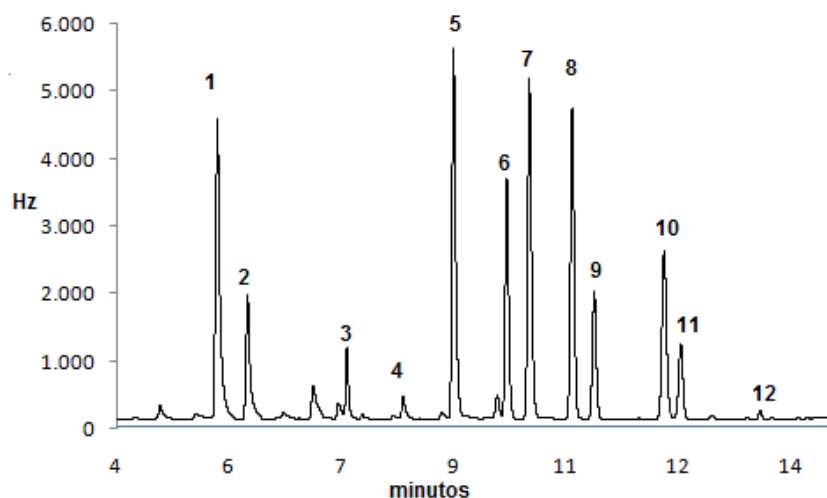


Figura 4.1 - Cromatograma obtido do CG- μ ECD na concentração de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$: (1) α - BHC, (2) β - BHC, (3) heptachlor, (4) dicofol, (5) endosulfan lacton, (6) OP DDD (7) α - endosulfan, (8) OP DDE, (9) PP DDE, (10) β - endosulfan, (11) PP DDD, (12) endosulfan sulfato

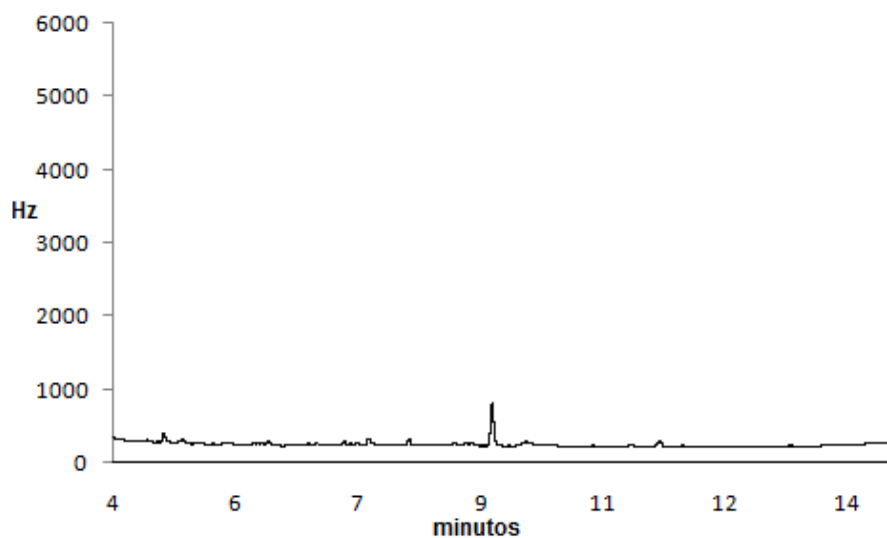


Figura 4.2 - Cromatograma do branco da matriz de morango

4.3.2 Análises das amostras

Foram analisadas 36 amostras dos quais seis apresentaram resíduos de endosulfan sulfato (Tabela 4.4); o uso de endosulfan na cultura de morango no Brasil não é permitido; sendo seu uso permitido somente para as culturas de algodão, cacau, café, cana-de-açúcar e soja, e é estabelecido um LMR para estas culturas de $0,006 \text{ mg kg}^{-1}$ (AGROFIT, 2012).

Em três amostras as concentrações apresentadas estavam acima do limite estabelecido, por outro lado (REGULATION (EC) NO. 396/2005) estabeleceu um LMR referencial de resíduos de endosulfan em morango de $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$; com o que as amostras analisadas apresentam resíduos abaixo deste limite.

Em um trabalho realizado por Fernandes (2011) para o monitoramento de organoclorados, em áreas com manejo integrado de pragas e agricultura orgânica encontrou três amostras contaminadas com β -endosulfan, sendo $0,007 \text{ mg kg}^{-1}$ a maior concentração encontrada.

A meia vida do endosulfan sulfato no solo foi estimada em 120 dias ate vários meses, (AWASTHI; AHUJA; KUMAR, 2000; RAO; MURTHY, 1980) tendo em consideração esta referência há suspeita que este composto contaminou à cultura na sua primeira etapa de desenvolvimento, já que o endosulfan sulfato é um metabolito estável (MARTENS, 1976; MILES; MOY, 1979).

Tabela 4.4 - Local de coleta data de coleta e resíduos de endosulfan sulfato nas amostras de morango analisadas

LOCAL DE COLETA	DATA DE COLETA	ENDOSULFAN SULFATO (mg/Kg)
R Benjamin Constant 1668	15/11/2010	0,006
R Benjamin Constant 1668	15/02/2011	0,007
R. Regente Feijó, 455	15/02/2011	0,005
Rua João Sampaio, 2062	15/02/2011	0,004
R Benjamin Constant 1668	15/03/2011	0,003
Rua João Sampaio, 2062	15/05/2011	0,026

4.4 Conclusões

Para a identificação e quantificação de resíduos de agrotóxicos organoclorados um método de extração rápido e simples foi otimizado usando um sistema CG- μ ECD, validado e usado para análises direto de amostras de morango depois de uma seleção de uma melhor condição para este fim.

O método de extração QuEChERS ajustado trocando o tipo de solvente por acetato de etila e usado com um equipamento GC- μ ECD é uma alternativa para a determinação de agrotóxicos organoclorados em morango. Os resultados obtidos indicam que este método é sensível (LQ de 0,001 mg kg⁻¹) e não apresenta efeito matriz.

Foi constatada a presença de resíduos de endosulfan sulfato em seis amostras analisadas demonstrando a contaminação de morangos por este composto.

4.5 Sugestões

Realizar monitoramentos periódicos de resíduos de agrotóxicos organoclorados para obter informação da quantidade de resíduos de estes agrotóxicos em morango.

Referências

AGROFIT: sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 16 maio 2012.

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

ARICA, D.; KROSCHKE, J.L.; FORBES, G.; SAINT PERE, K. **Persistent organic pollutants and hazardous pesticides in andean farming communities in Peru:** project implemented by The Internacional Potato Center (CIP) Funded by the Canada POPs Fund, World Bank, Lima, 2006. p. 1-53

AWASTHI, N.; AHUJA, R.; KUMAR, A. Factors influencing the degradation of soil applied endosulfan isomers. **Soil Biology & Biochemistry**, Amsterdam, v. 32, n. 11-12, p. 1697–1705, 2000.

AYSAL, P.; AMBRUS, A.; LEHOTAY, S.J.; CANNAVAN, A. Validation of an efficient method for the determination of pesticides residues in fruits and vegetables using ethyl acetate for extraction. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, New York, v. 42, n. 5, p. 481–490, 2007.

BRO-RASMUSSEN, F. Contamination by persistent chemicals in food chain and human health. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 188, n. 1, p. 45–60, 1996.

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

DINI, I.; TENORE, G.C.; DINI, A. Oleanane saponins in “kancolla”, a sweet variety of *Chenopodium quinoa*. **Journal of Natural Products**, Ohio, v. 65, n. 7, p. 1023–1026, 2002.

_____. Nutritional and antinutritional composition of Kancolla seeds: An interesting and underexploited andine food plant. **Food Chemistry**, Barking, v. 92, n. 1, p. 125–132, 2005.

ERNEY, D.R.; GILLESPIE, A.M.; GILVYDIS, D.M.J. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 638, n. 1, p. 57-63, 1993.

EUROPEAN COMMISSION 2012. **Guidance document on pesticide residue analytical methods**. SANCO/12495/2011. p. 1-40.

FACHINELLO, J.C.; PASA, M.S. de; SCHMTIZ, J.D.; BETEMPS, D.L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. esp. 1, p. 109-120, 2011.

FAO. **FAOSTAT**: statistical databases. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 25 mar. 2012.

FERNANDES, V.C.; DOMINGUES, V.F.; MATEUS, N.; DELERUE-MATOS, C. Organochlorine pesticide residues in strawberries from integrated pest management and organic farming. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, p. 7582–7591, 2011.

FURLANI, R.P.Z.; MARCILIO, K.M.; LEME, F.M.; TFOUNI, S.A.V. Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection. **Food Chemistry**, Barking, v. 126, p. 1283–1287, 2011.

GALWEY, N.W.; LEAKEY, C.L.A.; PRICE, K.R.; FENWICK, G.R. Chemical composition and nutritional characteristics of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*). **Food Sciences and Nutrition**, Basingstoke, v. 42F, n. 4, p. 245–261, 1990.

GEBARA, A.B.; CISCATO, C.H.P.; MONTEIRO, S.H. Pesticide residues in some commodities: dietary risk for children. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 86, n. 5, p. 506–510, 2011.

GOMERO, L. **Diagnostico de plaguicidas y salud en los corredores económicos de Jaen, Tarapoto y Huancayo**: estudio solicitado por CRS/CARITAS Perú. Lima, 2003. 100 p.

GONZALEZ, M.; MIGLIORANZA, K.S.B.; MORENO, J.E.A.; MORENO, V.J. Organochlorine pesticide residues in leek (*Allium porrum*) crops grown on untreated soils from an agricultural environment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 17, p. 5024–5029, 2003.

GUAN, H.; BREWER, W.E.; GARRIS, S.T.; MORGAN, S.L. Disposable pipette extraction for the analysis of pesticides in fruit and vegetables using gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 12, p. 1867–1874, 2010.

HOH, E.; LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKA, K.; NGO, H.L.; VETTER, W.; PANGALLO, K.C.; REDDY, C.M. Capabilities of direct sample introduction-comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry to analyze organic chemicals of interest in fish oils. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 43, n. 9, p. 3240–3247, 2009.

