



Técnicas de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal: uma revisão

Ana Paula Gasques Meira¹

O objetivo deste artigo foi realizar a revisão bibliográfica dos principais métodos de análise de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal. A importância dos métodos de análise de agrotóxicos neste tipo de alimento se dá em decorrência da ampla utilização desses produtos na produção de alimentos e do considerável consumo dos alimentos de origem vegetal. A exposição dos indivíduos aos agrotóxicos de forma aguda ou crônica pode ocasionar diversos tipos de agravos à saúde. Há, portanto, a necessidade de métodos de análise cada vez mais rápidos, de baixo custo, que utilizem menores quantidades de solventes e em contrapartida, que apresentem resultados precisos e englobem o maior número de compostos possível em uma única análise. Observou-se que os métodos de análise de agrotóxicos evoluíram significativamente e atualmente os métodos mais usuais e que conferem bons resultados são os métodos *QuEChERS* (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) para tratamento da amostra e a cromatografia líquida ou gasosa, acopladas ao espectrômetro de massas em série para separação, identificação e quantificação. As maiores dificuldades apontadas nos estudos analisados referem-se à complexidade da matriz analisada, as diferenças físico-químicas dos compostos a serem examinados e o alcance da sensibilidade metodológica.

Palavras-chave: Agrotóxicos, Análise, Multirresíduo, Resíduo.

Techniques of analysis for pesticide residue in plant foods: a review

The purpose of this article was to conduct a literature review of the main pesticide analysis methods in plant foods. The importance of pesticide analysis methods in this type of food occurs due to the extensive use of these products in food production and the considerable consumption of plant foods. Population exposure to pesticides of acute or chronic form can cause a variety of health problems. Therefore, there is the necessity for analysis methods increasingly faster, of low cost, using lower amounts of solvents, on the other hand, that present accurate results and involving the largest possible number of compounds in a single analysis. It was observed that pesticide analysis methods have evolved significantly and nowadays the most usual methods and which give good results are *QuEChERS* method (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) for treatment of the sample and liquid or gas chromatography, coupled to a mass spectrometer series for separation, identification and quantification. The head difficulties identified in the studies analyzed refers to the complexity of the analyzed matrix, the physicochemical differences of the compounds to be examined and the scope of methodological sensitivity.

Key-words: Pesticides, Analysis, Multiresidue, Residue.

¹ Nutricionista. Discente do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (mestrado) da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ, Universidade de São Paulo. Correspondência: Rua Fortunata De Pareschi Demarchi, 130, Jardim Alcides Modenez, Itacemópolis, SP, CEP. 13495-000. Tel (19) 998314297. E-mail: anapuava@gmail.com.

INTRODUÇÃO

O uso intenso de agrotóxicos está relacionado ao modelo de produção agrícola convencional, onde predominam as monoculturas dependentes desse tipo de defensivo químico no combate as pragas, justificando seu uso principalmente pela garantia de suprimento alimentar mundial. O Brasil lidera a lista de países que mais utilizam este tipo de insumo^[1].

Alguns estudos apontam que os agrotóxicos podem ocasionar intoxicações agudas e/ou crônicas nos seres humanos, além da contaminação ambiental. A ingestão crônica de agrotóxicos está relacionada a diversos tipos de agravos a saúde, entre eles, alguns tipos de câncer, malformações congênitas, distúrbios endócrinos, neurológicos e mentais, imunodepressão, mal de Parkinson, infertilidade, enquanto que a intoxicação aguda associa-se predominantemente à exposição do trabalhador rural aos agrotóxicos, podendo ocasionar sintomas como náuseas, dores de cabeça, entre outros. Apesar das evidências já disponíveis dos danos à saúde, a maioria dos estudos existentes ainda ocorre em animais *in vitro* e que analisam a exposição a um único ingrediente ativo, cuja situação geralmente não ocorre no cotidiano das pessoas, que ingerem mais de um ingrediente ativo em apenas um tipo de alimento, havendo, portanto, poucos dados sobre os efeitos da exposição múltipla a baixas doses^[1].

Diante desse cenário, a análise de resíduos de agrotóxicos apresenta-se relevante, podendo ser utilizada nos programas de fiscalização do governo e pesquisas acadêmicas, visando a proteção da saúde e do meio ambiente.

Resíduo de pesticida e Limite Máximo de Resíduos são definidos respectivamente, como:

Substância ou mistura de substâncias remanescente ou existente em alimentos ou no meio ambiente decorrente do uso ou da presença de agrotóxicos e afins, inclusive, quaisquer derivados específicos, tais como produtos de conversão e de degradação, metabólitos, produtos de reação e impurezas, consideradas toxicológica e ambientalmente importantes^{[2](p.2)}.

É a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico ou afim oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expressa em partes (em peso do agrotóxico e afim ou seus resíduos por milhão de partes de alimento ppm ou mg/kg)^{[2](p.1)}.

Conforme definição, o nível de resíduos de um pesticida no alimento não deve ultrapassar o LMR (Limite Máximo de Resíduo) na medida em que o produtor segue todas as indicações contidas no rótulo dos produtos e as Boas Práticas Agrícolas (BPA) e, ao menos em princípio, o consumo de alimentos contendo resíduos de pesticidas até o LMR não deve significar um risco para a saúde humana, porém não deve ser considerado como uma forma de proteção à saúde humana^[3,4].

Ainda há escassez de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos no Brasil e são poucos os laboratórios que publicam resultados de suas análises, sendo os principais programas nacionais de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)^[3].

