

JÉSSIKA FAÊDA DE FREITAS

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM  
FARINHAS DE MANDIOCA E TRIGO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F866d Freitas, Jéssika Faêda de, 1992-  
2019 Determinação multirresíduos de agrotóxicos em farinhas de  
mandioca e trigo / Jéssika Faêda de Freitas. – Viçosa, MG, 2019.  
xix, 90 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Produtos químicos agrícolas - Análise. 2. Farinha de  
mandioca. 3. Farinha de trigo. 4. Extração (Química).  
5. Cromatografia a gás. 6. Espectrometria de massa.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química.  
Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. II. Título.


CDD 22. ed. 632.95

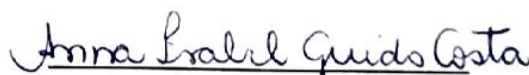
JÉSSIKA FAÊDA DE FREITAS


**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM  
FARINHAS DE MANDIOCA E TRIGO**

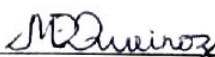
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21 de fevereiro de 2019.

  
Antônio Augusto Neves

  
Anna Isabel Guido Costa

  
Fernanda Fernandes Heleno  
(Coorientadora)

  
Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz  
(Orientadora)

**Dedico este trabalho,**  
**a Deus, aos meus pais Rafael e Margareth, aos meus irmãos Luiza e**  
**Rafael, à minha avó Maria Aparecida, ao Davi.**

**Obrigada pelo apoio e amor.**

A vida é aquilo que você deseja diariamanete!

Chico Xavier

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, pelos ensinamentos, paciência, confiança e amizade.

Ao Prof. Antônio Augusto Neves pela atenção, ensinamentos e amizade.

Ao Prof. André Fernando de Oliveira pela aprendizagem e ajuda.

À Universidade Federal de Viçosa, o Programa de pós-graduação em Agroquímica do Departamento de Química, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À Alessandra Rodrigues e Fernanda Heleno pela atenção e disponibilidade de me ajudar.

Aos amigos do LAQUA pelos ensinamentos e momentos especiais.

À Layssa, por toda ajuda nos experimentos, sempre atenciosa e disposta a me ajudar.

À Thais, Mari, May, Marcos, Vitor, Liany, Aline pela amizade, apoio nos momentos difíceis e disponibilidade de sempre me ajudarem no laboratório. Obrigada pela convivência maravilhosa.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Agradeço a Deus e aos meus protetores de luz, por serem sempre o meu refúgio e por recarregarem minhas forças nas horas mais difíceis.

Aos meus pais Rafael e Margareth, pelo exemplo, incentivo, amor incondicional e por viver junto comigo os meus sonhos.

Aos meus irmãos Rafael e Luiza pelo carinho e apoio durante todos esses anos.

À minha avó Aparecida pelo amor e por me abençoar sempre.

Ao meu namorado Davi pelo amor e companherismo de todos momentos, principalmente das horas extras de laboratório e finais de semana de trabalho, me ajudando e protegendo.

À minha família pela união e por sempre torcer por mim.

A minha amiga Gabriela, que hoje me protege junto ao pai maior, tenho certeza que sempre estará comigo.

Ao meu eterno bonde Renata, Kamilla, Larissa que sempre torcem pelas minhas conquistas.

Aos meus primos, Nayara e Bruno pelo apoio, carinho e amizade desde sempre.

À Aline e Flávia pela amizade e carinho.

Obrigada a todos que contribuíram para a conclusão deste trabalho. Eu vejo o fim como um novo começo.

## **BIOGRAFIA**

JÉSSIKA FAÊDA DE FREITAS, filha de Rafael Paulo de Freitas e Margareth Dias Faêda de Freitas, nasceu em Ubá, Minas Gerais, em 11 de maio de 1992.

Em março de 2011, iniciou o Curso de Bacharel em Química, pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), na cidade de Viçosa – MG, diplomando-se como Bacharel em agosto de 2016.

No período de fevereiro de 2013 a dezembro de 2013 foi bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação à Extensão Universitária (PIBEX), com projeto Jovem Cientista, localizado na cidade de Viçosa, espaço Química em Ação, departamento de Química da UVF.

Estagiou no Laboratório de Química Analítica (LAQUA) do Departamento de Química da UFV, auxiliando estudantes de pós-graduação no desenvolvimento de suas pesquisas e adquirindo conhecimento sobre princípios e emprego de técnicas de extração, e de técnicas cromatográficas.

No período de agosto de 2014 a julho de 2015 foi bolsista de iniciação científica (PIBIC/CNPq/UFV), no laboratório de Química Analítica (LAQUA), do Departamento de Química da UFV, desenvolvendo a pesquisa relacionada com remoção de trihalometanos em águas empregando Irradiação Ultravioleta.

Em março de 2017, iniciou os estudos no Programa de pós-graduação em Agroquímica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa – MG, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2019.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
RESUMO .....	xvi
ABSTRACT .....	xviii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	10
CAPÍTULO 1 .....	15
RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	17
1.1. INTRODUÇÃO .....	18
1.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
1.2.1. Reagentes e soluções .....	19
1.2.2. Equipamentos .....	19
1.2.3. Condições cromatográficas .....	20
1.2.4. Amostras .....	21
1.2.5. Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP).....	21
1.2.5.1. Extração dos agrotóxicos em farinha de mandioca.....	21
1.2.5.2. Otimização do método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LPT).....	22
1.2.6. Hifenação das técnicas sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) com a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).....	23
1.2.6.1. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) dos agrotóxicos em farinha de mandioca .....	23
1.2.6.2. Otimização do método de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).....	25
1.2.7. Validação do método SLE/LTP .....	25

1.2.8. Aplicação do método.....	27
1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
1.3.1. Análises cromatografica dos métodos.....	27
1.3.2. Otimização dos métodos .....	31
1.3.2.1. Otimização do método de extração sólido-líquido com partção em baixa temperatura (SLE/LTP).....	31
1.3.2.2. Hifenação das técnicas extração sólido-líquido com partção em baixa temperatura (SLE/LTP) com a microextração líquido-líquido dispersivo (DLLME).....	36
1.3.2.2.1. Otimização da hifenação das técnicas SLE/LPT-DLLME.....	40
1.3.3. Validação do método ESL-PBT.....	43
1.3.3.1. Seletividade .....	43
1.3.3.2. Linearidade de resposta do método .....	45
1.3.3.3. Limite de detecção e limite de quantificação .....	49
1.3.3.4. Exatidão .....	49
1.3.3.5. Precisão .....	50
1.3.3.5.1. Repetitividade.....	51
1.3.3.5.2. Precisão intermediária .....	52
1.3.4. Efeito de matriz.....	53
1.3.5. Aplicação do método.....	55
1.4. CONCLUSÃO .....	55
1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
CAPÍTULO 2.....	59
RESUMO .....	59
2.1. INTRODUÇÃO .....	61
2.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	63
2.2.1. Reagentes e soluções.....	63
2.2.2. Equipamentos.....	63
2.2.3. Condições cromatográficas .....	63
2.2.4. Amostras .....	65
2.2.5. Preparação das amostras para o estudo de otimização.....	65