HÚŠKOVÁ, R.; MATISOVÁ, E.; KIRCHNER, M. Fast GC–MS pesticide multiresidue analysis of apples. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 68, n. 1, p. 49–55, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**: DOQ-CGCRE-008 – Revisão 03. 2010. 20 p. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2012.

KUMPUN, S.; MARIA, A.; CROUZET, S.; EVRARD-TODESCHI, N.; GIRAULT, J.; LAFONT, R. Ecdysteroids from *Chenopodium quinoa Willd.*, an ancient Andean crop of high nutritional value. **Food Chemistry**, Barking, v. 125, n. 4, p. 1226–1234, 2011.

LEHOTAY, S.J. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 90, n. 2, p. 485–520, 2007.

LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKÁ, K.; YUN, S.J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 88, n. 2, p. 630–638, 2005a.

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

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

LOOSER, N.; KOSTELAC, D.; SCHERBAUM, E.; ANASTASSIADES, M.; ZIPPER, H. Pesticide residues in strawberries sampled from the market of the Federal State of Baden-Württemberg in the period between 2002 and 2005. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherh**, Birkhäuser, v. 1, n. 2, p. 135–141, 2006.

MARTENS, R. Degradation of (8–9 14C) endosulfan by soil microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 31, n. 6, p. 853–858, 1976.

MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S.J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1040, n. 2, p. 259–272, 2004.

MILES, J.R.W.; MOY, P. Degradation of endosulfan and its metabolites by a mixed culture of soil microorganisms. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 23, n. 1, p. 13–19, 1979.

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

NGUYEN, T.D.; LEE, B.S.; LEE, B.R.; LEE, D.M.; LEE, G.H. A multiresidue method for the determination of 109 pesticides in rice using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) sample preparation method and gas chromatography/mass spectrometry with temperature control and vacuum concentration. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 21, n. 18, p. 3115–3122, 2007.

POOLE, C.F.J. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1158, n. 1/2, p. 241–250, 2007.

PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE. **Evaluación regional sobre sustancias tóxicas persistentes**: informe regional de Sudamérica oriental y occidental. Ginebra Suiza, 2002. 79 p.

RAO, D.M.R.; MURTHY, A.S. Persistence of endosulfan in soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, n. 6, p. 1099–1101, 1980.

REGULATION (EC) NO. 396/2005 of The European Parliament and of The Council of 23 February 2005 on Maximum Residue Levels of Pesticides in or on Food and Feed of Plant and Animal Origin and Amending Council Directive 91/414/EEC, Off. J. Eur. Communities L70/1, 16.3.2005. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/sanco/pesticides/public/index.cfm>>. Acesso em: 29 out. 2011.

REPO, C.R.; ESPINOZA, C.; JACOBSEN, S.E. Nutritional value and use of the andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). **Food Reviews International**, Philadelphia, v. 19, n. 1/2, p. 179–189, 2003.

UNITED STATES. Department of Agriculture. **Foreign agricultural service:** maximum residue limit database. Disponível em: <www.fas.usda.gov/http/MRL.asp>. Acesso em: 24 out. 2011.

XUE, J.; HAO, L.; PENG, F. Residues of 18 organochlorine pesticides in 30 traditional Chinese medicines. **Chemosphere**, Oxford, v. 71, n. 6, p. 1051-1055, 2007.

YAVUZ, H.; GULER, G.O.; AKTUMSEK, A.; CAKMAK, Y.S.; OZPARLAK, H. Determination of some organochlorine pesticide residues in honeys from Konya, Turkey. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 168, n. 1/4, p. 277–283, 2010.

5 VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE ANÁLISES MULTIRRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM MORANGO USANDO LC-MS/MS

Resumo

O método QuEChERS foi ajustado e validado para determinação de 36 agrotóxicos em 36 amostras de morangos de três varejões da cidade de Piracicaba do Estado de São Paulo durante o período de outubro de 2010 até setembro de 2011. O método envolve extração com acetonitrila 1% ácido acético com $MgSO_4$ e CH_3COONa anidro seguido de um *clean up* por dispersão da fase sólida (dSPE) com adsorvente PSA. As análises foram realizadas com um sistema de cromatografia líquida acoplado a um espectrômetro de massas LC-MS/MS utilizando uma coluna C-18 150 mm x 2,1 x 3,5 μm . Usou-se água (A) e acetonitrila (B) 0,1% ácido fórmico, respectivamente, como fase móvel. O método foi validado usando uma amostra de morango sem resíduos de agrotóxicos, usado como branco, fortificado a 0,01, 0,02 e 0,1 $mg\ kg^{-1}$, as recuperações médias variaram entre 91,3 a 130,7% com $RSD\% \leq 14,3$. O método mostrou linearidade de $r^2 \geq 0,99$ e os LQ variaram entre 0,001 a 0,01 $mg\ kg^{-1}$. Os resultados obtidos indicam que o método é sensível e não existe efeito matriz; pode-se concluir que o método QuEChERS utilizando LC-MS/MS é uma alternativa para determinar resíduos de pesticidas em morango; foi constatada a presença de resíduos de tiametoxam, azoxistrobina, tebuconazol e iprodiona em onze amostras analisadas; quantidades que estão abaixo dos LMRs estabelecidos e quatro amostras apresentaram resíduos de procloraz composto que não é permitido para seu uso em morango.

Palavras-chave: Frutas; Pesticidas; Resíduos; Cromatografia

Abstract

The QuEChERS method was adjusted and validated for determination of 36 pesticides in 36 strawberries samples from three markets of Piracicaba in Sao Paulo State during the period from October 2010 until September 2011. The method involves extraction with acetonitrile with 1% acetic acid and $MgSO_4$ and CH_3COONa anhydrous followed by clean up by dispersing the solid phase (dSPE) whit PSA absorbent. Analyses were performed with a liquid chromatography system coupled to a mass spectrometer LC-MS/MS using a C-18 column 2.1 x 150 mm x 3.5 μm . Were used water (A) and acetonitrile (B) 0.1% formic acid respectively as a mobile phase. The method was validated using a strawberries sample without pesticides residues, used as a blank, fortified at 0.01, 0.02 and 0.1 $mg\ kg^{-1}$, the recoveries ranged between 91.3 to 130.7% with $RSD \leq 14.3\%$. The method showed linearity of $r^2 \geq 0.99$ and the LQs ranged from 0.001 to 0.01 $mg\ kg^{-1}$. The results indicate that the method is sensitive and there is not a matrix effect; we can conclude that the QuEChERS method using LC-MS/MS is an alternative to determine pesticides residues in strawberries; was found the presence residues of thiamethoxam, azoxystrobin, tebuconazole and iprodione in eleven samples, amounts that are below the MRLs established and four samples had residues of prochloraz compound that is not permitted for use in strawberry.

Keywords: Fruits, Pesticides. Residues; Chromatography

5.1 Introdução

O morango no Brasil destaca-se dentro do grupo de frutas de clima temperado, com produção de aproximadamente 105.000 toneladas, distribuídos em quatro mil hectares, sendo que o interesse pelo cultivo do morango é justificado pela alta rentabilidade da cultura, o amplo conhecimento e a aceitação da fruta pelo consumidor e pela diversidade de opções de comercialização e processamento do morango (polpa, sorvetes, geleias, compotas e sucos). O cultivo está concentrado nos Estados de Minas Gerais (41,4%), Rio Grande do Sul (25,6%), São Paulo (15,4%), Paraná (4,7%) e Distrito Federal (4%) (FACHINELLO et al., 2011).

Centenas de agrotóxicos são utilizadas em práticas agrícolas no mundo, não é raro encontrar resíduos de agrotóxicos em produtos alimentícios, especialmente em frutas e vegetais. Autoridades de controle no mundo estabeleceram limites máximos residuais (LMRs) para proteger o ambiente e a saúde dos consumidores (USDA, 2010; REGULATION EC/396/2005;). A determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentares tornou-se uma exigência, tendo em conta a toxicidade e estabilidade destes xenobióticos (BRO-RASMUSSEM, 1996), a sua presença nos alimentos é um risco para a saúde humana. A União Europeia tem um número de normas que regulamentam a presença de agrotóxicos em alimentos (EUROPEAN COMMISSION 2012; REGULATION (EC) NO. 396/2005).

No Brasil o Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxico (PARA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA desde o ano 2001 até 2007 monitorou 97 ingredientes ativos em nove culturas de alimentos, dentro os quais o morango (ANVISA, 2011), sendo que para o ano 2008 o número de alimentos monitorados aumentou para dezessete. O programa monitorou em 24 dos 26 estados incluindo o distrito federal, desde 2001 até 2010 foram analisadas um total de 13556 amostras dos quais 992 amostras de morango e destes 393 amostras deram positivo para resíduos de agrotóxicos sendo 13,5% acima do LMRs estabelecidos e 73,3% apresentaram resíduos de compostos não autorizados para esta cultura (JARDIM; CALDAS, 2012).

O método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) foi introduzido por ANASTASSIADES et al., (2003) e está sendo aplicado em vários estudos ao redor do mundo para análises de resíduos em diferentes matrizes; principalmente usado com sistemas cromatográficos acoplados a espectrometria de

massas LC/MS/MS e GC/MS (AYSAL et al., 2007; HÚŠKOVÁ; MATISOVÁ; KIRCHNER, 2008; LEHOTAY et al., 2005b; LEHOTAY, 2007; LESUEUR, et al., 2008; LEHOTAY; MASTOVSKÁ; YUN, 2005a; LOOSER et al., 2006; MASTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004; NGUYEN et al., 2007, 2008).