Também há poucos dados sobre intoxicações por agrotóxicos, devido o fato do país não possuir um sistema adequado de registro, capaz de identificar especificamente os agrotóxicos envolvidos nos casos de intoxicações agudas e crônicas^[5].

O presente trabalho teve como objetivo realizar revisão de literatura sobre as técnicas de análise de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal e desse modo, comparar os métodos de análise propostos, identificando aquele com maior grau de otimização. Objetivou ainda verificar os fatores que influenciam nos métodos de análise de agrotóxicos e pontuar as principais dificuldades no processo de escolha da técnica de análise.

TÉCNICAS DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS DE ORIGEM VEGETAL

No processo de escolha por um método analítico mais conveniente para a análise a que se propõe fazer é importante considerar fatores como: presença de matrizes complexas, visto que os alimentos possuem teores variáveis de lipídeos, carboidratos, proteínas, pigmentos e umidade, o que exige muitas vezes, múltiplas etapas de purificação da amostra; a exigência de alta sensibilidade, ou seja, a necessidade de se isolar e medir exatamente quantidades muito pequenas dos compostos (resíduos de agrotóxicos), o que acarreta no uso de solventes e reagentes com alto grau de pureza, bem como cuidados especiais na descontaminação do material utilizado; a definição do resíduo a ser determinado, que pode ser o próprio composto ou o composto mais os seus metabólitos específicos; a diversidade de propriedades físico-químicas dos agrotóxicos. Em geral, a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos engloba as seguintes etapas: tratamento da amostra, que tem por finalidade isolar os compostos de interesse e a determinação dos analitos, que inclui a identificação e a quantificação dos agrotóxicos [6].

Tratamento da amostra

Esta etapa objetiva o isolamento de substâncias químicas específicas, no caso, os agrotóxicos. Muitas vezes a adaptação de metodologia é necessária conforme apareçam incompatibilidades da amostra e/ou dos analitos. Segundo Lichon^[7] o tratamento da amostra é considerado complexo e envolve etapas como:

- Amostragem: obtenção da amostra para o laboratório;
- Homogeneização da amostra: obtenção de pequenas porções-testes (alíquotas) para serem analisadas;
- Tratamento da amostra propriamente dito: inclui pesagem, diluição, concentração, hidrólise, separação, extração, purificação e derivação.

Para Lichon^[7] apesar destas etapas auxiliarem na exatidão da análise, também podem ser responsáveis por inserção de erros, os quais podem ser reduzidos ou quantificados por meio da constante observação em todas as suas fases, replicação das análises, testes de recuperação, uso de

materiais de referência e emprego de padrões interno e/ou externo.

Em se tratando de resíduos, que são amostragens pequenas e que sofrem influência de diversos fatores, a obtenção da amostra e a sua correta homogeneização são partes imprescindíveis para o sucesso da análise e estão relacionadas aos conceitos de validade e representatividade, respectivamente. Deste modo, a amostra é considerada válida quando selecionada de maneira a assegurar que cada unidade do material tenha a mesma probabilidade de ser analisada, e representativa quando apresenta um tamanho e uma composição que permita que todos os procedimentos sejam efetivamente realizados^[6,8].

A complexidade da composição dos alimentos ocasiona dificuldades para a determinação dos agrotóxicos, tornando necessária a etapa de *clean-up* (limpeza) do extrato, após extração com solvente. É nesta etapa que os interferentes são eliminados ou reduzidos, bem como o efeito matriz, além de diminuir a necessidade de manutenção técnica do sistema cromatográfico^[9,10].

O destaque é dado para as técnicas miniaturizadas de preparo de amostra, pois não necessitam de grandes quantidades de amostra e ao mesmo tempo utilizam menor volume de solvente, quando comparadas aos métodos convencionais^[11,12].

As técnicas mais utilizadas no tratamento da amostra são baseadas em processos físicos, extrações por solventes orgânicos, sólido-líquido, com fluido supercrítico, assistida por microondas, por líquido pressurizado, ultrassônica, técnica de derivação química e microextrações.

A técnica por processos físicos abrange a destilação por arraste a vapor e a destilação por arraste a gás. A destilação a vapor é aquela em que ocorre a destilação de uma mistura heterogênea, onde as substâncias não são solúveis entre si e os compostos razoavelmente voláteis e de peso molecular relativamente baixo são arrastados com o vapor e isolados de forma mais efetiva. Para o fracionamento dos constituintes da amostra esta técnica pode auxiliar na recuperação desses constituintes, porém apenas se estiver combinada com extrações por meio de solventes orgânicos ou em fases sólidas^[13,6].

A destilação por arraste a gás é indicada para isolar resíduos de agrotóxicos de amostras gordurosas, feita através da passagem de um gás carreador pela amostra e altas temperaturas que dispersam a gordura, facilitando a liberação dos componentes mais voláteis, os quais serão coletados numa fase sólida que deve ser eluída com solvente orgânico fornecendo um extrato livre de lipídeos e tornando-se adequado para ser injetado diretamente no cromatógrafo^[6].

Técnicas de extração por solventes orgânicos podem ser feitas de duas maneiras, a descontínua, através da obtenção do equilíbrio entre duas fases imiscíveis, que tem como exemplo mais comum a partição líquido-líquido, e apesar de simples, recebe especial atenção no que se refere à formação de emulsões (devido a presença de proteínas e/ou carboidratos hidrossolúveis), contaminação dos solventes e vidrarias e perdas devido a adsorções; e a contínua, na qual o equilíbrio não é necessariamente alcançado, representada por extratores do tipo *Soxhlet*^[6].