2.2.6. Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP).....	65
2.2.6.1. Extração dos agrotóxicos em farinha de Trigo .....	65
2.2.6.2. Otimização do método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP).....	66
2.2.7. Validação do método.....	67
2.2.7.1. Seletividade .....	67
2.2.7.2. Linearidade da resposta do método.....	67
2.2.7.3. Limite de detecção e limite de quantificação .....	67
2.2.7.4. Exatidão .....	68
2.2.7.5. Precisão .....	68
2.2.7.5.1. Repetitividade.....	69
2.2.7.5.2. Precisão intermediária .....	69
2.2.8. Efeito de matriz .....	69
2.2.9. Aplicação do método.....	70
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	70
2.3.1. Análises cromatográfica do método.....	70
2.3.2. Otimização do método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP).....	73
2.3.3. Validação do método.....	74
2.3.3.1. Seletividade .....	74
2.3.3.2. Linearidade de resposta do método.....	76
2.3.3.3. Limite de detecção e limite de quantificação do método .....	79
2.3.3.4. Exatidão do método.....	79
2.3.3.5. Precisão .....	80
2.3.3.5.1. Repetitividade.....	81
2.3.3.5.2. Precisão intermediária .....	82
2.3.4. Efeito de matriz .....	83
2.3.5. Aplicação do método.....	84
2.4. CONCLUSÃO .....	86
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
C18 – Octadecil ligada a sílica  
Cf – Concentração do extrato  
CV – Coeficiente de Variação  
dv - Desvio padrão  
GC - Cromatografia Gasosa  
GC/DCE – Cromatografia Gasosa com Detector por Captura de Elétrons  
GC/FID – Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização em Chama  
GC/FPD – Cromatografia Gasosa com Detector Fotométrico de Chama  
GC-MS – Cromatógrafo Gasosa acoplado ao Espectrômetro de Massas  
GC/NPD – Cromatografia Gasosa com Detector de Nitrogênio e Fosforo  
h – Hora  
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial  
 $K_{ow}$  – Coeficiente de partição octanol-água  
LAQUA – Laboratório de Química Analítica  
LD – Limite de detecção  
DLLME – Microextração Líquido-Líquido Dispersivo  
LMR – Limite máximo de residuo  
LPME – Microextração em fase líquida  
LQ – Limite de quantificação  
m/v – Massa/volume  
m/z – Massa/carga  
min – Minuto  
MM – Massa Molar  
NaCl – Cloreto de sódio  
PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos  
PE – Ponto de ebulição  
PSA – Amina secundária primária  
% R – Porcentagem de recuperação  
r – Coeficiente de correlação  
 $r^2$  – Coeficiente de determinação  
SIM – Monitoramento do íon selecionado (*Select Ion Monitoring*)  
SLE/LTP – Extração Sólido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura

SPME – Microextração em fase sólida

TIC – Cromatograma de íons totais (TIC - *total ion chromatogram*)

$t_R$  – Tempo de Retenção

UE – União Europeia

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Valores dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) permitidos pelos órgãos regulamentadores ANVISA, Codex e União Européia para os agrotóxicos selecionados de acordo com as matrizes farinha de trigo e/ou trigo e farinha de mandioca e/ou mandioca.....	5
<b>Tabela 2.</b> Propriedades químicas dos agrotóxicos selecionado .....	6
<b>Tabela 3.</b> Tempo de retenção e íons monitorados nas respectivas janelas de tempo para os agrotóxicos nas análises por GC-MS no modo SIM.....	21
<b>Tabela 4.</b> Planejamento fatorial completo $2^2$ , com ponto central $n=3$ , utilizado para otimização da técnica SLE/LTP para determinação de resíduos de agrotóxicos em farinha de mandioca .....	22
<b>Tabela 5.</b> Planejamento fatorial completo $2^3$ , com ponto central $n=3$ , utilizado para otimização dos métodos SLE/LTP para farinha de mandioca.....	23
<b>Tabela 6.</b> Planejamento composto central (PCC) $2^2$ , utilizado para otimização do método LDS/DLLME para farinha de mandioca.....	25
<b>Tabela 7.</b> Equações da reta e coeficiente de correlação (r) dos agrotóxicos pirimifós-metílico, clorpirifós, tebuconazol, bifentrina, permetrina, cipermetrina e esfenvalerato.....	45
<b>Tabela 8.</b> Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método para os sete agrotóxicos em estudo.....	49
<b>Tabela 9.</b> Porcentagens de recuperação ( $R\% \pm DP$ ) obtidos para análise na determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de farinha de mandioca fortificadas em três níveis de concentração, pelo método SLE/LTP- GC-MS .....	50
<b>Tabela 10.</b> Coeficientes de variação (CV) obtidos para análise das amostras de farinha de mandioca fortificadas em três níveis de concentração. Sendo estes ensaios intra-dia.....	51
<b>Tabela 11.</b> Coeficientes de variação (CV) obtidos para análise das amostras de farinha de mandioca em três níveis de concentração, inter-dia .....	52
<b>Tabela 12.</b> Porcentagem do efeito de matriz para cada agrotóxico.....	53
<b>Tabela 13.</b> Íons monitorados no modo SIM na análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas , tempos de retenção e janela de tempos dos agrotóxicos .....	64
<b>Tabela 14.</b> Variáveis, níveis e matriz do planejamento fatorial utilizado para otimização dos métodos SLE/LTP para farinha de trigo. ....	66
<b>Tabela 15.</b> Equações da reta e coeficiente de correlação (r) dos agrotóxicos pirimifós-metílico, clorpirifós, tebuconazol, bifentrina, permetrina, cipermetrina e esfenvalerato.....	76
<b>Tabela 16.</b> Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método para os sete agrotóxicos em estudo.....	79

<b>Tabela 17.</b> Porcentagens de recuperação ( $R\% \pm DP$ ) obtidos para análise de amostras de farinha de trigo fortificadas em três níveis de concentração .....	80
<b>Tabela 18.</b> Coeficientes de variação (CV) obtidos para análise amostras de farinha de trigo fortificadas em três níveis de concentração. Sendo estes ensaios intra-dia .....	81
<b>Tabela 19.</b> Coeficientes de variação (CV) obtidos para análise amostras de farinha de trigo em três níveis de concentração (inter-dia) .....	82
<b>Tabela 20.</b> Porcentagem do efeito de matriz para cada agrotóxico.....	83
<b>Tabela 21.</b> Níveis de agrotóxicos ( $mg\ kg^{-1}$ ) encontrados em de farinha e farelo de trigo distribuídas em Viçosa-MG e os Limite máximo de resíduos permitidos pelos órgãos regulamentadores .....	85