De acordo com a literatura, os programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos usam métodos de extração que empregam muita quantidade de solventes orgânicos, gerando assim resíduos tóxicos para o ambiente, nesse sentido o método de extração QuEChERS é um método que gera mínimas quantidades de resíduos (ANASTASSIADES et al., 2003). O objetivo deste trabalho foi ajustar e validar este método para a determinação de 36 agrotóxicos dentre os quais se encontram compostos autorizados, não autorizados para seu uso neste cultivo e reportados por outros monitoramentos no mundo usando LC-MS/MS em 36 amostras de morango provenientes de três varejões da cidade de Piracicaba no estado de São Paulo, Brasil.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Reagentes e materiais

Padrões analíticos dos compostos com mais de 98,9% de pureza foram obtidos de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) e ChemService (West Chester, PA, USA) (Tabela 5.1). Foram preparadas soluções estoque individuais em uma concentração de (1 mg mL⁻¹) em acetonitrila grau HPLC e armazenadas a -18 °C. As soluções de trabalho na diluição apropriada para seu uso foram preparadas em uma solução 80:20% (v/v) água acetonitrila 0,1% ácido acético. A acetonitrila foi de grau HPLC (J. T. Baker), o ácido acético P.A e o ácido fórmico 88% (T. Baker), CH₃COONa e MgSO₄ anidro (J.T Baker) e PSA (Varian), foram adequados para análises de resíduos. Uma amostra de morango proveniente do sistema de produção orgânica, sem resíduos de agrotóxicos, obtida na cidade de Piracicaba foi utilizada como amostra branca para o processo de validação do método. Foram analisadas 36 amostras de morango, provenientes de três varejões da cidade de Piracicaba no estado de São Paulo – Brasil, amostras coletadas no período de outubro de 2010 até setembro de 2011. Foi coletado um quilograma de amostra de morango; a

amostra foi processada em processador de alimentos, separada uma sub amostra de 200 g que foi destinada para análise.

5.2.2 Equipamento

Para a separação e identificação dos compostos foi utilizado um cromatógrafo líquido (Agilent 1200) com um sistema de ionização por electrospray acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (Agilent 6410), usou-se uma coluna analítica C-18 150 mm x 2,1 x 3,5 μm . Usou-se água (A) e acetonitrila (B) 0,1% ácido fórmico, respectivamente, como fase móvel. A programação da gradiente iniciou com 80% de A manteve-se constante durante 10 minutos e mudou-se para 10% de A, depois de 15 minutos de corrida analítica foram deixados 10 minutos de “post run” usando a gradiente inicial de 80% de A, foi mantido um fluxo constante de 0,25 mL min^{-1} durante toda a corrida analítica; para o análises de espectrometria de massas o sistema de electrospray operou-se no modo positivo com 3500 V, gás nebulizador 43 psi; temperatura da fonte 350 °C. O nitrogênio foi utilizado como gás nebulizador e de colisão; a escolha dos íons, energias de colisão e fragmentação foram otimizadas para cada analito usando o software “mass hunter optimizer B.02.00”, a Tabela 5.1 mostra os valores das configurações instrumentais para cada um dos compostos analisados. Uma melhor sensibilidade foi obtida operando o sistema no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM), para a identificação dos compostos estudados duas transições foram escolhidas. Para a aquisição de dados e operação do equipamento o software “Agilent masshunter data acquisition” foi utilizado; e para o processamento dos dados o software “Agilent Quantitative Analysis”.

Tabela 5.1 - Configurações analíticas usadas no espectrômetro de massas para os compostos monitorados

COMPOSTO	ÍON PRECURSOR	ÍON PRODUTO	ENERGIA DE COLISÃO (1)	ÍON PRODUTO	ENERGIA DE COLISÃO (2)	ENERGIA DE FAGMENTAÇÃO
acetamiprido	223,1	126,0	20	99,0	39	90
aldicarbe	213,0	116,0	5	89,1	10	110
atrazina	216,1	174,0	16	104,0	32	120
azoxistrobina	404,1	372,0	8	344,1	24	100
benalaxil	326,2	294,1	4	148,1	16	100
bromacila	261,0	204,9	9	188,0	26	70
bromuconazol	376,0	158,9	24	89,0	104	130
buprofezina	306,2	201,0	8	116,0	12	90
carbaril	202,1	145,0	0	127,0	28	55
carbofurano	222,1	165,0	8	123,0	20	70
cimoxanil	199,1	128,0	0	83,0	12	50
ciproconazol	292,1	125,0	32	70,1	16	110
diflubenzurom	311,0	158,0	10	141,0	35	120
dimetoato	230,0	198,9	4	124,9	20	60
diurom	233,0	159,9	24	72,0	20	100
fenamifos	304,1	216,9	20	201,9	36	110
fenarimol	331,0	189,0	52	111,0	64	140
fenoxicarb	302,1	256,1	8	116,0	4	90
fipronil	437,0	368,2	13	314,9	25	130
flazassulfurom	408,1	182,0	12	139,0	40	110
imidacloprido	256,1	209,0	12	175,1	16	90
iprodião	330,0	245,0	10	----	----	90
linurom	249,0	159,9	12	132,9	36	100
malationa	331,1	284,9	0	127,0	8	70
metiocarbe	226,1	169,0	4	121,0	16	60
metribuzim	215,1	187,2	13	74,0	36	85
monurom	199,1	126,0	24	99,0	40	85
pirimetanil	200,1	181,1	47	107,0	21	150
pirimicarbe	239,1	182,1	12	72,0	20	90
pirimifos-metil	306,1	201,1	8	106,0	24	90
procloraz	376,0	307,9	4	70,0	24	85
prometrina	242,1	200,0	16	158,0	20	120
tebuconazol	308,2	125,0	40	70,0	16	120
tiacloprido	253,0	126,0	16	90,0	28	95
triadimenol	296,1	227,0	1	70,1	5	60
triazofos	314,1	162,0	16	119,0	36	100

5.2.3 Preparo da amostra

Foi utilizado acetonitrila 1% ácido acético como solvente para a extração com MgSO_4 e CH_3COONa anidro seguido de um **clean up** por dispersão da fase sólida (dSPE) com adsorvente PSA; 15 g de amostra de morango foram pesadas em um tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL; foi adicionado 15 mL da acetonitrila 1% ácido acético, 6 g de MgSO_4 e 1,5 g de CH_3COONa anidro. A amostra foi agitada manualmente por 1 min, e em seguida centrifugada a 5000 rpm por 5 min. Para o **clean-up**, uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de centrifuga de 2 mL contendo 50 mg de PSA e 150 mg de MgSO_4 , agitada manualmente durante 30 segundos e centrifugada a 5000 rpm por 5 min; 500 μL deste extrato foi colocado em um *vial* de 1,5 mL, tendo sido injetado 2 μL no sistema LC-MS/MS para a análise.

5.2.4 Validação do método analítico

A validação do método analítico foi realizada seguindo os seguintes parâmetros: linearidade, limites de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e repetitividade (EUROPEAN COMMISSION, 2012; INMETRO, 2010). A linearidade foi determinada através da construção de curvas analíticas em diferentes concentrações 0,0025; 0,005; 0,010; 0,020; 0,040; 0,100 e 0,200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dois tipos diferentes de curvas de calibração foram preparados por uma série de diluições da solução estoque, uma em uma solução 80 : 20% (v/v) água acetonitrila 0,1% ácido acético e outra no extrato da matriz morango. Este extrato foi obtido da extração do morango seguindo os procedimentos analíticos descritos (item 2.3).

A avaliação do efeito matriz foi estudada pela comparação dos valores da inclinação das duas curvas de calibração feitas na matriz e no solvente. Incremento do sinal ocorre se a porcentagem da diferença entre as inclinações é positivo, e se for negativo existe supressão do sinal analítico. Dependendo do valor destas porcentagens diferentes efeitos de matriz podem ser observados. Uma porcentagem entre -20% e 20% foi considerado como não existência de efeito matriz, por estes valores encontram-se próximos aos valores de repetibilidade. Um efeito de matriz intermediário ocorre quando os valores estão entre -50% e -20% ou 20% e 50%, e um efeito forte da matriz seriam abaixo de -50% ou acima de 50% (FERNANDEZ, 2004) Tabela 5.2 mostra os valores de efeito matriz para cada composto estudado.

Os estudos de recuperação foram realizados fortificando 15 g de amostra de morango homogeneizada, com a solução padrão dos pesticidas em dois níveis de fortificação (correspondentes aos LQs e 10 vezes este valor). Os valores de recuperação foram estabelecidos para cada agrotóxico, com sete repetições para cada nível de fortificação. Depois da fortificação a amostra foi deixada em repouso por uma hora e logo foram extraídas de acordo com o procedimento previamente descrito.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Validação do método

O coeficiente de correlação para todos os agrotóxicos estudados foram $r^2 \geq 0,99$. Não foi observado efeito matriz significativo para a maioria dos compostos, três compostos (aldicarbe, flazassulfuron e imidacloprido) mostraram efeito matriz intermediário; os tempos de retenção (TR), limites de quantificação (LQ) dos agrotóxicos analisados são mostrados na Tabela 5.2 conseguiu-se LQs na ordem de $0,002 \text{ mg kg}^{-1}$, valores que estão abaixo dos estabelecidos pelas autoridades (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2012; USDA, 2010).

Os experimentos de recuperações realizados nas concentrações de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ apresentaram recuperações na ordem de 93,1 e 130,7 %, sendo que a maioria dos valores estão dentro dos parâmetros estabelecidos pelo Brasil e a Comunidade Europeia (INMETRO, 2010; EUROPEAN COMMISSION, 2012), observou-se algumas recuperações acima de 120% efeito que pode ser atribuído a uma leve interferência da matriz para estes compostos (ERNEY et al., 1993; POLE, 2007). Os desvios padrões relativos das recuperações realizadas no tempo zero e sete dias após foram $\leq 15,4\%$ o qual mostra que o método é preciso e exato (EUROPEAN COMMISSION, 2012; INMETRO, 2010).