A eficiência destes tipos de extrações irá depender da afinidade do soluto pelo solvente, da relação entre volumes do solvente e da amostra e do número de extrações^[6].

Os métodos de extração líquido-líquido e por *Soxhlet* exigem uma grande quantidade de amostra, solventes e solventes orgânicos de alta qualidade, além de muita manipulação dos extratos. São considerados métodos caros, em termos de tempo e de consumo de material^[14].

A extração sólido-líquido é um procedimento geralmente adotado como técnicas de separação e purificação de amostras complexas, e na concentração de amostras de água. Empregam colunas contendo fases sólidas e são técnicas que se baseiam nas diferenças de polaridade, tamanho molecular, ou capacidade de troca iônica entre analito(s), interferentes e/ou fase sólida. Estas técnicas têm como vantagens a redução no tempo de análise, economia de solventes, processos mais simples, possibilidade de automatização^[6].

A técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) é bastante utilizada para extração de agrotóxicos de matrizes complexas e oferece bons resultados. É uma metodologia considerada simples e eficiente, baixo consumo de solventes, além de reduzir etapas de evaporação e troca de solventes (*clean-up*)^[15].

O método inclui as etapas: colocar a amostra líquida ou sólida em contato com um solvente extrator, miscível em água, menos denso que a água e que se mantenha líquido a -20 °C (acetonitrila, acetato de etila, metanol e acetona, por exemplo); agitar a amostra com o solvente e levar ao freezer por um período mínimo de seis horas; filtrar a parte superior (solvente e agrotóxicos extraídos) utilizando sulfato de sódio anidro para eliminar possível presença de água; analisar a amostra por cromatografia^[15].

A técnica de extração com fluido supercrítico geralmente é utilizada em métodos combinados onde um micro-extrator é acoplado diretamente a cromatógrafos a gás, a líquido de alta eficiência ou a líquido supercrítico. Geralmente o fluido supercrítico empregado é o dióxido de carbono, óxido nítrico e hexafluoreto de enxofre. As principais vantagens deste método sobre as extrações com líquidos é a maior velocidade de extração dos solutos (a baixa viscosidade e ausência de tensão superficial dos fluidos supercríticos facilita a passagem do solvente nos interstícios da amostra) sem os problemas de contaminação associados ao uso de grandes volumes de solventes^[6].

Há ainda técnica de Extração Assistida por Microondas (*Microwave-Assisted Extraction* - MAE)^[16], na qual a amostra é imersa num frasco aberto ou fechado contendo solvente e é irradiada com microondas. A principal limitação da técnica é o uso de solventes que absorvam energia de microondas, pois solventes não polares não absorvem essa energia^[17,18].

A Extração por Líquido Pressurizado (*Pressurised Liquid Extraction* - PLE)^[19,20], que também pode ser chamada de Extração Acelerada por Solvente (*Accelerated Solvent Extraction* - ASE), é aquela na qual a amostra e solvente são aquecidos e submetidos a alta pressão em uma cela fechada. Com a pressão e temperatura elevadas, muda a viscosidade do solvente, aumentando a extração dos analitos. É uma técnica de extração rápida e que reduz consideravelmente a quantidade de solvente, e por meio da otimização de alguns parâmetros como temperatura, pressão e polaridade do solvente é possível obter boas recuperações. A desvantagem incide no fato de diferentes propriedades físico-químicas dos analitos dificultarem o emprego em análises multirresíduo^[18,21-23].

Na Extração Ultrassônica (*Ultrasonic Extraction* - USE), a amostra com solvente é submetida ao banho com ultrassom e tem sido associada a outras técnicas como a MSPD. A Dispersão da Matriz em Fase Sólida (*Matrix Solid Phase Dispersion* - MSPD) envolve a mistura da amostra (viscosa, sólida ou semissólida) com um sorvente, há a transferência da mistura para um cartucho e uma etapa de eluição com um solvente adequado^[18,24-27].

A técnica de derivação química é considerada como tratamento da amostra por ser realizada para adaptar as propriedades do composto ao sistema de detecção e é utilizada normalmente quando a detecção é feita por cromatografia a gás. Este tipo de técnica melhora as propriedades cromatográficas (aumenta a volatilidade e aumenta a sensibilidade ou seletividade de detecção)^[6].

As microextrações ou técnicas de preparo de amostra miniaturizadas são cada vez mais valorizadas para análises de resíduos de agrotóxicos e têm como principais exemplos a microextração em fase sólida (SPME), a extração sortiva em barra de agitação (SBSE) e a microextração por sorvente empacotado (MEPS)^[11].

A técnica MEPS pode ser considerada uma miniaturização da SPE, por necessitar de menores quantidades de amostra, solvente de eluição e material sorvente (1-10mg), além de permitir a realização de vários ciclos de aspiração, lavagem e de eluição da amostra. Esta técnica ainda é pouco utilizada na determinação de resíduos de agrotóxicos. No desenvolvimento da técnica é aconselhável avaliar as seguintes variáveis: pH, força iônica, solvente de eluição (dessorção) e seu volume, além do número de ciclos de aspiração, lavagem e eluição da amostra^[11].

Os solventes utilizados no método de MEPS podem ser os mesmos da SPE (*Solid-Phase Extraction*) convencional, como sílica com a superfície modificada (C2, C8, C18), trocadores iônicos, copolímeros e polímeros molecularmente impressos (MIP) e materiais de acesso restrito, além do grafeno^[11].