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Resultado do procedimento DLLME em extrato de acetonitrila obtida da SLE/LTP de farinha de mandioca com efeito de emulsão (A) e da DLLME em extrato de acetonitrila obtida da SLE/LTP de farinha de mandioca com adição de NaCl 5% (B).....24
- Figura 2.** Espectros de massas total (Scan) para os agrotóxicos pirimifós-metílico (A), clorpirifós (B), tebuconazol (C) e bifentrina (D), permetrina (E), cipermetrina (F) e esfenvalerato (G) .....29
- Figura 3.** (A) Cromatograma no modo Scan de uma solução-padrão contendo todos os agrotóxicos na concentração 2 mg L<sup>-1</sup>. (B) Cromatograma no modo SIM de uma solução-padrão contendo todos os analitos na concentração 85 µg L<sup>-1</sup>, sendo, m / z (1)= 290; 97; 125; 181; 183; 163 e 125, m / z (2)= 246; 197; 70; 165; 163; 181; 167, m / z (3)= 305; 199; 250; 166; 165; 165;225. Os tempos de retenção obtidos foram: (1) pirimifós-metílico (tR = 5,70 min), (2) clorpirifós (tR = 5,95 min), (3) tebuconazol (tR = 8,53 min), (4) bifentrina (tR = 8,93min), (5) permetrina (tR = 10,297 / 10,404), (6) cipermetrina (tR = 11,152 / 11,245 / 11,342) e (7) esfenvalerato (tR = 12,538).....30
- Figura 4.** Gráficos de Pareto dos efeitos das variáveis volume de água (1) e volume de ACN (2) para os agrotóxicos pirimifós-metílico (A), clorpirifós (B), tebuconazol (C) e bifentrina (D), permetrina (E), cipermetrina (F) e esfenvalerato (G) .....32
- Figura 5.** Gráficos de Pareto dos efeitos das variáveis tempo de agitação (1), de centrifugação (2) e congelamento (3) para os agrotóxicos pirimifós-metílico (A), clorpirifós (B), tebuconazol (C) e bifentrina (D), permetrina (E), cipermetrina (F) e esfenvalerato (G) .....34
- Figura 6.** Superfícies de resposta das variáveis tempo de agitação (1), tempo de centrifugação (2) e tempo de congelamento (3) para a extração SLE/LTP dos agrotóxicos pirimifós- metílico (A) e permetrina (B), de amostras de farinha de mandioca. ....36
- Figura 7.** Cromatogramas do branco analítico da amostra de farinha de mandioca sem a etapa de *clean-up*. Sendo m / z (1)= 290; 97; 125; 181; 183; 163 e 125, m / z (2)= 246; 197; 70; 165; 163; 181; 167, m / z (3)= 305; 199; 250. ....37
- Figura 8.** Cromatogramas dos sorventes testados. C18 (A), Celite (B), PSA (C), Florisil (D) e Sílica (E). Sendo m / z (1)= 290; 97; 125; 181; 183; 163 e 125, m / z (2)= 246; 197; 70; 165; 163; 181; 167, m / z (3)= 305; 199; 250. ....38
- Figura 9.** (A) Cromatograma do extrato fortificado sem a etapa de *clean-up*. (B) Cromatograma do extrato fortificado com a etapa de *clean-up* (C18) .....39
- Figura 10.** Gráficos de Pareto das variáveis volume de tolueno (1), de água (2) para os agrotóxicos pirimifós- metílico (A), clorpirifós (B), tebuconazol (C), bifentrina (D), permetrina (E), cipermetrina (F) e esfenvalerato (G).....41

<b>Figura 11.</b> Superfícies de resposta das variáveis volume de tolueno (1), de água (2) para os agrotóxicos pirimifós- metílico (A), clorpirifós (B), tebuconazol (C), bifentrina (D), permetrina (E), cipermetrina (F) e esfenvalerato (G).....	42
<b>Figura 12.</b> (A) Cromatograma da análise GC-MS das amostras de farinha de mandioca, isentas dos analitos. (B) Cromatograma das amostras de farinha de mandica fortificadas com 266 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de (1) pirimifós-metílico ( $t_R = 5,7$ ), (3) tebuconazol ( $t_R = 8,5$ ), (4) bifentrina ( $t_R = 8,9$ ), (5) permetrina ( $t_R = 10,3 / 10,4$ ) e (7) esfenvalerato ( $t_R = 12,5$ ) e 270 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (2) clorpirifós ( $t_R = 5,9$ ) e (6) cipermetrina ( $t_R = 11,1 / 11,2 / 11,3$ ). Sendo, m / z (1)= 290; 97; 125; 181; 183; 163 e 125, m / z (2)= 246; 197; 70; 165; 163; 181; 167, m / z (3)= 305; 199; 250; 166; 165; 165; 225. ....	44
<b>Figura 13.</b> Curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de farinha de mandioca, fortificadas com padrão dos analitos e submetidas à SLE/LTP e analisado por GC-MS, em uma faixa de concentração de 16 a 266 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para (A) pirimifós-metílico, (C) tebuconazol, (D) bifentrina, (E) permetrina e (G) esfenvalerato e 20 a 270 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para (B) clorpirifós e (F) cipermetrina .....	47
<b>Figura 14.</b> Gráficos de resíduos para curva analítica de amostras de farinha de mandioca, fortificadas com padrão dos analitos e submetidas à SLE/LTP e analisado por GC-MS, em uma faixa de concentração de 16 a 266 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para (A) pirimifós-metílico, (C) tebuconazol, (D) bifentrina, (E) permetrina e (G) esfenvalerato e 20 a 270 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para (B) clorpirifós e (F) cipermetrina .....	48
<b>Figura 15.</b> Gráficos das curvas analíticas preparadas em acetonitrila e no extrato para cada agrotóxicos, em uma faixa de concentração de 8, 33, 58, 83, 108 e 133 $\mu\text{g L}^{-1}$ para pirimifós-metílico (A), tebuconazol (C), bifentrina (D) e permetrina (E) e para clorpirifós (B) em 10, 35, 60, 85, 110 e 135 $\mu\text{g L}^{-1}$ ) .....	54
<b>Figura 16.</b> Espectros de massas total (Scan) para os agrotóxicos pirimifós-metílico (A), clorpirifós (B), tebuconazol (C) e bifentrina (D), permetrina (E), cipermetrina (F) e esfenvalerato (G).....	71
<b>Figura 17.</b> (A) Cromatograma no modo Scan de uma solução-padrão contendo todos os agrotóxicos na concentração 2 $\text{mg L}^{-1}$ . (B) Cromatograma no modo SIM de uma solução-padrão contendo todos os analitos na concentração 85 $\mu\text{g L}^{-1}$ , sendo, m / z (1)= 290; 97; 125; 181; 183; 163 e 125, m / z (2)= 246; 197; 70; 165; 163; 181; 167, m / z (3)= 305; 199; 250; 166; 165; 165;225. (B). Os tempos de retenção obtidos foram: (1) pirimifós-metílico ( $t_R = 5,70$ min), (2) clorpirifós ( $t_R = 5,95$ min), (3) tebuconazol ( $t_R = 8,53$ min), (4) bifentrina ( $t_R = 8,93$ min), (5) permetrina ( $t_R = 10,297 / 10,404$ ), (6) cipermetrina ( $t_R = 11,152 / 11,245 / 11,342$ ) e (7) esfenvalerato ( $t_R = 12,538$ ).....	72

**Figura 18.** Diagramas das médias marginais dos efeitos das variáveis volume de acetonitrila (ACN) e volume de água para pirimifós-metílico (A), tebuconazol (B), bifentrina (C) e cipermetrina (D).....74

**Figura 19.** (A) Cromatograma da análise GC-MS das amostras de farinha de trigo, isentas dos analitos. (B) Cromatograma das amostras de farinha de trigo fortificadas com 266  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de (1) pirimifós-metílico ( $tR = 5,7$ ), (3) tebuconazol ( $tR = 8,5$ ), (4) bifentrina ( $tR = 8,9$ ), (5) permetrina ( $tR = 10,3 / 10,4$ ) e (7) esfenvalerato ( $tR = 12,5$ ) e 270  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (2) clorpirifós ( $tR = 5,9$ ) e (6) cipermetrina ( $tR = 11,1 / 11,2 / 11,3$ ). Sendo, m / z (1)= 290; 97; 125; 181; 183; 163 e 125, m / z (2)= 246; 197; 70; 165; 163; 181; 167, m / z (3)= 305; 199; 250; 166; 165; 165;225.....75