5.3.2 Análises das amostras

Foram analisadas 36 amostras, as quais onze apresentaram resíduos de pelo menos um dos seguintes agrotóxicos (tiametoxam, procloraz, azoxistrobina, tebuconazol e iprodiona) (Tabela 5.3); o LMR para o composto tiametoxam é de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$, sendo que os valores encontrados estão abaixo deste limite, o procloraz não é um composto autorizado para ser utilizado nesta cultura; quatro amostras

apresentam resíduos, e $0,011 \text{ mg kg}^{-1}$ foi o maior valor encontrado; o LMR para azoxistrobina é de $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ e os resíduos encontrados encontram-se abaixo deste valor; por outro lado o LMR para tebuconazol é de $0,1$, sendo que duas amostras contaminadas apresentam valores menores; para o composto iprodiona o LMR é de 2 mg kg^{-1} sendo que a amostra coletada no mês de maio apresentaram resíduos na ordem de $0,114 \text{ mg kg}^{-1}$ valor abaixo do LMR (ANVISA, 2012).

No Brasil o PARA no período de 2001 até 2010 reporta resíduos de agrotóxicos em morango (JARDIM; CALDAS, 2012), os valores mostrados na Tabela 5.3 estão abaixo dos LMRs estabelecidos, por outro lado quatro amostras correspondentes aos meses de fevereiro, abril, maio e outubro de 2011 apresentaram resíduos de procloraz, composto que não é permitido para ser aplicado nesta cultura, a maior quantidade encontrada no mês de abril foi de $0,011 \text{ mg kg}^{-1}$ (Figura 5.1).

Amostras de morango que deram positivas para resíduos de agrotóxicos foram reportadas por outros programas de monitoramento tais como em Bélgica AFSCA (2008) reporta 5,1% das amostras de morango analisadas com resíduos acima dos LMR estabelecidos pela comunidade europeia. Jardim e Caldas (2012) reportam que no Brasil os programas de monitoramento encontraram 393 amostras de morango contaminadas com agrotóxicos sendo que 39,6% apresentam resíduos de compostos não autorizados para esta cultura (procloraz, captan e endulfan), outros programas de monitoramentos de resíduos no mundo reportam amostras de morango contaminadas (GÓRALCZYK et al., 2009; EFSA, 2010; ZICARI et al., 2011; HJORTH et al., 2011).

Tabela 5.2 - Dados dos experimentos de validação

(continua)

COMPOSTO	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	EFEITO MATRIZ (%)	LQ mg kg ⁻¹	RECUPERAÇÕES % (n7)				REPETIÇÃO (n7)	
				0,01 (mg kg ⁻¹)	DPR %	0,1 (mg kg ⁻¹)	DPR %	0,02 (mg kg ⁻¹)	DPR %
acetamiprido	7,4	-20,3	0,002	106,6	6,8	103,4	4,2	104,9	3,6
aldicarbe	8,6	42,7	0,002	93,1	10,8	104,5	5,7	105,1	8,4
atrazina	10,3	9,7	0,003	115,4	2,6	110,2	3,7	105,3	2,9
azoxistrobina	11,9	-12,1	0,002	128,2	0,9	128,9	3,9	128,6	4,6
benalaxil	13,4	6,3	0,003	128,7	2,6	130,7	3,7	130	3,7
bromacila	8,8	4,6	0,006	120,4	5,2	102,8	3,6	116,1	4,1
bromuconazol	11,8	18,4	0,006	126,3	2,9	115,4	4,1	109,4	3,8
buprofezina	13,4	8,7	0,003	120,7	2,2	112,3	3,5	101	2,9
carbaril	10,2	4,8	0,002	116,4	2,5	111	4	111	5,6
carbofurano	9,9	-0,7	0,001	120,3	3,9	111,3	4	113,3	4,7
cimoxanil	8	0,1	0,003	118,9	4,8	102,9	3,7	101,1	3,1
ciproconazol	11,5	12,6	0,003	122,5	2,1	113,6	4	104,9	3,2
diflubenzurom	12,5	15,3	0,01	130,7	4,3	123,6	4,6	119,2	4,3
dimetoato	7,2	-4,1	0,002	107,4	7,3	101,3	5,1	107,6	6,3
diurom	10,5	10	0,003	120,1	1,7	113,6	3,7	104,5	3,9
fenamifos	11,8	2	0,003	126,9	3,8	117,7	4	101	2,7
fenarimol	11,8	13,1	0,002	117,2	5	113,8	3,6	108,5	5,4
fenoxicarb	12,6	20,7	0,003	127,1	3,9	127,9	2,7	117,8	4,5
fipronil	13,1	8,1	0,006	95,6	10,9	103,7	2,1	130,3	9
flazassulfurom	11	-37,9	0,001	125	4,8	121,4	4,4	130,8	5,5
imidacloprido	6,7	-46,3	0,003	90,3	14,3	91,3	15,4	109,7	7,8
iprodiona	12,6	21,6	0,002	119	4,6	119,8	3,1	109	7,3

Tabela 5.2 - Dados dos experimentos de validação

(conclusão)

COMPOSTO	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	EFEITO MATRIZ (%)	LQ mg kg ⁻¹	RECUPERAÇÕES % (n7)				REPETIÇÃO (n7)	
				0,01 (mg kg ⁻¹)	DPR %	0,1 (mg kg ⁻¹)	DPR %	0,02 (mg kg ⁻¹)	DPR %
linurom	11,8	9,6	0,003	122,2	4,6	111,5	3,9	107	4,2
malationa	12,6	4,7	0,004	128,9	3,7	123,1	3,1	116,8	4,6
metiocarbe	11,6	3,2	0,002	122	2,9	112,4	3,5	105	3,4
metribuzim	9,5	11,2	0,002	116,8	2,8	110,6	3,2	103,4	3,6
monurom	9	2,6	0,003	108,8	9,6	108,3	2,1	107,9	6,6
pirimetanil	9,5	0,8	0,002	119	3,8	103,8	3,9	99,2	4,7
pirimicarbe	4,1	6,1	0,002	114,2	3,4	111,3	3,8	100,7	3,4
pirimifos-metil	13,4	8,7	0,003	120,7	2,2	112,3	3,5	101	2,9
procloraz	11,2	6,3	0,003	116,3	1,7	108,5	3,3	105,8	2,5
prometrina	9,7	-1,4	0,003	118,8	2,6	108	4,3	104,4	3,8
tebuconazol	12,2	17,3	0,004	128,9	2,8	117	3,3	106,3	3
tiacloprido	8,5	4,3	0,002	106,4	2,6	119	3,2	113,4	2,8
triadimenol	11,2	9,2	0,002	122,7	2,3	111,6	3,7	104,6	4
triazofos	12,7	12,9	0,002	130,4	2,9	126	3,8	121,9	3,5

Tabela 5.3 - Data de coleta e resíduos de agrotóxicos encontrados nas amostras de morango analisadas

DATA DE COLETA	tiametoxam (mg kg ⁻¹)	procloraz (mg kg ⁻¹)	azoxistrobina (mg kg ⁻¹)	tebuconazol (mg kg ⁻¹)	iprodiona (mg kg ⁻¹)
15/10/2010	0,004	----	----	0,006	----
15/02/2011	----	----	----	----	0,033
15/02/2011	----	0,003	----	----	0,083
15/03/2011	----	----	0,011	----	----
15/04/2011	----	0,011	0,013	----	----
15/05/2011	----	0,005	----	----	0,114
15/05/2011	----	----	0,013	----	0,085
15/08/2011	----	----	----	----	----
15/08/2011	0,006	----	0,007	----	----
15/09/2011	----	----	----	0,007	----
15/09/2011	----	0,003	0,003	----	----

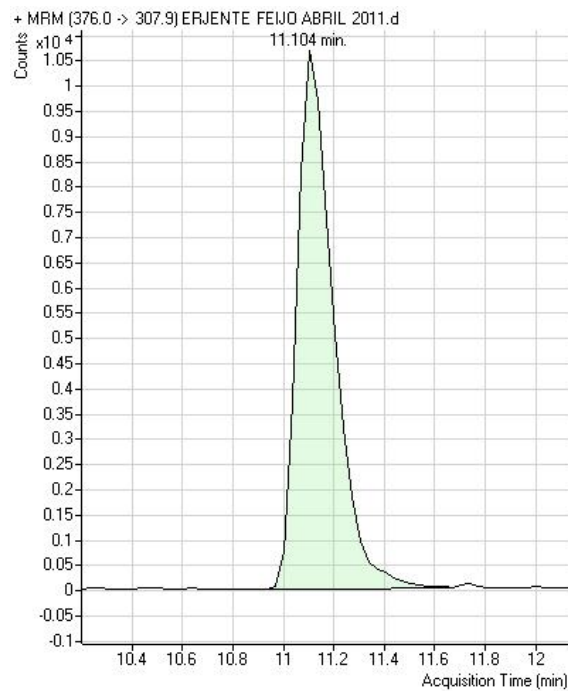


Figura 5.1 - Pico do composto procloraz que apresentou a maior contaminação da amostra coletada em 15/4/2011

5.4 Conclusões

Para a identificação e quantificação de resíduos de 36 agrotóxicos em morango o método QuEChERS foi validado para ser usado com um sistema LC-MS/MS e utilizado para análises direto de amostras de morango depois de uma seleção e otimização das melhores condições para este fim.

Os resultados obtidos indicam que este método é adequado e não apresenta efeito matriz significativo para a maioria dos compostos estudados.

Foi constatada a presença de resíduos de tiametoxam, azoxistrobina, tebuconazol e iprodiona em onze amostras analisadas; quantidades que estão abaixo dos LMRs estabelecidos e quatro amostras apresentaram resíduos de procloraz composto que não é permitido para seu uso em morango.

Referências

AGENCE FÉDÉRALE POUR LA SÉCURITÉ DE LA CHAÎNE ALIMENTAIRE. **Pesticide residue monitoring program in food of plant origin. Results of the official controls in accordance to regulation (CE) No 396/2005 and commission recommendation 2008/103/EC.** Belgium: Federal Agency for the Safety of the Food Chain. Disponível em: <http://www.favv.be/publications-en/_documents/2008_Belgium-summary.pdf>. Acesso em: 01 jan. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxicos e toxicologia:** programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. 2011. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia/>>. Acesso em: 05 maio 2011.

_____. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA:** limites máximos residuais, atualizado 17/05/2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>>. Acesso em: 05 jun. 2012.