Outro método bastante utilizado, considerado uma técnica multirresíduos é o *QuEChERS* (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). Publicado em 2003 pelos pesquisadores Anastassiades et al.^[28], é do tipo Dispersão de Matriz em Fase Sólida (*Matrix Solid-Phase Dispersion* - MSPD) e foi elaborado com o objetivo de superar limitações práticas dos métodos multirresíduos de extração, apresentando vantagens

como rapidez, facilidade de aplicação, economia, efetividade, robustez e segurança, podendo ser aplicado em qualquer laboratório^[29]. O método utiliza pequena quantidade de amostra e de solvente^[30].

Este método surgiu para gerar extratos que pudessem ser analisados por cromatografia líquida e/ou cromatografia gasosa, acopladas a espectrometria de massas em série (GC-MS/MS e LC-MS/MS)^[10,28].

O método original consiste na extração de 10 gramas de amostra, adicionando-se 10 mL de acetonitrila e agitando-se por 1 minuto. Em seguida adiciona-se uma mistura de 4 gramas de sulfato de magnésio e 1 grama de cloreto de sódio (partição), agita-se novamente por 1 minuto. Na etapa posterior, para 1 mL de extrato é adicionado 150 mg de sulfato de magnésio e 25 mg de sorvente. Agita-se por 30 segundos e centrifuga-se novamente^[28,30].

A escolha de acetonitrila como solvente permite a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra, por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos^[31]. A acetonitrila permite a extração de uma ampla faixa de pesticidas com diferentes polaridades e, quando acidificada, permite excelentes recuperações de pesticidas que geralmente apresentam problemas de estabilidade. Apresenta como vantagem ainda o fato de ser mais adequada para LC-MS/MS do que acetona e acetato de etila e pode ser utilizada também na análise por GC-MS/MS^[10,28,32].

Outra vantagem não menos importante é que o procedimento de agitação manual ou com Vortex possibilita a realização da extração a campo, diferente da agitação mecânica^[10].

O MgSO₄ foi escolhido devido a sua maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais e também em decorrência de sua hidratação ser exotérmica, resultando em aquecimento entre 40 °C e 45 °C da amostra durante as etapas de extração/partição, o que facilita a extração, principalmente dos compostos apolares^[10,28].

O método *QuEChERS* foi desenvolvido para análise de resíduos de pesticidas em matrizes com baixo teor de gordura, porém alterações na metodologia original podem ser realizadas de maneira a permitir análises em matrizes com elevado teor de gordura, bem como de pigmentos,

carotenóides e clorofila^[33-35]. Nestes casos podem ser utilizados na etapa de limpeza o carbono grafítico (eficiente na remoção de pigmentos) e o C18 (remove interferentes não polares). O tamanho de partícula do sorvente C18 mais utilizado é o de 40 µm^[18].

O *clean-up* feito no método *QuEChERS* - extração em fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid-Phase Extraction* - d-SPE) permite que a limpeza de interferentes e a redução de água residual sejam efetuados de forma rápida e simultânea. Deste modo, ocorre a remoção de água, que proporciona um extrato final de menor polaridade, o que facilita a precipitação de co-extrativos ou interferentes polares e permite a injeção direta do extrato final nos equipamentos de CG ou CL^[10,36]. Dependendo da composição da amostra, pode-se optar por sorventes com características diferentes ou misturas desses, como amina primária secundária (*Primary Secondary Amine* - PSA) ou propiltilenodiamina, carbono grafítico (*Grafitized Carbon Black* - GCB), octadecilsiloxano (C18), entre outros^[37].

O sorvente PSA possui uma estrutura bidentada, o que conduz a um elevado efeito quelante, resultando na retenção de ácidos graxos livres e de outros compostos polares presentes na matriz^[10].

No estudo de Moura Andrade^[38] foi realizada a análise multirresíduos de pesticidas em tomates por meio da técnica LC-MS/MS. Foram selecionados 61 pesticidas de diferentes classes químicas que são frequentemente investigados em programas de monitorização. Além da otimização do espectrômetro de massas, o acoplamento ao sistema cromatográfico foi efetuado para a otimização da separação cromatográfica e em decorrência da seletividade do detector, foi necessário apenas otimizar um gradiente que garantisse uma maior detectabilidade dos pesticidas analisados e possibilitasse que o equilíbrio da coluna fosse restabelecido entre injeções consecutivas, para que os tempos de retenção fossem reprodutíveis. Colunas recheadas com partículas menores de 2 µm foram utilizadas, o que permite expressiva eficiência de separação dos analitos, e ainda, a vazão foi otimizada para 0,35 mL min⁻¹ e volume de injeção de 2 µL. O método de preparação da amostra utilizado foi o *QuEChERS*.

Os resultados apontaram que dos 61 pesticidas inicialmente estudados utilizando método de preparação de amostras *QuEChERS*, 57

apresentaram fragmentação adequada, dos quais 11 não apresentaram valores de recuperações e coeficiente de variação conforme o recomendado. O método pode ser considerado linear, seletivo, preciso e exato para 46 pesticidas^[38].