**Figura 20.** Curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de farinha de trigo, fortificadas com padrão dos analitos e submetidas à SLE/LTP e analisadas por GC-MS, em uma faixa de concentração de 66 a 266  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para (A) pirimifós-metílico, (C) tebuconazol, (D) bifentrina, (E) permetrina e (G) esfenvalerato e 70 a 270  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para (B) clorpirifós e (F) cipermetrina.....77

**Figura 21.** Gráficos de resíduos para curva analítica de amostras de farinha de trigo, fortificadas com padrão dos analitos e submetidas à SLE/LTP e analisadas por GC-MS, em uma faixa de concentração de 66 a 266  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para (A) pirimifós-metílico, (C) tebuconazol, (D) bifentrina, (E) permetrina e (G) esfenvalerato e 70 a 270  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para (B) clorpirifós e (F) cipermetrina.....78

**Figura 22.** Gráficos das curvas analíticas preparadas em acetonitrila e no extrato para cada agrotóxicos, em uma faixa de concentração de 8, 33, 58, 83, 108 e 133  $\mu\text{g L}^{-1}$  para pirimifós-metílico (A), tebuconazol (C), bifentrina (D) e permetrina (E) e para clorpirifós (B) em 10, 35, 60, 85, 110 e 135  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).....84

## RESUMO

FREITAS, Jéssika Faêda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Determinação multirresíduos de agrotóxicos em farinhas de mandioca e trigo.** Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Coorientadores: André Fernando de Oliveira e Fernanda Fernandes Heleno.

A forma predominante de controle de doenças e pragas na produção agrícola é a química pela aplicação de agrotóxicos. Entretanto, o uso intensivo e de forma inadequada desses produtos pode gerar danos ao meio ambiente e à saúde humana. No último relatório publicado pela ANVISA, em 2016, referente às análises de 12.051 amostras coletadas entre 2013 e 2015, 9.680 amostras (80,3%) foram consideradas satisfatórias quanto aos agrotóxicos pesquisados, sendo que em 5.062 (42%) não foram detectados resíduos, 4.618 (38,3%) apresentaram resíduos com concentrações iguais ou inferiores aos limites máximos de resíduos (LMRs) e 2.371 (19,7%) foram consideradas insatisfatórias. Dentre os 25 tipos de alimentos coletados no período de 2013 a 2015 pela ANVISA foram incluídos o trigo (farinha) e mandioca (farinha). Segundo este relatório, encontram-se resíduos de agrotóxicos com valores inferiores ou iguais aos (LMRs) permitidos em amostras de farinha de trigo e de mandioca analisadas. Entretanto, só o fato de se ter encontrado resíduos de agrotóxicos nestes produtos justifica a necessidade de se continuar analisando estas amostras. Avaliar a presença em baixas concentrações de resíduos de agrotóxicos em novas matrizes é um desafio, que motivou o desenvolvimento de método adequado e sensível para determinação de resíduos de agrotóxicos em produtos farináceos (farinha de trigo e de mandioca) consumidos pela população. Os principais agrotóxicos encontrados em farináceos, pirimifós-metílico, clorpirifós, tebuconazol, bifentrina, permetrina, cipermetrina e esfenvalerato foram selecionados para estudo. O presente trabalho foi executado em duas etapas. A primeira teve como objetivo otimizar e validar o método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) e otimizar a hifenação desta técnica com a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para determinação multirresíduos de agrotóxicos em farinha de mandioca. A segunda etapa teve como objetivo otimizar e validar a técnica SLE/LTP para determinação multirresíduos de agrotóxicos em farinha de trigo. Foi empregado um cromatógrafo a gás equipado com um espectrometro de massas (GC-MS) para analisar as amostras. Os métodos otimizados SLE/LTP-GC-MS foram validados, avaliando-se os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão. Para a farinha de mandioca os limites de detecção e os de quantificação ficaram entre 0,6 a 6,2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e 1,88 a 18,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$  respectivamente. Os valores de recuperação ficaram no intervalo de 94,1 a 107,9%, com precisão  $\leq 20\%$ . Enquanto que para farinha de trigo os limites de detecção ficaram entre 0,23 a 6,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e os limites de quantificação

entre 0,68 a 19,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Os valores de recuperação ficaram no intervalo de 92,7 a 107,8%, com precisão  $\leq 20\%$ . Foi estudado também o efeito de matriz dos agrotóxicos pirimifós-metílico, clorpirifós, tebuconazol, bifentrina e permetrina que, para a maioria dos agrotóxicos obteve um efeito de matriz positivo, aumentando o sinal cromatográfico em ambas as farinhas. O método desenvolvido (SLE/LTP-GC-MS) se mostrou viável para determinação dos analitos em farináceos, além de ser simples, eficaz, realizado em uma única etapa de extração e apresentar baixo consumo de solvente. O método otimizado e validado foi aplicado em amostras de farinha de trigo e de mandioca adquiridos em supermercados e feiras de Viçosa-MG. Não foram detectados a presença de agrotóxicos nas amostras de farinha de mandioca analisadas. Já as amostras de farinha de trigo apresentaram resíduos de agrotóxicos em todas as amostras analisadas. Em algumas amostras foram encontrados agrotóxicos em níveis superiores ao LMR estabelecidos pelos órgãos regulamentadores ANVISA, Codex e União Européia. Estes resultados mostraram a necessidade de se monitorar a presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos e de se desenvolver cada vez mais métodos capazes de detectá-los independentemente da matriz.

## ABSTRACT

FREITAS, Jéssika Faêda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Multiresidue determination of pesticides in cassava and wheat flour.** Advisor: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-advisors: André Fernando de Oliveira and Fernanda Fernandes Heleno.

The predominate form of control of diseases and pests in the agricultural production is the chemical control by the application of pesticides. However, the intensive and inadequate use of these products can cause harm to the environment and human health. In the last report published by ANVISA in 2016, referring to the analyzes of 12,051 samples collected between 2013 and 2015, 9,680 samples (80.3%) were considered satisfactory regards the pesticides analyzed, and in 5,062 (42%) no residues were detected. Among 25 types of food collected during the period, wheat (flour) and cassava (flour) were included. According to this report, pesticide residues were found with values below or equal to the maximum residue limits (MRLs) allowed in wheat and cassava flour samples. However, only the fact of pesticide residues were found in these products justifies the necessity to continue analyzing these samples. Assessing the presence of low concentrations of pesticide residues in new matrices is a challenge, which has led to the development of adequate and sensitive methods for the determination of pesticide residues in farinaceous products (wheat flour and cassava flour) consumed by the population. The main agrochemicals found in farinaceous, pirimiphos-methyl, chlorpyrifos, tebuconazole, bifenthrin, permethrin, cypermethrin and esfenvalerate were selected for study. The aim of this work was to optimize and validate the solid-liquid extraction with low temperature partitioning (SLE/LTP) and to optimize the hyphenation of this technique with liquid-liquid dispersive microextraction (DLLME) for determination of pesticide multi-residues in cassava flour. The second step was aimed at optimizing and validating the SLE/LTP technique for the determination of multi-residues of pesticides in wheat flour. A gas chromatograph equipped with a mass spectrometer (GC-MS) was used to analyze the samples. The optimized SLE/LTP-GC-MS methods were validated, evaluating the following parameters: selectivity, linearity, limits of detection and quantification, accuracy and precision. For cassava flour, the limits of detection and quantification were between 0.6 to 6.2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and 1.88 to 18.7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively. The recovery values were in the range of 94.1 to 107.9%, with precision  $\leq 20\%$ . While for wheat flour, the limits of detection were between 0.23 and 6.6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and the limits of quantification were between 0.68 and 19.7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Recovery values were in the range of 92.7 to 107.8%, with precision  $\leq 20\%$ . The matrix effect of the pyrimiphos-methyl, chlorpyrifos, tebuconazole, bifenthrin and permethrin pesticides was also studied, which for most pesticides had a positive matrix effect, increasing the chromatographic

signal in both flours. The methods developed proved to be viable for the determination of the analytes in farinaceous, besides being simple, effective, to be carried out in a single extraction stage and to present low consumption of solvent. The optimized and validated methods were applied in samples of wheat and cassava flour purchased in supermarkets and fairs in Viçosa-MG. No pesticides were detected in the cassava flour samples analyzed. However, the wheat flour samples presented pesticide residues in all samples analyzed, with values equal or above the MRLs allowed by ANVISA, Codex and European Union regulatory bodies. These results showed the need to monitor the presence of pesticide residues in food and the necessity of develop methods capable to detect them independently of the matrix.