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

AYSAL, P.; AMBRUS, A.; LEHOTAY, S.J.; CANNAVAN, A. Validation of an efficient method for the determination of pesticides residues in fruits and vegetables using ethyl acetate for extraction. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, New York, v. 42, n. 5, p. 481–490, 2007.

BRO-RASMUSSEN, F. Contamination by persistent chemicals in food chain and human health. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 188, n. 1, p. 45–60, 1996.

EUROPEAN COMMISSION 2012. Guidance **document on pesticide residue analytical methods**. SANCO/12495/2011. Madrid, 2011. p. 1-40.

ERNEY, D.R.; GILLESPIE, A.M.; GILVYDIS, D.M.J. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 638, n. 1, p. 57-63, 1993.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Annual report on pesticide residues. **EFSA Journal**, Rome, v. 8, n. 6, 1646-2010.

FACHINELLO, J.C.; PASA, M.S. de; SCHMTIZ, J.D.; BETEMPS, D.L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. esp. 1, p. 109-120, 2011.

FERNANDES, V.C.; DOMINGUES, V.F.; MATEUS, N.; DELERUE-MATOS, C. Organochlorine pesticide residues in strawberries from integrated pest management and organic farming. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 14, p. 7582–7591. 2011.

FERNANDEZ-ALBA, A.R. **Chromatographic-mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues, comprehensive analytical chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2004. v. 43.

GÓRALCZYK, K.; STRUCIŃSKI, P.; KORCZ, W.; CZAJA, K.; HERNIK, A.; SNOPCZYŃSKI, T.; LUDWICKI, JK. The survey of pesticide residues in food of plant origin in Poland, 2004-2007. **Rocz Panstw Zakl Hig**, Warszawa, v. 60, n. 2, p.113-119. 2009.

HJORTH, K.; JOHANSEN, K.; HOLEN, B.; ANDERSSON, A.; CHRISTENSEN, H.B.; SIIVINEN, K.; TOOME, M. Pesticide residues in fruits and vegetables from South America e a Nordic project. **Food Control**, Surrey, v. 22, n. 11, p. 1706, 2011.

HÚŠKOVÁ, R.; MATISOVÁ, E.; KIRCHNER, M. Fast GC–MS pesticide multiresidue analysis of apples. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 68, n.1, p. 49-55, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**: DOQ-CGCRE-008 – Revisão 03. 2010. 20 p. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 25 jan 2012.

JARDIM, A.N.O.; CALDAS, E.D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food - results from 2001 to 2010. **Food Control**, Surrey, v. 25, n. 2, p. 607-616, 2012.

LEHOTAY, S.J. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 90, n. 2, p. 485–520, 2007.

LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKÁ, K.; YUN, S.J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 88, n. 2, p. 630–638, 2005a.

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

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

LOOSER, N.; KOSTELAC, D.; SCHERBAUM, E.; ANASTASSIADES, M.; ZIPPER, H. Pesticide residues in strawberries sampled from the market of the Federal State of Baden-Württemberg in the period between 2002 and 2005. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherh**, Birkhäuser, v. 1, n. 2, p. 135–141, 2006.

MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S.J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1040, n. 2, p. 259–272, 2004.

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

NGUYEN, T.D.; LEE, B.S.; LEE, B.R.; LEE, D.M.; LEE, G.H. A multiresidue method for the determination of 109 pesticides in rice using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) sample preparation method and gas chromatography/mass spectrometry with temperature control and vacuum concentration. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 21, n. 18, p. 3115–3122, 2007.

POOLE, C.F.J. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1158, n. 1/2, p. 241–250, 2007.

REGULATION (EC) NO. 396/2005 of The European Parliament and of The Council of 23 February 2005 on Maximum Residue Levels of Pesticides in or on Food and Feed of Plant and Animal Origin and Amending Council Directive 91/414/EEC, Off. J. Eur. Communities L70/1, 16.3.2005. Disponível em: <http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm>. Acesso em: 29 out. 2011.

UNITED STATES. Department of Agriculture. **Foreign agricultural service:** maximum residue limit database. Disponível em: <www.fas.usda.gov/http/MRL.asp>. Acesso em: 24 out. 2011.

ZICARI, G.; SOARDO, V.; CERRATO, E.; RIVETTI, D. Results from the monitoring of pesticide residues in fruits and vegetables marketed in Piedmont (Italy), 2000-2008. **Ig Sanita Pubbl**, Rome, v. 67, n. 2, p. 149-168. 2011.

6 ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM QUINOA (*Chenopodium quinoa* Willd) USANDO O MÉTODO QuEChERS COM LC-MS/MS

Resumo

O método QuEChERS foi ajustado e validado para determinação de 46 agrotóxicos para seu uso em 37 amostras de quinoa provenientes da colheita 2010-2011 de Puno - Perú. O método envolve extração com acetonitrila 1% ácido acético com $MgSO_4$ e CH_3COONa anidro seguido de um *clean up* por dispersão da fase sólida (dSPE) com adsorvente PSA. As análises foram realizadas com um sistema de cromatografia líquida acoplado a um espectrômetro de massas LC-MS/MS utilizando uma coluna C-18 150 mm x 2,1 x 3,5 μm . Usou-se água (A) e acetonitrila (B) 0,1% ácido fórmico, respectivamente, como fase móvel. O método foi validado usando uma amostra de quinoa sem resíduos de agrotóxicos, usado como branco, fortificado a 0,01 e 0,1 $mg\ kg^{-1}$, as recuperações médias variaram entre 31,6 a 125,1% com $RSD\% \leq 23$. O método mostrou linearidade de $r^2 \geq 0,99$ e os LQ variaram entre 0,001 a 0,01 $mg\ kg^{-1}$. Os resultados obtidos indicam que o método é sensível e não existe efeito matriz; Pode-se concluir que o método QuEChERS utilizando LC-MS/MS é uma alternativa para determinar resíduos de pesticidas em quinoa; não foi constatada a presença de resíduos de agrotóxicos nas amostras analisadas.

Palavras-chave: Grãos Andinos; Multiresíduo; Validação; Cultivo Inca; Pesticidas

Abstract

The QuEChERS method was adjusted and validated for determination of 46 pesticides in 37 quinoa samples coming from the harvest 2010-2011 from Puno-Perú. The method involves extraction with acetonitrile with 1% acetic acid and $MgSO_4$ and CH_3COONa anhydrous followed by clean up by dispersing the solid phase (dSPE) with PSA adsorbent. Analyses were performed with a liquid chromatography system coupled to a mass spectrometer LC-MS/MS using a C-18 column 2.1 x 150 mm x 3.5 μm . Were used water (A) and acetonitrile (B) 0.1% formic acid respectively as a mobile phase. The method was validated using a quinoa sample without pesticides residues, used as a blank, fortified at 0.01 and 0.1 $mg\ kg^{-1}$, the recoveries ranged between 31.6 to 125.1% with $RSD \leq 23\%$. The method showed linearity of $r^2 \geq 0.99$ and the LQs ranged from 0.001 to 0.01 $mg\ kg^{-1}$. The results indicate that the method is sensitive and there is not a matrix effect; we can conclude that the QuEChERS method using LC-MS/MS is an alternative to determine pesticides residues in quinoa; there was not found pesticides residues on the analyzed samples.

Keywords: Andean grains; Multi-residue; Validation; Inca's crop; Pesticides

6.1 Introdução

A quinoa é uma importante cultura de grão, o qual é cultivado por mais de 5000 anos na região dos Andes, foi importante para os Incas por seu alto valor nutricional (GALWEY et al., 1990; REPO-CARRASCO; ESPINOZA; JACOBSEN, 2003; KUMPUN et al., 2011); o cultivo de quinoa recentemente está sendo introduzido em pequenas escalas em outros países (America do Sul, USA, Dinamarca, etc.); o interesse por esta cultura é devido a sua tolerância a solos pobres e com escassez de água. Por outro lado, a produtividade (0,4 até 2 ton ha⁻¹) é baixa em comparação com o trigo ou milho.

Os grãos de quinoa são considerados como um rico alimento, devido ao seu elevado teor protéico e a qualidade destas, possuindo aminoácidos essenciais e ausência de glúten (DINI; TENORE; DINI; 2002, 2005). No mundo três são os maiores produtores deste grão, o Perú se destaca com a maior quantidade de grãos produzidos (Figuras 6.1 e 6.2) alcançando uma média de 25892,684 toneladas durante o período de 1992-2010 (FAOSTAT, 2012).

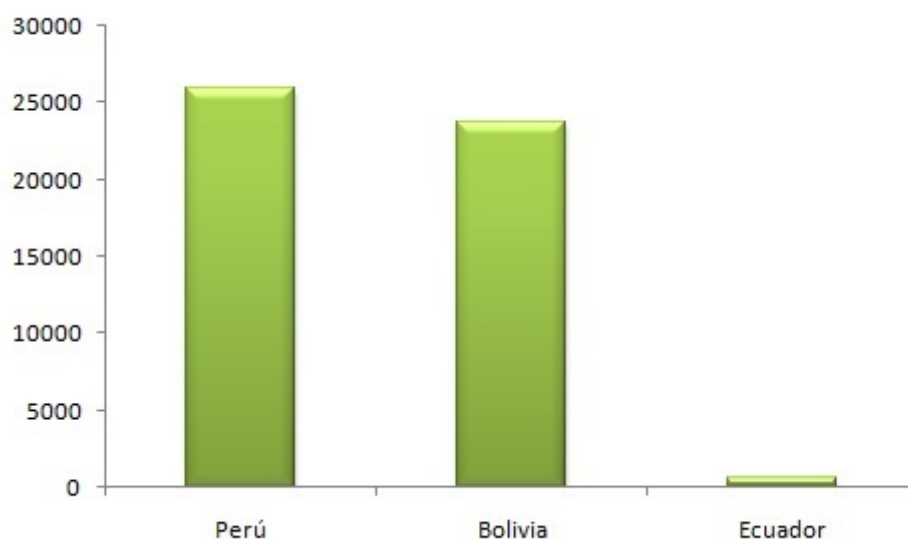


Figura 6.1 - Produção dos principais produtores mundiais de quinoa (média 1992-2010) expressado em toneladas