Em outro estudo de Ivanoff^[30] o autor teve como objetivo geral avaliar a viabilidade de utilizar o método *QuEChERS* no LACEN (Laboratório Central de Saúde Pública – RS) para análise de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros. O desenvolvimento nos últimos anos de agrotóxicos polares tornou necessária a criação de novas metodologias de análise de agrotóxicos, visto que, a maioria desses novos compostos não apresentam uma boa resposta quando analisados por cromatografia à gás (GC)^[36]. O método adotado pelo LACEN utiliza a GC para separação, identificação e quantificação e o método de *Van Zoonen* para preparo da amostra.

O estudo comparou o método *QuEChERS* com o de *Van Zoonen*. O método *QuEChERS* inclui processo de limpeza (*clean-up*) e utiliza um volume pequeno de solventes e um padrão interno, enquanto que o método *Van Zoonen* não utiliza procedimento de limpeza, porém faz uso de volume maior de solventes, além de não contar com padrão interno^[30].

O estudo apontou também que o método *QuEChERS* se destaca no que se refere aos parâmetros como: limite de detecção, recuperação e influência do efeito da matriz e pode ser utilizado para GC e LC, porém com desempenho melhor quando é usado em LC. Destaca-se ainda, quando comparado ao *Van Zoonen*, tempo de análise menor, calculado em 60 minutos de tempo ganho, além da ampla aplicabilidade^[30].

Determinação do analito

A escolha pela técnica utilizada na detecção dos agrotóxicos no alimento de origem vegetal dependerá de alguns fatores, por exemplo, a estrutura química do composto a ser analisado e a finalidade da análise (sensibilidade e especificidade). As técnicas cromatográficas são as preferidas para a detecção de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Os métodos de análise que utilizam técnicas espectrofotométricas e imunológicas também podem ser adotados, porém apresentam baixa especificidade, fato que os tornam pouco utilizados^[6].

A cromatografia é uma metodologia que objetiva a separação de componentes presentes em uma amostra, pela distribuição entre fase estacionária (FE) e uma fase móvel (FM), conforme as propriedades físico-químicas^[39].

Nas análises multirresíduos de agrotóxicos em alimentos, ou seja, análises de amostras que possuem uma mistura de vários componentes em uma matriz complexa, utilizam-se para detecção dos resíduos de agrotóxicos tradicionalmente a cromatografia gasosa ou a cromatografia líquida^[29,40].

A cromatografia em fase gasosa (CG) combina velocidade, resolução e sensibilidade^[6]. Consiste no emprego de FM (fase móvel) gasosa, que transporta os componentes da mistura através FE (fase estacionária) líquida ou sólida. Os componentes da mistura devem ser termostáveis, voláteis, dissolver-se na FM e apresentar temperatura de ebulição de até 300 °C^[41].

A fase estacionária é “empacotada” em uma coluna de metal ou de vidro, colocada dentro do forno do cromatógrafo, onde a temperatura é termostaticamente controlada. Por meio da passagem dos componentes volatilizados pela coluna é que acontece a partição entre a fase estacionária e a móvel (gás). A partir da eluição dos componentes, estes passam pelo detector e são registrados em gráficos^[42].

As condições cromatográficas segundo Araújo^[42] contemplam aspectos como:

- Tipo de coluna (empacotadas ou capilares);
- Tempo de retenção (medida da interação entre os componentes da amostra e a fase estacionária);
- Polaridade da fase estacionária/composição (conforme a polaridade da amostra a ser analisada);
- Diâmetro interno (DI) das colunas capilares
- Tipo de injeção da amostra;
- Temperatura da coluna;
- Fluxo de gás ou velocidade do gás carreador, relacionado com a resolução. Fluxos de gás muito baixos comprometem a resolução;
- Volume da amostra injetada, que irá variar conforme o diâmetro da coluna.

A cromatografia em fase líquida (LC) é uma técnica que possibilita a determinação de moléculas termolábeis e não voláteis, diferentemente da GC, possibilitando que os analitos permaneçam solubilizados, favorecendo a determinação de 80% dos compostos sintéticos^[43].

Podem ser utilizadas na análise de substâncias solúveis no solvente utilizado na fase móvel. As colunas utilizadas na LC geralmente são de aço inoxidável com tamanho variável de 10-30 cm de comprimento e 3,0 a 10,0 mm de diâmetro^[42].

As fases estacionárias variam conforme as interações que devem ocorrer com os componentes da amostra (interação hidrofílica, hidrofóbica e troca iônica). O C18 (Octadecil), por exemplo, é considerado fase estacionária altamente não-polar^[42].

A fase móvel pode ser composta por água, tampão, acetonitrila, hexano, clorofórmio, propanol, entre outros. A combinação de solventes miscíveis é geralmente utilizada. É recomendado o uso de solventes com alto grau de pureza e deve apresentar características como capacidade de dissolver a amostra, compatibilidade com o detector e ser bombeado a uma velocidade de 1,0-5,0 mL/min^[42].

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) tornou-se uma ferramenta bastante utilizada na detecção de pesticidas em alimentos e para superar algumas desvantagens deste método, foi elaborada a técnica MS/MS, com detectores acoplados, que apresenta como vantagem maior detectabilidade e sensibilidade do que o quadrupolo único, pois garante que o íon precursor selecionado fragmente nos íons produtos, o que possibilita a análise de vários tipos de pesticidas simultaneamente e a detecção e confirmação desses compostos em concentrações pequenas^[38].

Outros tipos de cromatografias utilizadas são a supercrítica (SFC), que pode ser utilizada quando a fase móvel é um fluido. Esta técnica é útil porque pode ser mais efetiva no processo de separação do ponto de vista do número de pratos teóricos efetivos ou da velocidade de separação quando comparada com as outras técnicas cromatográficas, além de não degradar os analitos termossensíveis como na CG; há ainda a cromatografia em camada delgada ou de camada fina (TLC), utilizada quando a fase móvel é um líquido de baixa viscosidade e a fase estacionária sólida^[6].