## INTRODUÇÃO GERAL

Com a enorme demanda de produção e o crescimento da população global torna-se necessário maximizar os rendimentos da produção agrícola. Para isso, a forma predominante de controle e prevenção das doenças e pragas agrícolas tem sido o uso de agrotóxicos. Além dos agrotóxicos que geralmente são utilizados durante o cultivo, é comum a aplicação em pós-colheita e no armazenamento. Entretanto, o uso intensivo e de forma inadequada destes produtos tem gerado preocupação devido ao alto risco que essas substâncias podem causar à saúde humana e ao meio ambiente.

Em 2001 foi implantado o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA) para verificação se os alimentos comercializados no mercado varejista apresentavam níveis de resíduos de agrotóxicos dentro dos Limites Máximos de Resíduos (LMR).

No último relatório PARA publicado pela ANVISA, em 2016, referente às análises de 12.051 amostras coletadas entre 2013 e 2015, 9.680 amostras (80,3%) foram consideradas satisfatórias quanto aos agrotóxicos pesquisados, sendo que em 5.062 (42%) não foram detectadas resíduos, 4.618 (38,3%) apresentaram resíduos com concentrações iguais ou inferiores ao LMR e 2.371 (19,7%) foram consideradas insatisfatórias. No rol de 25 tipos de alimentos coletados no período foram incluídos o trigo (farinha) e mandioca (farinha). O relatório PARA apresentou resíduos de agrotóxicos com valores inferiores ou iguais aos LMRs para farináceos estabelecidos para os agrotóxicos analisados (ANVISA, 2016). Entretanto, só o fato de se ter encontrado resíduos de agrotóxicos nestes produtos justifica a necessidade de se desenvolver métodos adequados e sensíveis para avaliar a presença de baixas concentrações de resíduos de agrotóxicos em produtos farináceos consumidos pela população.

### A MANDIOCA

A mandioca é cultivada em regiões tropicais, cujo o nome científico é *Manihot esculenta* Crantz pertencente à família *Eupobiaceae*. A cultura de mandioca vem ocupando um lugar de destaque em vários países, sendo os países da África, Ásia e América do Sul os principais produtores (FAO, 2018).

Atualmente, a maioria das raízes de mandioca são cultivadas no nordeste brasileiro e são destinadas a produção de farinha. Essa produção é caracterizada pelo uso da mão de obra familiar em pequenas unidades denominadas casas de farinha as quais seguem métodos tradicionais e artesanais e operam em estruturas muito simples que frequentemente carecem de condições

adequadas e seguras para o processamento dos produtos (CARDOSO *et al.*, 2001). Além disso, o transporte da mandioca antes da produção da farinha deve ser feito no período máximo de 24 horas após a colheita, pois, a partir daí, já começam os ataques de microrganismos, principalmente fungos (ARAUJO & LOPES, 2009).

As etapas do processo de beneficiamento das raízes de mandioca para obtenção da farinha de mandioca consiste, em recepção das raízes (pesagem e descarregadas em local apropriado para evitar contaminação das raízes por fungos ou bactérias), descascamento (manual ou mecânico, cuidados com o higiene para evitar a proliferação de bactérias), lavagem (remoção das cascas ou impurezas. Após a lavagem são imersas em solução de água clorada, 0,5%, evitando a contaminação), trituração (transformação das raízes em massa), prensagem (perda de 20% de umidade), esfarelamento (garantir farinhas mais finas), torração (etapa fundamental para eliminar fração de manipueira que possa causar sabor amargo à farinha), peneiramento, resfriamento, ensacamento e armazenada (locais secos, ventilados e pisos e paredes laváveis) (ARAUJO & LOPES, 2009).

Embora o processamento de farinha de mandioca use tecnologia simples, precauções são necessárias com a seleção adequada de matérias-primas, o uso de práticas de higiene apropriadas e procedimentos corretos de manuseio durante a produção para garantir a qualidade do produto final (DA SILVA *et al.*, 2017). Além disso, nos últimos anos a produção de mandioca registrou crescimento ininterruptos, bem acima de 3% por ano (FAO, 2018). Esse crescimento casionou mudanças nos monocultivos, no emprego de genótipos de maior rendimento, no maior uso de irrigação e de agrotóxicos, acarretando riscos para esta cultura, incluindo surtos de pragas e doenças e depleção do solo (FAO, 2013).

## **O TRIGO**

Das espécies cultivadas de trigo, 95% são da espécie, hexaplóide (*Triticum aestivum*) conhecido como “trigo comum” ou “trigo pão” a qual é destinada a produção de pães. A espécie tetraplóide (*Triticum durum*), é mais utilizada para produção de massas, macarrões, conhecido como o trigo duro, as quais foram adaptadas para regiões de clima seco. Além dessas, existem outras espécies de trigos que já foram cultivadas historicamente, hoje são produzidas em pequenas áreas e são consideradas como pertencentes da mesma espécie do trigo destinado a produção de pão. Estas são, trigo diplóide (*Triticum monococcum* var. *monococcum* genome AA), o tetraplóide (*T. turgidum* var. *dicoccum* genomes AABB) e o hexaplóide (*T. aestivum* var. *spelta* genomes AABBDD) (SHEWRY & HEY, 2015).

Morfologicamente o trigo é muito semelhante aos demais cereais como cevada, aveia,

centeio e triticale, que tem a mesma finalidade de produção de grãos. A planta de trigo é estruturada em raízes, colmo, folhas e inflorescência. O grão maduro é conhecido como cariopse de tamanho pequeno e de diversos formatos (BORÉM & SCHEEREN, 2015).

O trigo é um dos principais alimentos consumidos mundialmente, devido a sua rica fonte de proteína e diversidade de produtos alimentícios. Em especial a farinha de trigo, a qual é produzida a partir da moagem do grão de trigo. Nesse processo o grão de trigo é fracionado em farelo, endosperma e gérmen. Os constituintes nutricionais, micronutricionais, fitoquímicos e fibras, são geralmente encontrados em grandes concentrações nos germes e farelos (OLIVEIRA NETO & SANTOS, 2017).

A origem da farinha branca se dá pelo endosperma amiláceo o qual representa 85% do grão interno em peso. O endosperma amiláceo é revestido por tecidos periféricos de múltiplas camadas com composições e espessuras diferentes. Os tecidos externos incluem o pericarpo externo, o pericarpo interno, o revestimento da semente (camada mais fina de 5-8  $\mu\text{m}$ ), a camada hialina e a camada de aleurona (mais espessa, até 65  $\mu\text{m}$  de espessura). Além dessas camadas, o grão também contém o germe formado pelo eixo embrionário e pelo escutelo. Cada uma das camadas difere em suas propriedades físicas e químicas (BARRON; SURGET & ROUAU, 2007; LAFIANDRA; RICCARDI & SHEWRY, 2014).