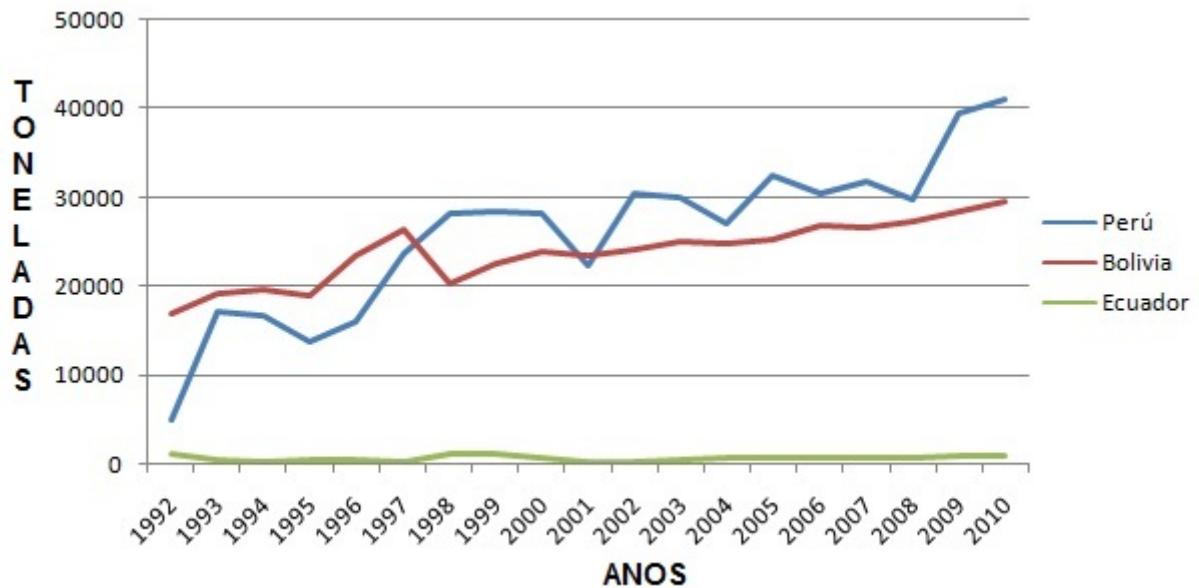


Figura 6.2 - Evolução da produção dos maiores produtores mundiais de quinoa desde o ano (1992-2010) expressado em toneladas

Centenas de agrotóxicos são utilizadas em práticas agrícolas no mundo, não é raro encontrar resíduos destes compostos em produtos alimentícios, especialmente em frutas e vegetais. Muitas autoridades de controle estabeleceram limites máximos residuais (LMRs) para proteger o ambiente e a saúde dos consumidores (REGULATION (EC) NO. 396/2005), a determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentares tornou-se uma exigência devido à toxicidade e estabilidade destes compostos (BRO-RASMUSSEM, 1996), a sua presença nos alimentos é um risco para a saúde humana; a União Européia desenvolveu uma serie de legislações que regulam a presença de agrotóxicos em alimentos (REGULATION (EC) NO. 396/2005).

Durante a última década, estudos têm sido realizados no Perú, relacionados ao uso e impacto de agrotóxicos no ambiente e na saúde humana. Em um desses estudos, a Rede de Ação sobre Alternativas ao Uso de Agrotóxicos (RAAA) concluíram que nos departamentos de Huancayo e San Martin, inseticidas e fungicidas são aplicados indiscriminadamente, o que levou ao aparecimento de novas pragas (GOMERO, 2003). Além disso, este estudo conclui que agrotóxicos alta e extremadamente tóxicos, baseados em compostos organofosforados e carbamatos são usados com freqüência, causando riscos para a saúde e o

ambiente. O estudo também demonstrou que, a maioria dos agricultores não toma medidas de proteção individuais por falta de conhecimento e informação.

O método de extração QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) introduzido por ANASTASSIADES et al.; (2003); está sendo aplicado em vários estudos no mundo para análises de resíduos em diferentes matrizes principalmente usado em sistemas cromatográficos acoplados a espectrometria de massas LC/MS/MS e GC/MS (LEHOTAY, 2004; LEHOTAY et al., 2005b; LEHOTAY; MASTOVSKÁ; YUN, 2005a; LOOSER et al., 2006; MASTOVSKÁ; NGUYEN et al., 2007, 2008; AYSAL et al., 2007; HÚŠKOVÁ; LEHOTAY, 2007; LESUEUR, et al., 2008; MATISOVÁ; KIRCHNER, 2008).

Na literatura científica não existem trabalhos relacionado à avaliação de resíduos de agrotóxicos em quinoa, com o que o objetivo deste trabalho foi ajustar e validar o método QuEChERS e análise por LC/MS/MS, para a determinação de agrotóxicos em 37 amostras de quinoa provenientes de Puno-Perú.

6.2 Material e métodos

6.2.1 Reagentes e materiais

Padrões analíticos dos compostos com mais de 98,9% de pureza foram obtidos de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) e ChemService (West Chester, PA, USA) (Tabela 6.3). Foram preparadas soluções estoque individuais em uma concentração de (1 mg mL⁻¹) em acetonitrila grau HPLC e armazenadas a -18 °C. As soluções de trabalho na diluição apropriada para seu uso foram preparadas em uma solução 80:20% (v/v) água acetonitrila 0,1% ácido acético. A acetonitrila foi de grau HPLC (J. T. Baker), o ácido acético P.A e o ácido fórmico 88% (T. Baker), CH₃COONa e MgSO₄ anidro (J.T Baker) e PSA (Varian), foram adequados para análises de resíduos. Uma amostra de quinoa proveniente do sistema de produção orgânica, sem resíduos de agrotóxicos, adquirida numa loja de produtos orgânicos na cidade de Piracicaba foi utilizada como branco para o processo de validação do método. Foram analisadas 37 amostras de quinoa, provenientes de oito distritos agrícolas de Puno-Perú. Todas as amostras pertenciam à colheita 2010-2011 (Tabela 6.1); três variedades e oito ecotipos deste grão andino foram coletadas no processo de amostragem (Tabela 6.2). Usou-se uma amostragem não-probabilística, tomando em consideração a importância da zona de produção; para o qual foi

coletado cinco sub amostras de um kilograma, foram homogeneizadas para coletar um kilograma representativo, a amostra foi processada em processador de alimentos, separada uma sub amostra de 200 g que foi destinada para análise.

Tabela 6.1 - Origem das amostras de quinoa e a sua respectiva quantidade de cada sistema de produção

Distritos	Sistema de produção			Total Amostra
	Orgânico	Transitório	Convencional	
Cabanilla	5	1	2	8
Cabanillas	3	1	--	4
Cabana	8	1	--	9
Mañazo	3	1	--	4
Vilque	6	--	--	6
Achaya	--	--	1	1
Juli	--	--	3	3
Puno	--	--	2	2
Total	25	4	8	37

Tabela 6.2 - Número de amostras por variedades e ecotipos de cada distrito

Características	Distritos	Total
Variedades	Salcedo INIA	17
	Pasankalla	4
	Rosada Taraco	6
Ecotipos	Misa quinua	1
	Negra Collana	1
	Chullpi anaranjado	1
	Cuchiwila	3
	Blanca de Juli	2
	Yurac quinua	1
	Amarga amarilla	1

6.2.2 Equipamento

Para a separação e identificação dos compostos foi utilizado um cromatógrafo líquido (Agilent 1200) com um sistema de ionização por electrospray acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (Agilent 6410), usou-se uma coluna analítica C-18 150 mm x 2,1 x 3,5 μm . Usou-se água (A) e acetonitrila (B) 0,1% ácido fórmico respectivamente como fase móvel. A programação da gradiente iniciou com 80% de A manteve-se constante por 10 minutos e mudou-se para 10% de A, depois de 15 minutos de corrida analítica foram deixados 10 minutos de “post run” usando a gradiente inicial de 80% de A, foi mantido um fluxo constante de 0,25 mL min^{-1} durante toda a corrida analítica; para o análises de espectrometria de massas o sistema de electrospray operou-se no modo positivo com 3500 V, gás nebulizador 43 psi; temperatura da fonte 350 °C. Nitrogênio foi utilizado como gás nebulizador e de colisão; a escolha dos íons, energias de colisão e fragmentação foram otimizadas para cada analito usando o software “mass hunter optimizer B.02.00”, a Tabela 6.3 mostra os valores das configurações instrumentais para cada um dos compostos analisados. Uma melhor sensibilidade foi obtida operando o sistema no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM), para a identificação dos compostos estudados duas transições foram escolhidas. Para a aquisição de dados e operação

do equipamento o software “Agilent masshunter data acquisition” foi utilizado; e para o processamento dos dados o software “Agilent Quantitative Analysis”.