Sistema de detecção

A escolha do sistema de detecção dependerá do tipo de substância a ser analisada, ou seja, quais elementos estão presentes nos ingredientes ativos dos agrotóxicos^[40]. O mais utilizado atualmente e que apresenta melhores resultados em termos de eficiência, é a espectrometria de massas.

Quando se faz o acoplamento da cromatografia com a espectrometria de massas obtém-se o chamado cromatograma de massas. Trata-se de um cromatograma constituído de todos os íons produzidos pelo espectrômetro de massas ou apenas pelos íons de interesse produzidos por este^[44].

É através de um campo elétrico ou magnético que ocorre a seleção de um íon pela sua razão massa/carga (m/z – *mass to charge ratio*), identificando o analito de origem. Por meio da m/z se estabelece a composição química elementar e estrutural de compostos, pela formação do íon *quasi*-molecular e pelas fragmentações controladas e reproduzíveis na cela de colisão por dissociação induzida por colisão (CID)^[39].

A vantagem do emprego da cromatografia com detecção por espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas é que por meio dessa técnica é possível obter uma grande quantidade de informação estrutural acerca do analito, fato que assegura sua identificação com maior exatidão, ao contrário de quando ela é feita apenas com base nas características de retenção dos compostos analisados. Além disso, quando existem compostos que não podem ser totalmente separados pela técnica cromatográfica empregada, usando espectrometria de massas MS/MS é possível detectá-los individualmente se possuírem diferentes massas molares ou gerarem diferentes espectros de massas^[45,46].

Os efeitos da interferência de componentes da matriz sobre o sinal obtido também podem ser minimizados, proporcionando maior simplificação no preparo da amostra^[46].

Outro sistema de detecção que pode ser aplicado é o índice de refração, considerado o quociente do ângulo de incidência e do ângulo de refração, e varia conforme a temperatura, pressão e o fluxo. Utilizado para compostos que não possuem absorção e fluorescência significativa. Todas as substâncias possuem o seu índice de refração

característico^[42].

Já a detecção por absorvância utiliza um espectrofotômetro UV/VISÍVEL, operando na faixa de 190 a 700 nm e toma-se a leitura a um comprimento de onda fixo^[42].

Sistema de validação de metodologia

A validação deverá seguir normas conforme a agência reguladora do Brasil e/ou de outros países, por meio de seus guias de orientações oficiais contendo as diretrizes a serem adotadas no processo de validação^[47-49]. Os parâmetros analíticos de validação (ou figuras de mérito) mais usados para avaliar métodos de separação são: seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez^[50-52].

A seletividade é a capacidade de um método quantificar com exatidão o analito na presença de interferentes presentes na amostra e, conforme o documento nº SANCO/12495/2011 da União Européia, a seletividade é a capacidade da extração, do *clean-up*, da derivatização, do sistema de separação e do detector de discriminar entre o analito e outros compostos^[43,49,51].

As maneiras para avaliar a seletividade podem ser por meio de comparação entre a matriz isenta dos pesticidas com a matriz adicionada com os padrões dos pesticidas ou utilizando-se detectores como o arranjo de diodos e espectrômetros de massas^[43,50].

O parâmetro de linearidade é a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de concentração. É obtida por padronização interna ou externa, por meio de padrões^[43,50].

A precisão é o grau de concordância entre os resultados analíticos independentes obtidos através da aplicação do procedimento experimental sob condições previamente definidas e é expressa pelo coeficiente de variação (CV%). O parâmetro repetitividade está relacionado à característica da dispersão dos resultados e pode ser determinado por meio da análise de padrões, material de referência ou adição do analito ao branco da amostra, em várias concentrações^[38,48,49].

A exatidão é o grau de concordância entre o resultado do teste e do verdadeiro, ou aquele aceito como valor de referência^[43,49]. Há o intervalo aceitável de recuperação para análise de resíduos, que deve variar de 70% a 120%, com precisão de até mais ou menos 20%^[38,49,52].

O limite de detecção (LD) é a menor concentração de um analito em uma matriz e pode ser calculado por método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica^[38,50,52].

Por fim, o limite de quantificação (LQ) considerado como a menor concentração de um analito em uma matriz, utiliza os mesmos métodos do LD, porém em proporções de 10:1^[43,50,52].

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pontua-se a importância dos métodos de análise de agrotóxicos dada a ampla utilização desses compostos na produção de alimentos no Brasil e nos demais países mundo e a relação apontada em algumas pesquisas da exposição aguda e/ou crônica com alguns agravos à saúde humana. Verificou-se por meio da revisão bibliográfica que os métodos de análise evoluíram significativamente, com técnicas de tratamento da amostra, detecção e quantificação cada vez mais precisas.

Os métodos de tratamento da amostra recomendados são aqueles que incluem técnicas miniaturizadas de preparo da amostra, por utilizarem menor volume de solvente, contribuindo para a proteção ambiental, além de serem considerados multirresíduos. Neste contexto, o método *Quechers* para tratamento da amostra foi o mais citado na literatura atual, sendo considerado um método fácil, rápido, que utiliza pequena quantidade de amostra e solvente, além de ser um método multirresíduo. O método obteve otimizações posteriores a sua elaboração, de modo a ajustar o pH da fase de partição com o pH da amostra, por meio da utilização de acetato e citrato. É um método que pode ainda ser utilizado para amostras com alto teor lipídico e/ou rica em pigmentos.