No mercado existe uma grande variedade de farinhas de trigo, sendo farinhas de trigo refinadas brancas e amarelas, farinhas integrais, farelo, fibra, gérmen, flocos, grão inteiro e triguenho.

## **AGROTÓXICOS**

A forma predominante de controle de doenças e pragas na produção agrícola é a química pela aplicação de agrotóxicos. O controle de resíduos de agrotóxicos em alimentos é feito de acordo com o limite máximo permitido (LMR) e o intervalo de segurança estabelecidos pelos órgãos ANVISA, Codex e União Européia. A ANVISA estabelece o LMR por meio da avaliação de estudos conduzidos em campo pelos pleiteantes de registro ou de alteração pós-registro. Analisando assim, as concentrações de resíduos que permaneceram nas culturas após a aplicação de agrotóxico respeitando as boas práticas agrícolas (BPA) (ANVISA, 2016).

A presença de resíduos de agrotóxicos em produtos farináceos, como a farinha de mandioca, pode estar relacionada ao armazenamento (EMBRAPA, 2019) e à recente expansão da sua produção (FAO, 2013), uma vez que, pequenos agricultores raramente pulverizam agrotóxicos em plantações de mandioca, pelo fato do controle químico não ser economicamente viável (PINTO-ZEVALLOS; PAREJA; AMBROGI, 2016). Entretanto, com o aumento da produção de

mandioca, o uso de agrotóxicos pode ser intensificado para aumentar a produção e obter produtos com melhor padrão agrícola, justificando a presença destes compostos no produto final. Já na farinha de trigo, pode ser devido à sua aplicação na fase de produção ou na pós-colheita e no armazenamento, levando à contaminação do produto final (EMBRAPA, 2018).

De acordo com relatório PARA 2013/2015 foram analisadas 470 amostras de farinha de mandioca, dos agrotóxicos detectados, 8 amostras apresentaram resíduos de diclorvós e 2 amostras cipermetrina. Sendo que a maioria das amostras estudadas apresentaram ingredientes ativos não autorizados para esse cultivo. Para a farinha de trigo foram analisadas 506 amostras, sendo que destas amostras 38 foram insatisfatórias por apresentarem resíduos de agrotóxicos não autorizados para trigo. As demais foram satisfatórias sendo que 220 amostras apresentaram níveis de resíduos de agrotóxicos em concentrações iguais ou inferiores ao LMR. Dos agrotóxicos avaliados os que apresentaram maior número de detecções nas amostras analisadas foram os pirimifós-metílico (135 amostras), bifentrina (87 amostras), fenitrotiona (31 amostras) e clorpirifós (31 amostras). Sendo o pirimifós-metílico detectado em concentração acima do LMR para uma amostra (ANVISA, 2016).

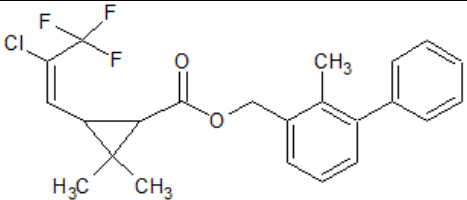
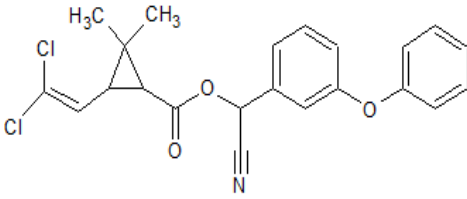
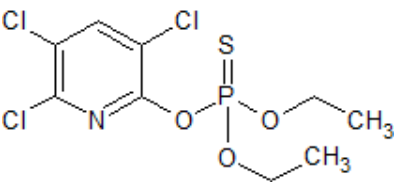
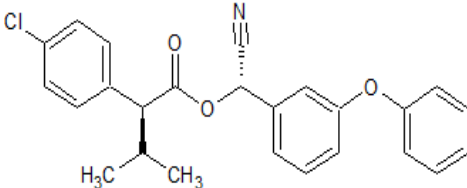
Com base no relatório PARA 2013-2015 foram selecionados alguns dos agrotóxicos mais encontrados nas farinhas de trigo e farinhas de mandioca para o estudo (ANVISA, 2016). A Tabela 1 descreve os agrotóxicos analisados e seus respectivos limite máximo de resíduos permitidos pelos os órgãos regulamentadores. E a Tabela 2 apresenta os agrotóxicos selecionados e suas características.

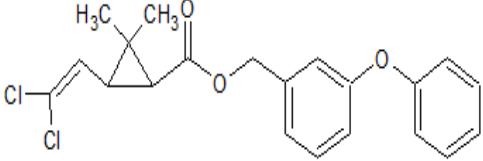
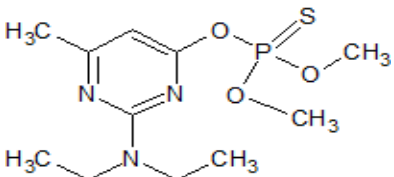
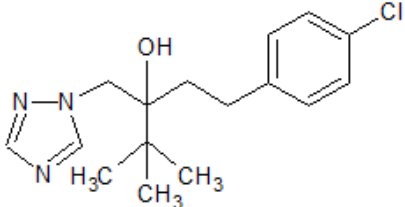
**Tabela 1.** Valores dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) permitidos pelos órgãos regulamentadores ANVISA, Codex e União Européia para os agrotóxicos selecionados de acordo com as matrizes farinha de trigo e/ou trigo e farinha de mandioca e/ou mandioca

LMR (mg kg <sup>-1</sup> )					
Agrotóxico	Farinha de trigo / trigo			Farinha de mandioca / mandioca	
	Anvisa <sup>a</sup>	Codex Alimentarius <sup>b</sup>	União Europeia (UE) <sup>c</sup>	Anvisa <sup>a</sup>	União Europeia (UE) <sup>c</sup>
Bifentrina	0,7	0,5	0,01	2	0,05
Cipermetrina	NA	2	0,3	0,05	0,05
Clorpirifós	0,2	0,1	0,05	0,1	0,05
Esfenvalerato	1	0,05	0,02	1	0,02
Permetrina	0,02	0,5	0,05	0,1	0,05
Pirimifós-metílico	5	NA	0,5	NA	0,01
Tebuconazol	0,15	0,15	0,02	0,1	0,02

NA = Não Autorizado; LMR = Limite Máximo de Resíduos <sup>a</sup> ANVISA (2016), <sup>b</sup> CODEX (2018), <sup>c</sup> EUROPEAN COMMISSION (2018)

**Tabela 2.** Propriedades químicas dos agrotóxicos selecionado

Composto	Fórmula	Grupo Químico <sup>b</sup>	Classe <sup>b</sup>	Classificação toxicológica <sup>b</sup>	Massa Molecular (g mol <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	K <sub>ow</sub> (pH 7,0, 20 °C) <sup>b</sup>	Solubilidade em água 20 °C (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	PE (°C) (760 mmHg) <sup>a</sup>
Bifentrina (Bifenthrin)		Piretróide	Inseticida, acaricida	Classe III	422,88	3,98 x 10 <sup>6</sup>	0,001	453,2 ± 45,0
Cipermetrina (Cypermethrin)		Piretróide	Inseticida	Classe III	416,3	3,55 x 10 <sup>5</sup>	0,009	511,3 ± 50,0
Clorpirifós (Chlorpyrifos)		Organofosfato	Inseticida	Classe III	350,58	5,01 x 10 <sup>4</sup>	1,05	375,9 ± 52,0
Esfenvalerato (Esfenvalerate)		Piretróide	Inseticida	Classe III	419,91	1,74 x 10 <sup>6</sup>	0,001	538,9 ± 50,0