Tabela 6.3 - Configurações analíticas usadas no espectrômetro de massas para os compostos monitorados (continua)

COMPOSTO	ÍON PRECURSOR	ÍON PRUDUTO	ENERGIA DE COLISÃO (1)	ÍON PRODUTO	ENERGIA DE COLISÃO (2)	ENERGIA DE FAGMENTAÇÃO
acetamiprido	223,1	126,0	20	99,0	39	90
aldicarbe	213,0	116,0	5	89,1	10	110
atrazina	216,1	174,0	16	104,0	32	120
azoxistrobina	404,1	372,0	8	344,1	24	100
benalaxil	326,2	294,1	4	148,1	16	100
bromacila	261,0	204,9	9	188,0	26	70
bromuconazol	376,0	158,9	24	89,0	104	130
buprofezina	306,2	201,0	8	116,0	12	90
carbaril	202,1	145,0	0	127,0	28	55
carbofurano	222,1	165,0	8	123,0	20	70
cimoxanil	199,1	128,0	0	83,0	12	50
ciproconazol	292,1	125,0	32	70,1	16	110
diflubenzurom	311,0	158,0	10	141,0	35	120
dimetoato	230,0	198,9	4	124,9	20	60
diurom	233,0	159,9	24	72,0	20	100
fenamifos	304,1	216,9	20	201,9	36	110
fenarimol	331,0	189,0	52	111,0	64	140
fenoxicarb	302,1	256,1	8	116,0	4	90
fipronil	437,0	368,2	13	314,9	25	130
flazassulfurom	408,1	182,0	12	139,0	40	110
imidacloprido	256,1	209,0	12	175,1	16	90
iprodiona	330,0	245,0	10	----	----	90

Tabela 6.3 - Configurações analíticas usadas no espectrômetro de massas para os compostos monitorados (conclusão)

COMPOSTO	ÍON PRECURSOR	ÍON PRUDUTO	ENERGIA DE COLISÃO (1)	ÍON PRODUTO	ENERGIA DE COLISÃO (2)	ENERGIA DE FAGMENTAÇÃO
linurom	249,0	159,9	12	132,9	36	100
malationa	331,1	284,9	0	127,0	8	70
metiocarbe	226,1	169,0	4	121,0	16	60
metaminofos	142,0	125,0	8	94,0	10	70
metribuzim	215,1	187,2	13	74,0	36	85
monocrotofos	224,1	193,0	0	127,0	12	60
monurom	199,1	126,0	24	99,0	40	85
oxamil	237,0	90,1	0	72,1	15	60
pirimetanil	200,1	181,1	47	107,0	21	150
pirimicarbe	239,1	182,1	12	72,0	20	90
pirimifos-metil	306,1	201,1	8	106,0	24	90
procloraz	376,0	307,9	4	70,0	24	85
prometrina	242,1	200,0	16	158,0	20	120
tebuconazol	308,2	125,0	40	70,0	16	120
tiacloprido	253,0	126,0	16	90,0	28	95
tiabendazol	202,0	175,0	24	131,0	36	140
triadimenol	296,1	227,0	1	70,1	5	60
triazofos	314,1	162,0	16	119,0	36	100

6.2.3 Preparo da amostra

O método QuEChERS foi desenvolvido para amostras vegetais com mais de 75% de umidade (ANASTASSIADES et al., 2003) estudos feitos por (DIEZ et al., 2006; PIZZUTTI et al., 2007; WALORCZYK, 2008; KOLBERG et al., 2011) adaptaram o método para ser usado em amostras com pouco conteúdo de umidade < 25% tais como os cereais, reduzindo a quantidade de amostra e aplicando água para facilitar a interação do solvente com os poros da amostra; 100 g de amostra de quinoa foram pesadas e adicionou-se 300 mL de água ultra pura e misturada para se obter uma pasta homogênea.

Foi utilizado acetonitrila 1% ácido acético como solvente para a extração com MgSO₄ e CH₃COONa anidro seguido de um **clean up** por dispersão da fase sólida (dSPE) com adsorvente PSA e C18; 15 g de amostra de quinoa previamente homogeneizada com água ultrapura foram pesadas em um tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL; foi adicionado 15 mL da acetonitrila 1% ácido acético, 6 g de

MgSO₄ e 1,5 g de CH₃COONa anidro. A amostra foi agitada manualmente por 1 min, e em seguida centrifugada a 5000 rpm por 5 min. Para o **clean-up**, uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de centrifuga de 2 mL contendo 50 mg de PSA, 50 mg de C18 e 150 mg de MgSO₄, agitada manualmente durante 30 segundos e centrifugada a 5000 rpm por 5 min; 500 µL deste extrato foi colocado em um *vial* de 1,5 mL, para depois injetar 2 µL no sistema LC-MS/MS para a análise.

6.2.4 Validação do método analítico

A validação do método analítico foi realizada seguindo os seguintes parâmetros: linearidade, limites de quantificação, precisão, exatidão e repetitividade (EUROPEAN COMMISSION, 2012; INMETRO, 2010). A linearidade foi determinada através da construção de curvas analíticas em diferentes concentrações 0,0025; 0,005; 0,010; 0,020; 0,040; 0,100 e 0,200 µg mL⁻¹. Dois tipos diferentes de curvas de calibração foram preparados por uma serie de diluições da solução estoque, uma em uma solução 80 - 20% água acetonitrila 0,1% ácido acético e outra no extrato da matriz quinoa. Este extrato foi obtido da extração da quinoa seguindo os procedimentos analíticos descritos (item 2.3).

A avaliação do efeito matriz foi estudada pela comparação dos valores da inclinação das duas curvas de calibração feitas na matriz e no solvente. Incremento do sinal ocorre se a porcentagem da diferença entra as inclinações é positivo, e se for negativo existe supressão do sinal analítico. Dependendo do valor destas porcentagens diferentes efeitos de matriz podem ser observados. Uma porcentagem entre -20% e 20% foi considerado como não existência de efeito matriz, por estes valores encontram-se próximos aos valores de repetibilidade. Um efeito de matriz médio ocorre quando os valores estão entre -50% e -20% ou 20% e 50%, e um efeito forte da matriz seriam abaixo de -50% ou acima de 50% (FERNANDEZ, 2004) a Tabela 6.3 mostra os valores de efeito matriz para cada composto estudado.

Os estudos de recuperação foram realizados fortificando 15 g de amostra de quinoa homogeneizada com água ultrapura, com a solução padrão dos pesticidas em dois níveis de fortificação (correspondentes aos LQs e 10 vezes estes valores). Os valores de recuperação foram estabelecidos para cada agrotóxico, com sete repetições para cada nível de fortificação. Depois da fortificação a amostra foi

deixada em repouso por uma hora e as amostras foram extraídas de acordo com o procedimento previamente descrito (item 2.3).

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Validação do método

O coeficiente de correlação para todos os agrotóxicos estudados foram $r^2 \geq 0,99$. Não foi observado efeito matriz significativo para a maioria dos compostos, com o que é comprovada a eficácia do “clean up” aplicado (LEHOTAY, et al 2005b); os tempos de retenção (TR), limites de quantificação (LQ) dos agrotóxicos analisados são mostrados na Tabela 6.4 conseguiu-se LQs na ordem de $0,001 \text{ mg kg}^{-1}$, sendo que não há LMRs estabelecidos para esta cultura.

Os experimentos de recuperações realizados na concentração de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ observa-se que 61% dos 42 compostos validados apresentam recuperações acima dos 70%, existem recuperações baixas $\geq 54,4\%$ para o composto benalaxil; no segundo nível de fortificação de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ observou-se que um 91% dos compostos apresentam recuperações $\geq 70\%$ e observou-se uma recuperação de 29,6% para tiabendazol efeito que pode ser atribuído a uma leve interferência da matriz para este compostos (ERNEY et al., 1993; POLE, 2007). A maioria dos valores estão dentro dos parâmetros estabelecidos pelo Brasil e a Comunidade Européia (INMETRO, 2010; EUROPEAN COMMISSION, 2012). Os desvios padrões relativos das recuperações realizadas no tempo zero e sete dias após foram $\leq 20,0\%$; No teste de repetibilidade observou-se um DPR de 30,4 e 23,0% para os compostos fipronil e diclorvor, valores acima de 29% podem ser observados em testes de recuperações com baixas concentrações. O qual mostra que o método é preciso e exato (EUROPEAN COMMISSION, 2012; INMETRO, 2010).

6.3.2 Análises das amostras

Foram analisadas 36 amostras de quinoa e não foram encontrados resíduos de agrotóxicos.

Tabela 6.4 - Resultados da fortificação dos agrotóxicos estudados, tempos de retenção (TR), limites de quantificação (LQ), recuperações e precisão DPR = Desvio padrão relativo

(continua)

COMPOSTO	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	EFEITO MATRIZ (%)	LQ mg kg ⁻¹	RECUPERAÇÕES % (n7)				REPETIÇÃO (n7)	
				0,01 mg kg ⁻¹	DPR %	0,1 mg kg ⁻¹	DPR %	0,01 mg kg ⁻¹	DPR %
acetamiprido	7,4	-5,6	0,002	80,5	9,5	79,3	3,3	84,4	7,2
aldicarbe	8,6	-4,1	0,002	112,5	15,0	125,1	3,0	97,1	17,3
atrazina	10,3	-1,4	0,003	93,7	6,6	95,7	4,4	97,7	5,9
azoxistrobina	11,9	-16,1	0,002	65,6	9,3	72,2	3,8	71,3	6,0
benalaxil	13,4	-3,7	0,003	54,4	11,5	77,6	3,0	59,4	8,5
bromacila	8,8	-1,8	0,004	76,8	12,5	71,4	2,4	75,6	8,1
bromuconazol	11,8	1,5	0,010	73,2	9,7	81,9	4,3	78,7	9,1
buprofezina	13,4	-1,2	0,003	81,9	8,8	89,6	2,8	84,1	7,0
carbaril	10,2	-3,6	0,002	77,0	9,6	75,0	4,1	79	7,5
carbofurano	9,9	-3,5	0,002	72,6	9,3	74,3	3,3	76,9	7,8
cimoxanil	8,0	-8,2	0,003	73,4	14,9	73,6	3,3	72,6	11,4
ciproconazol	11,5	-0,2	0,003	74,2	7,9	80,2	3,5	75,4	7,6
diclorvos	8,8	-4,5	0,002	58,1	14,9	71,1	6,1	56,1	23,0
diflubenzurom	12,5	6,7	0,010	55,9	12,1	89,7	6,6	52,7	17,6
dimetoato	7,2	-9,8	0,004	87,0	5,3	78,4	4,0	91,8	8,9
diurom	10,5	-2,9	0,003	63,7	8,7	72,3	2,1	64,9	6,5
fenamifos	11,8	-6,6	0,003	74,4	9,2	78,6	5,0	79,4	6,1
fenarimol	11,8	3	0,004	61,1	16,4	76,6	4,2	72,7	18,6
fenoxicarb	12,6	8,9	0,003	42,4	19,4	86,1	4,0	44,4	12,6
fipronil	13,1	-1,8	0,002	69	15,8	92,4	10,5	75,6	30,4
flazassulfurom	11,0	-11	0,001	47,3	11,7	64,8	3,7	45,1	7,1