Os métodos cromatográficos, apesar do custo mais elevado, foram os mais utilizados para identificação e quantificação de resíduos de agrotóxicos, em especial a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas MS/MS, recomendada após tratamento da amostra pelo método *Quechers* e a cromatografia gasosa.

As principais dificuldades apontadas nos estudos analisados referem-se à complexidade da matriz analisada, as diferenças físico-químicas dos compostos a serem analisados e o alcance da sensibilidade metodológica, uma vez que as análises são efetuadas para resíduos.

Os métodos de análise de agrotóxicos deverão ser validados, de modo a garantir e comprovar a qualidade das medições químicas. Estudos que utilizaram o método *Quechers* associado às técnicas de cromatografia líquida e gasosa obtiveram bons resultados no processo de validação.

REFERÊNCIAS

- [1] Carneiro F, Pignati W, Rigotto R, et al. Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: ABRASCO; 2012. 86 p. (Dossiê ABRASCO: parte 1: agrotóxicos, segurança alimentar e nutricional e saúde). Disponível em: <http://www.abrasco.org.br/site/wp-content/uploads/2015/03/Dossiê_Abrasco_01.pdf>
- [2] BRASIL. Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 08 jan. 2002.
- [3] Jardim ANO. Resíduos de pesticidas em alimentos: validação de metodologia analítica, análise em frutas e avaliação da exposição da população brasileira pelo método probabilístico [tese]. [Brasília]: Universidade de Brasília; 2012. 150 f.
- [4] World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Codex alimentarius commission: procedural manual [Internet]. 20 ed. Roma: 2011 [Acesso em 30 abr 2015]. 212 p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_20e.pdf>.
- [5] Faria NM, Fassa AC, Facchini LA. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. Cien Saude Colet. 2007;12(1):25-38. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232007000100008>>

- [6] Midio AF, Martins DI. Herbicidas em Alimentos: aspectos gerais, toxicológicos e analíticos. São Paulo: Livraria Varela; 1997. 108 p.
- [7] Lichon MJ. Sample preparation for chromatographic analysis of food. *J Chromatogr A*. 1992;624(1-2):3-9.
- [8] Abakerli RB. Amostragem e sua influência nos resultados de resíduos. In: Encontro Nacional de Analistas de Resíduos de Pesticidas, 15; 1991. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 30-43p.
- [9] Trufelli H, Palma P, Famiglini G, et al. An overview of matrix effects in liquid chromatography– mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 2011;30(3):491-509.
- [10] Prestes OD, Adaime MB, Zanella R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Sci Chromatogr*. 2011;3(1):51-64. Disponível em: <<http://scientiachromatographica.com/files/v3n1/v3n1a4.pdf>>
- [11] Fumes BH. Avaliação do emprego da técnica MEPS na análise de agrotóxicos em caldo de cana-de-açúcar por GC-MS [dissertação]. [São Carlos]: Universidade de São Paulo; 2015. 83 f. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75135/tde-07052015-104934/pt-br.php>>
- [12] Andreu V, Pico Y. Determination of currently used pesticides in biota. *Anal Bioanal Chem*. 2012;404(9):2659-81. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00216-012-6331-x>>
- [13] Teranishi R. Sample preparation. In: Charalambous G, editor. *Analysis of foods and beverages*. London: Academic Press; 1984. p.1-12.
- [14] Kristenson EM, Ramos L, Brinkman UA. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trends Analyt Chem*. 2006;25(2):96-111.
- [15] Costa AI. Análise multirresíduos de agrotóxicos em alface por cromatografia gasosa [dissertação]. [Viçosa]: Universidade Federal de Viçosa; 2011. 118 f. Disponível em: <<http://repositorio.ufv.br/handle/123456789/2099>>
- [16] Eskilsson CS, Bjoërkjund E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J Chromatogr A*. 2000;902(1):227-50.
- [17] Chen L, Ding L, Haiyan J, et al. The determination of organochlorine pesticides based on dynamic microwave-assisted extraction coupled with on-line solid-phase extraction of high-performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta*. 2007;589(2):239-46.
- [18] Cabrera LC, Martins ML, Primel EG, et al. Extração em fase sólida dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. *Sci Chromatogr*. 2012;4(3):227-40. Disponível em: <<http://www.scientiachromatographica.com/doi/10.4322/sc.2012.013>>
- [19] Bjoërkjund E, Nilsson T. Pressurised liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis. *Trends Analyt Chem*. 2000;19(7):434-45.
- [20] Ramos L, Kristenson EM, Brinkman UA. Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *J Chromatogr A*. 2002;975(1):3-29.
- [21] Carabias-Martínez R, Rodríguez-Gonzalo E, Revilla-Ruiz P, et al. Pressurised liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *J Chromatogr A*. 2005;1089(1-2):1-17.
- [22] Chuang JC, Hart K, Chang JS, et al. Evaluation of analytical methods for determining pesticides in baby foods and adult duplicate-diet samples. *Anal Chim Acta*. 2001;444(1):87-95.
- [23] Cho SK, Abd El-Aty AM, Jeon HR, et al. Comparison of different extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues in kiwi fruit using gas chromatography-mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*. 2008;22(7):727-35.
- [24] Barker SA. Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *J Chromatogr A*. 2000;880(1-2):63-8.
- [25] Rodrigues SA, Caldas SS, Primel EG. A simple, efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase dispersion with liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. *Anal Chim Acta*. 2010;678(1):82-9.
- [26] Rezić I, Horvat AJ, Babić S, et al. Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography. *Ultrason Sonochem*. 2005;12(6):477-81.
- [27] García-Valcárcel AI, Tadeo JL. A combination of ultrasonic assisted extraction with LC-MS/MS for the determination of organophosphorus pesticides in sludge. *Anal Chim Acta*. 2009;641(1-2):117-23.
- [28] Anastassiades M, Maštovská K, Lehotay SJ. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. *J Chromatogr A*. 2003;1015(1-2):163-84.