Permetrina (Permethrin)		Piretróide	Inseticida	Classe III	391,3	$1,26 \times 10^6$	0,2	$465,9 \pm 45,0$
Pirimifós- metílico (Pirimiphos- methyl)		Organofosfato	Inseticida, acaricida	Classe III	305,33	$7,94 \times 10^3$	11	$386,5 \pm 52,0$
Tebuconazol (Tebuconazole)		Triazol	Fungicida	Classe III	307,82	$5,01 \times 10^3$	36	$476,9 \pm 55,0$

PE= Ponto de ebulição,  $K_{ow}$ = Coeficiente de partição octanol-água. **Fonte:** <sup>a</sup> CHEMSPIDER (2018); <sup>b</sup> IUPAC (2018)

## MÉTODOS DE ANÁLISE

Uma técnica que vem sendo muito utilizada na literatura para análises de resíduos de agrotóxicos em diferentes matrizes é o QuEChERS (*Quick* - rápido, *Easy* - fácil, *Cheap* - barato, *Effective* - eficaz, *Rugged* - robusto e *Safe* - seguro) (ANVISA, 2016; PRESTES *et al.*, 2009). Embora a eficiência de extração de resíduos de agrotóxicos apresentada por essa técnica seja satisfatória, ela apresenta várias etapas. Além disso, essa técnica é relativamente cara, envolvendo uma etapa de extração inicial em acetonitrila, uma etapa de extração / partição após a adição de sal e uma etapa de *clean-up* utilizando extração dispersiva em fase sólida (PRESTES *et al.*, 2009).

Como, geralmente, as outras técnicas utilizadas para a extração de agrotóxicos consomem grande quantidade de solvente e de amostra (KOLBERG *et al.*, 2011; REZAEI *et al.*, 2017) nosso grupo de pesquisa, vem desenvolvendo e aprimorando técnicas de extração e análise de agrotóxicos com o intuito de minimizar o consumo de reagentes e amostras e fornecer resultados sensíveis e confiáveis. Essas técnicas foram empregadas em diferentes matrizes como: milho (FREITAS *et al.*, 2017), arroz (ÁVILA *et al.*, 2017), cenoura (ARAÚJO *et al.*, 2016), tomate (PINHO *et al.*, 2010), leite (GOULART *et al.*, 2008), entre outros. A técnica extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) similarmente à extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura (LLE/LTP), vem apresentando bons resultados, para extração de resíduos de agrotóxicos em diferentes matrizes, (GOULART *et al.*, 2010; HELENO *et al.*, 2014 e 2015; DE PINHO *et al.*, 2010 e VIEIRA *et al.*, 2007), não necessitando, para a maioria das amostras, de nenhuma etapa de limpeza (*clean up*) dos extratos. Em função disto, geralmente, a SLE/LTP e LLE/LTP tem menor consumo de solvente orgânico e de amostra, número reduzido de etapas e confiabilidade.

Além dessas técnicas, a busca por técnicas de preparo de amostras que minimiza o uso de solventes orgânicos e possuem um alto fator de enriquecimento vem crescendo. Várias técnicas de microextração em fase líquida (LPME) e microextração em fase sólida (SPME) vem sendo propostas e adaptadas ao longo dos anos (CASTILLO; RODRÍGUEZ-VALENCIANO & GEMA FLORES, 2019; PSILLAKIS & KALOGERAKIS, 2003; SALEMI; KHALEGHIFAR & MIRIKARAM, 2019; ZHANG; ZHANG & JIAO, 2014; SOARES *et al.*, 2014 e CARLOS *et al.*, 2013). Uma das técnicas de microextração em fase líquida que se mostra uma alternativa interessante é a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME). Essa técnica oferece uma série de vantagens, como alto fator de recuperação e enriquecimento, miniaturização do uso de solventes, rapidez e simplicidade (NORONHA *et al.*, 2015; PIMENTA *et al.*, 2017). Outra alternativa para um alto fator de enriquecimento é a hifenação de duas técnicas, sendo uma de pré-extração e *clean up* e a outra de microextração, proporcionando assim, melhores fatores de pré-

concentração (SOARES *et al.*, 2015; JOVANOVA *et al.*, 2014; PETRARCA *et al.*, 2016; e ZHANG *et al.*, 2019)

Embora, se utilizada várias técnicas para o preparo de amostra na determinação de resíduos de agrotóxicos em diversas matriz, é necessário o emprego de técnica instrumental. Para compostos mais voláteis e termicamente estáveis é empregado a cromatografia gasosa (GC). Os detectores utilizados para análises de resíduos de agrotóxicos são detector por captura de elétrons (GC/DCE) (GULER *et al.*, 2010), detector fotométrico de chama (GC/FPD) (NAKSEN *et al.*, 2016), detector por ionização em chama (GC/FID) (SOUZA PINHEIRO & ANDRADE, 2009), detector de nitrogênio e fósforo (GC/NPD) (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2017) e espectrometria de massas (GC-MS) (KOLBERG *et al.*, 2011). Dentre esses detectores destaca-se o MS devido à sua habilidade em identificar com mais segurança os analitos, além de apresentar boa sensibilidade, precisão e repetibilidade (SAMSIDAR; SIDDIQUEE & SHAARANI, 2018).

## **OBJETIVOS**

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver métodos de extração e análise eficazes para determinação de resíduos de agrotóxicos em farináceos e aplicar o método desenvolvido para determinar resíduos de agrotóxicos em farinhas comercializadas em supermercados de Viçosa-MG. O estudo foi executado em duas etapas. A primeira teve como meta otimizar e validar o método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) e otimizar a hifenação desta técnica com a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para determinação de multiresíduos de agrotóxicos em farinha de mandioca por cromatografia gasosa acoplada a um espectrometro de massa (GC-MS). A segunda etapa visou otimizar e validar a técnica de extração (SLE/LTP) para determinação de multiresíduos de agrotóxicos em farinha de trigo por GC-MS.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). Relatório de Atividades de 2013 a 2015. Diário oficial da União; Poder executivo, Brasília, DF, de 25 de novembro de 2016. p. 1–246, 2016.

ARAÚJO, J. S. D. P. & LOPES, C. A. Produção de farinha de mandioca na agricultura familiar. **Manual Técnico**. p. 1–17, 2009.

CARDOSO, E. M. R., Müller, A. A., dos Santos, A. I. M., Homma, A. K. O., & Alves, R. N. B. Processamento e comercialização de produtos derivados da mandioca no nordeste paraense. **Embrapa**, p. 1–29, 2001.

CARLOS, E. A., ALVES, R. D., QUEIROZ, M. E. L. R., & NEVES, A. A. Simultaneous determination of the organochlorine and pyrethroid pesticides in drinking water by single drop microextraction and gas chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 8, p. 1217-1227, 2013.

CODEX. **Codex Alimentarius International Food Standards**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/>>. Acesso em: 3 dez. 2018.

BARRON, C.; SURGET, A. & ROUAU, X. Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. **Journal of Cereal Science**, v. 45, n. 1, p. 88–96, 2007.