Tabela 6.4 - Resultados da fortificação dos agrotóxicos estudados, tempos de retenção (TR), limites de quantificação (LQ), recuperações e precisão DPR = Desvio padrão relativo

(conclusão)

COMPOSTO	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	EFEITO MATRIZ (%)	LQ mg kg ⁻¹	RECUPERAÇÕES % (n7)				REPETIÇÃO (n7)	
				0,01 mg kg ⁻¹	DPR %	0,1 mg kg ⁻¹	DPR %	0,01 mg kg ⁻¹	DPR %
imidacloprido	6,7	-4,8	0,008	89,1	8,4	78,8	3,1	91,6	5,3
iprodiona	12,6	0,8	0,003	67,7	14,9	96	3,3	66,7	15,8
linurom	11,8	5,4	0,004	66,1	15,6	70,8	2,3	68,3	16,2
malationa	12,6	9,8	0,004	53,0	11,1	64,4	3,0	57	10,1
metamidos	1,9	-4,6	0,002	69,2	8,3	69,8	4,6	74,6	15,4
metiocarbe	11,6	-6,7	0,001	65,0	10,3	69,5	4,7	69,3	11,9
metribuzim	9,5	-3,9	0,002	83,5	3,7	94,5	2,7	85,8	9,0
monocrotofos	2,9	-1,2	0,001	79,3	11,9	87,7	4,5	89,4	10,6
monurom	9,0	-2,6	0,002	78,0	20,3	74,8	8,4	82,2	12,8
oxamil	3,0	-4,2	0,002	92,4	13,0	91,8	11,2	112,9	18,5
pirimetanil	9,5	5,4	0,002	83,9	12,1	84,5	3,5	87,2	5,7
pirimicarbe	4,1	-3,8	0,003	90,8	8,1	95,3	2,7	93,5	7,8
pirimifos-metil	13,4	-1,2	0,003	81,9	8,8	89,6	2,8	84,1	7,0
procloraz	11,2	6,2	0,003	77,9	8,3	85,6	3,8	81,5	7,7
prometrina	9,7	2,4	0,002	92,4	6,9	93,4	3,9	93,2	7,6
tebuconazol	12,2	7,7	0,003	72,2	11,2	86,9	5,6	76	10,2
tiabendazol	2,3	-1,2	0,002	31,6	7,7	29,6	2,3	31,7	7,1
tiacloprido	8,5	-2,4	0,002	62,6	14,2	80,9	2,7	65,7	9,9
tiametoxam	4,4	-3,9	0,002	80,0	9,4	83,5	4,3	84,9	10,2
triadimenol	11,2	-0,8	0,003	78,4	9,2	80,5	2,9	82,9	8,0
triazofos	12,7	-5,7	0,003	59,2	11,4	73,2	4,6	62,9	7,0

6.4 Conclusões

Neste trabalho, um método rápido e simples para a identificação de 42 agrotóxicos em quinoa foi validado. O mesmo foi usado em sistema LC-MS/MS para análise de resíduos de agrotóxicos em grãos de quinoa.

Os resultados obtidos indicaram que este método é sensível e não apresenta efeito matriz significativo para todos os compostos estudados.

Não foi evidenciada a presença de resíduos destes compostos nas amostras de quinoa analisados.

6.5 Sugestões

Realizar monitoramentos periódicos de resíduos de agrotóxicos para obter informação da quantidade de estes agrotóxicos em grão de quinoa.

Referências

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

ARICA, D.; KROSCHE, J.L.; FORBES, G.; SAINT PERE, K. **Persistent organic pollutants and hazardous pesticides in andean farming communities in Peru:** project implemented by The Internacional Potato Center (CIP) Funded by the Canada POPs Fund, World Bank, Lima, Peru. May 2006. Disponível em: <http://www.spipm.cgiar.org/c/document_library/get_file?p_l_id=17828&folderId=18430&name=DLFE-78.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2011.

AWASTHI, N.; AHUJA, R.; KUMAR, A. Factors influencing the degradation of soil applied endosulfan isomers. **Soil Biology & Biochemistry**, Amsterdam, v. 32, n. 11/12, p. 1697–1705. 2000.

AYSAL, P.; AMBRUS, A.; LEHOTAY, S.J.; CANNAVAN, A. Validation of an efficient method for the determination of pesticides residues in fruits and vegetables using ethyl acetate for extraction. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, New York, v. 42, n. 5, p. 481–490, 2007.

BRO-RASMUSSEN, F. Contamination by persistent chemicals in food chain and human health. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 188, n. 1, p. 45–60, 1996.

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

DINI, I.; TENORE, G.C.; DINI, A. Oleanane saponins in “kancolla”, a sweet variety of *Chenopodium quinoa*. **Journal of Natural Products**, Ohio, v. 65, n. 7, p. 1023–1026, 2002.

_____. Nutritional and antinutritional composition of Kancolla seeds: an interesting and underexploited andine food plant. **Food Chemistry**, Barking, v. 92, n. 1, p. 125–132, 2005.

EUROPEAN COMMISSION 2012. **Guidance document on pesticide residue analytical methods**. SANCO/12495/2011. p. 1-40.

FAO. **FAOSTAT**: statistical databases. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 25 mar. 2012.

FURLANI, R.P.Z.; MARCILIO, K.M.; LEME, F.M.; TFOUNI, S.A.V. Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection. **Food Chemistry**, Barking, v. 126, n. 3, p. 1283–1287, 2011.

GALWEY, N.W.; LEAKEY, C.L.A.; PRICE, K.R.; FENWICK, G.R. Chemical composition and nutritional characteristics of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*). **Food Sciences and Nutrition**, Basingstoke, v. 42F, n. 4, p. 245–261, 1990.

GOMERO, L. **Diagnostico de plaguicidas y salud en los corredores económicos de Jaen, Tarapoto y Huancayo**: estudio solicitado por CRS/CARITAS Perú. Lima, 2003. 100 p.

HÚŠKOVÁ, R.; MATISOVÁ, E.; KIRCHNER, M. Fast GC–MS pesticide multiresidue analysis of apples. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 68, n. 1, p. 49-55, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**: DOQ-CGCRE-008 – Revisão 03. 2010. 20 p. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 25 jan 2012.

KOLBERG, D.I.; PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC–MS. **Food Chemistry**, Barking, v. 125, n. 4, p. 1436–1442, 2011.

KUMPUN, S.; MARIA, A.; CROUZET, S.; EVRARD-TODESCHI, N.; GIRAULT, J.; LAFONT, R. Ecdysteroids from *Chenopodium quinoa Willd.*, an ancient Andean crop of high nutritional value. **Food Chemistry**, Barking, v. 125, n. 4, p. 1226–1234, 2011.

LEHOTAY, S.J. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 90, n. 2, p. 485–520, 2007.

LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKÁ, K.; YUN, S.J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 88, n. 2, p. 630–638, 2005a.

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

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

LOOSER, N.; KOSTELAC, D.; SCHERBAUM, E.; ANASTASSIADES, M.; ZIPPER, H. Pesticide residues in strawberries sampled from the market of the Federal State of Baden-Württemberg in the period between 2002 and 2005. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, Birkhäuser, v. 1, n. 2, p. 135–141, 2006.

MARTENS, R. Degradation of (8–9 14C) endosulfan by soil microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 31, n. 6, p. 853–858. 1976.

MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S.J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1040, n. 2, p. 259–272, 2004.

MILES, J.R.W.; MOY, P. Degradation of endosulfan and its metabolites by a mixed culture of soil microorganisms. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 23, n. 1, p. 13–19. 1979.

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

NGUYEN, T.D.; LEE, B.S.; LEE, B.R.; LEE, D.M.; LEE, G.H. A multiresidue method for the determination of 109 pesticides in rice using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) sample preparation method and gas chromatography/mass spectrometry with temperature control and vacuum concentration. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 21, n. 18, p. 3115–3122, 2007.

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

PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE. **Evaluación regional sobre sustancias tóxicas persistentes**: informe regional de Sudamérica oriental y occidental. Ginebra Suiza, 2002. 79 p.

RAO, D.M.R.; MURTHY, A.S. Persistence of endosulfan in soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, n. 6, p. 1099–1101, 1980.

REGULATION (EC) NO. 396/2005 of The European Parliament and of The Council of 23 February 2005 on Maximum Residue Levels of Pesticides in or on Food and Feed of Plant and Animal Origin and Amending Council Directive 91/414/EEC, Off. J. Eur. Communities L70/1, 16.3.2005. Disponível em: <http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm>. Acesso em: 29 out. 2011.

REPO-CARRASCO, R.; ESPINOZA, C.; JACOBSEN, S.E. Nutritional value and use of the andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). **Food Reviews International**, Philadelphia, v. 19, n. 1/2, p. 179–189, 2003.

SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGRARIA. **Plaguicidas restringidos y prohibidos en el Perú**. Disponível em: <http://www.senasa.gob.pe/0/modulos/JER/JER_Interna.aspx?ARE=0&PFL=3&JE=193>. Acesso em: 20 maio 2012.

SZOKOLAY, A.; ROSIVAL, J.U.; MADARIC, A. Dynamics of benzene hexachloride (BHC) isomers and other chlorinated pesticides in the food chain and in human fat. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 1, n. 3, p. 349-359, 1977

UNITED STATES. Department of Agriculture. **Foreign agricultural service**: maximum residue limit database. Disponível em: <www.fas.usda.gov/http/MRL.asp>. Acesso em: 24 out. 2011.

WALORCZYK, S. Development of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry II. Improvement and extension to new analytes. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1208, n. 1/2, p. 202–214, 2008.

XUE, J.; HAO, L.; PENG, F. Residues of 18 organochlorine pesticides in 30 traditional Chinese medicines. **Chemosphere**, Oxford, v. 71, n. 6, p. 1051-1055, 2007.

YAVUZ, H.; GULER, G. O.; AKTUMSEK, A.; CAKMAK, Y. S.; OZPARLAK, H. Determination of some organochlorine pesticide residues in honeys from Konya, Turkey. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 168, n. 1/4, p. 277-283, 2010.