- [29] Soares CE. Extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura e seu emprego na análise multirresíduos de agrotóxicos em uva e derivados [dissertação]. [Viçosa]: Universidade Federal de Viçosa; 2011. 108 f. Disponível em: <<http://repositorio.ufv.br/handle/123456789/2101>>
- [30] Ivanoff JP. Avaliação da potencialidade de utilização do método Quechers na análise multirresíduo de agrotóxicos em hortigranjeiros [monografia]. [Porto Alegre]: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.38 f. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/37222>>
- [31] Maštovská K, Lehotay SJ. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. *J Chromatogr A*. 2004;1040(2):259-72.
- [32] Lehotay SJ, Lightfield AR, Harman-Fetcho JA et al. Analysis of pesticide residues in eggs by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2001;49(10):4589-96.
- [33] Lehotay SJ, Maštovská K, Yun SJ. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *J AOAC Int*. 2005;88(2):630-8.
- [34] Li L, Wei L, Dongmei Q, et al. Application of graphitized carbon black to the QuEChERS method for pesticide multiresidue analysis in spinach. *J AOAC Int*. 2009;92(2):538-47.
- [35] Sobhanzadeh E, Bakar NK, Abas MR, Nemati K. A simple and efficient multi-residue method based on QuEChERS for pesticides determination in palm oil by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Environ Monit Assess*. 2012;184(9):5821-8.
- [36] Prestes OD, Friggi CA, Adaime MB, et al. Quechers: método moderno de preparo de amostras para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Quim Nova*. 2009;32(6):1620-34. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000600046>>
- [37] Oshita D, Jardim IC. Morango: uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna. *Sci Chromatogr*. 2012;4(1):52-76. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4322/sc.2012.005>>
- [38] Andrade GCRM. Análise multirresíduos de pesticidas em tomate utilizando LC-MS/MS e avaliação dos efeitos de lavagem na descontaminação [tese]. [Piracicaba]: Universidade de São Paulo; 2013.133 f. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64135/tde-18102013-094514/pt-br.php>>
- [39] Rebelo AM. Desenvolvimento e validação de método analítico, via LC-ESI-MS/MS, para determinação de agrotóxicos em arroz irrigado (*Oryza sativa*, L.) [tese]. [Curitiba]: Universidade Federal do Paraná; 2014. 220 f. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1884/36455>>
- [40] Silva EP. Validação de método de extração e análise de multirresíduo de agrotóxicos em carne bovina por cromatografia gasosa [dissertação]. [Viçosa]: Universidade Federal de Viçosa; 2008. p. 102. Disponível em: <<http://repositorio.ufv.br/handle/123456789/2069>>
- [41] Harris DC. Análise Química Quantitativa. 7 ed. Rio de Janeiro: LCT Editora; 2008. 868 p.
- [42] Araújo JM. Química de Alimentos: teoria e prática. 2 ed. Viçosa: Ed Viçosa UFV; 1999. 416 p.
- [43] Fernández-Alba AR. Chromatographic - mass spectrometry food analysis for trace determination of pesticide residues. . Amsterdam: Elsevier; 2005. 510 p. (Barceló D, editor. *Comprehensive Analytical Chemistry*; vol. 43).
- [44] Aquino Neto FR, Nunes DSS. Cromatografia: princípios e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciencia; 2003. 188 p.
- [45] Vékey K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *J Chromatogr A*. 2001;921(2):227-36.
- [46] Chiaradia MC, Collins CH, Jardim IC. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Quim Nova*. 2008;31(3):623-36. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000300030>>
- [47] World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Codex alimentarius commission: proposed draft revision of the list of methods for pesticide residue analysis at step 3. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2007. 7 p . Relatório No.: Codex Document CX/PR 07/39/06. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/ccpr/ccpr39/pr39_06e.pdf>
- [48] Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia . Orientação sobre validação de métodos analíticos - DOQ-CGCRE-008 - Revisão 3. Rio de Janeiro: INMETRO; 2010. [Acesso em 30 abr 2015]. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>

[49] European Commission. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Brussels: EU Reference Laboratories for Residues of pesticides; 2011. 41 p. Relatório No.: SANCO/12495/2011 [Acesso em 30 abr 2015]. Disponível em: <http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2011_12495.pdf>

[50] Ribani M, Bottoli CB, Collins CH, et al. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. Quim Nova. 2004;27(5):771-80. <Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>>

[51] Paschoal JA, Rath S, Airoidi FP, et al. Validation of chromatographic methods for the determination of residues of veterinary drugs in foods. Quim Nova. 2008;31(5):1190-8. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000500048>>

[52] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre os critérios para a realização de estudos de resíduos de agrotóxicos para fins de registro de agrotóxicos no Brasil. Resolução RDC nº 4, de 18 de janeiro de 2012. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n. 16, p. 40-46, 2012.