BORÉM, A. & SCHEEREN, P. L. **Trigo: do plantio à colheita**. Editora UFV, ed. Viçosa, MG, 2015.

CASTILLO, M. L. R.; RODRÍGUEZ-VALENCIANO, M. & GEMA FLORES, G. P. B. New method based on Solid Phase Microextraction and Multidimensional gas chromatography-mass spectrometry to determine pesticides in strawberry jam. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p. 283–290, 2019.

SILVA, Í. R. C., CARDOSO, R. D. C. V., GÓES, J. Â. W., DRUZIAN, J. I., JÚNIOR, P. O. V., & DE ANDRADE, A. C. B. Food safety in cassava “flour houses” of Copioba Valley, Bahia, Brazil: Diagnosis and contribution to geographical indication. **Food Control**, v. 72, p. 97–104, 2017.

CHEMSPIDER. **Search and share chemistry**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com>>. Acesso em: 3 dez. 2018.

ÁVILA, M. B., FARONI, L. R. A., HELENO, F. F., QUEIROZ, M. E. L. R., & COSTA, L. P. Ozone as degradation agent of pesticide residues in stored rice grains. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 12, p. 4092–4099, 2017.

SOUZA, L. P., FARONI, L. R. A., HELENO, F. F., PINTO, F. G., QUEIROZ, M. E. L. R., & PRATES, L. H. F. Ozone treatment for pesticide removal from carrots: Optimization by response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 243, p. 435–441, 2018.

ARAÚJO, E. A., LARA, M. C. R., REIS, M. R., VIRIATO, R. L. S., ROCHA, R. A. R., GONÇALVES, R. G. L., HELENO, F. F., QUEIROZ, M. E. L. R., TRONTO, J., PINTO, F. G. Determination of haloxyfop-methyl, linuron, and procymidone pesticides in carrot using SLE-LTP Extraction and GC-MS. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 5, p. 1344–1352, 2016.

SOUZA, A. P. & ANDRADE, J. B. Development, validation and application of a SDME/GC-FID methodology for the multiresidue determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. **Talanta**, v. 79, n. 5, p. 1354–1359, 2009.

EMBRAPA. **Cultivo de trigo**. Disponível em: <[https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistemasdeproducao16\\_1galceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_count=1&p\\_r\\_p\\_-76293187\\_sistemaProducaoId=3704&p\\_r\\_p\\_-996514994\\_topicoId=1](https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducao16_1galceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=3704&p_r_p_-996514994_topicoId=1)>. Acesso em: 3 dez. 2018.

EMBRAPA. **Prosa Rural - Armazenamento da farinha de mandioca**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2434909/prosa-rural---armazenamento-da-farinha-de-mandioca>>. Acesso em: 3 jan. 2019.

EUROPEAN COMMISSION. **Pesticides database - European Commission (EU)**. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>>. Acesso em: 3 dez. 2018.

FAO. Save and Grow: Cassava A guide to sustainable production intensification. p. 1–142, 2013.

FAO. Food Outlook- Biannual Report on global Food Markets. **Global information and early warning system on food and agriculture**, n. November, p. 1–108, 2018.

FREITAS, R. S., FARONI, L. R. A., QUEIROZ, M. E. L. R., HELENO, F. F., & PRATES, L. H. F. Degradation kinetics of pirimiphos-methyl residues in maize grains exposed to ozone gas. **Journal of Stored Products Research**, v. 74, p. 1–5, 2017.

PETRARCA, M. H., FERNANDES, J. O., GODOY, H. T., & CUNHA, S. C. Multiclass pesticide analysis in fruit-based baby food : A comparative study of sample preparation techniques previous to gas chromatography – mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 212, p. 528–536, 2016.

PINHO, G. P., NEVES, A. A., QUEIROZ, M. E. L. R., & SILVÉRIO, F. O. Pesticide determination in tomatoes by solid-liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 251–256, 2010.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á., SOCAS-RODRÍGUEZ, B., HERRERO, M., HERRERA-HERRERA, A. V., & HERNÁNDEZ-BORGES, J. Dissipation kinetics of organophosphorus pesticides in milled toasted maize and wheat flour (gofio) during storage. **Food Chemistry**, v. 229, p. 854–859, 2017.

GOULART, S. M., QUEIROZ, M. E. L. R., NEVES, A. A., & QUEIROZ, J. H. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 1320–1323, 2008.

GOULART, S. M., ALVES, R. D., NEVES, A. A., QUEIROZ, J. H., ASSIS, T. C., & QUEIROZ, M. E. L. R. Optimization and validation of liquid-liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 671, n. 1–2, p. 41–47, 2010.

GULER, G. O., CAKMAK, Y. S., DAGLI, Z., AKTUMSEK, A., & OZPARLAK, H. Organochlorine pesticide residues in wheat from Konya region, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1218–1221, 2010.

HELENO, F. F., QUEIROZ, M. E. L. R., NEVES, A. A., FREITAS, R. S., FARONI, L. R. A., & OLIVEIRA, A. F. Effects of ozone fumigation treatment on the removal of residual difenoconazole from strawberries and on their quality. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 49, n. 2, p. 94–101, 2014.

IUPAC. **Pesticide Properties Database**. Disponível em: <[https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/168.htm?fbclid=IwAR1CMVd\\_JXCj2N6siNKZT97xCbgzFzDnsKw\\_nm9AFM Mp4LV8cu6roHIFqTo](https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/168.htm?fbclid=IwAR1CMVd_JXCj2N6siNKZT97xCbgzFzDnsKw_nm9AFM Mp4LV8cu6roHIFqTo)>. Acesso em: 12 out. 2018.

JOVANOVIĆ, P., GUZSVÁNY, V., FRANKO, M., LAZIĆ, S., SAKAČ, M., MILOVANOVIĆ, I., E NEDELJKOVIĆ, N. Development of multiresidue DLLME and QuEChERS based LC – MS / MS method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey liqueur. **Food research international**, v. 55, p. 11–19, 2014.

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**, v. 125, n. 4, p. 1436–1442, 2011.

LAFIANDRA, D.; RICCARDI, G. & SHEWRY, P. R. Improving cereal grain carbohydrates for diet and health. **Journal of Cereal Science**, v. 59, n. 3, p. 312–326, 2014.

LÉOTARD, G., DUPUTIÉ, A., KJELLBERG, F., DOUZERY, E. J., DEBAIN, C., DE GRANVILLE, J. J., & MCKEY, D. Phylogeography and the origin of cassava: New insights from the northern rim of the Amazonian basin. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, n. 1, p. 329–334, 2009.

NAKSEN, W., PRAPAMONTOL, T., MANGKLABRUKS, A., CHANTARA, S., THAVORNYUTIKARN, P., ROBSON, M. G., & PANUWET, P. A single method for detecting 11 organophosphate pesticides in human plasma and breastmilk using GC-FPD. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1025, p. 92–104, 2016.

NORONHA, L., NEVES, A. A., QUEIROZ, M. E. L. R., & OLIVEIRA, A. F. Evaluation of the Effects of Hofmeister Series on Salting Out in the Determination of Organophosphorous Pesticides and Pyrethroids by LDS/DLLME. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 9, p. 1897-1901, 2015.

OLIVEIRA NETO, A. A.; SANTOS, C. M. R. A cultura do trigo. **Conab**, p. 1–220, 2017.

PIMENTA, G. G., QUEIROZ, M. E. L. R., VICTOR, R. P., NORONHA, L. M., NEVES, A. A., OLIVEIRA, A. F., & HELENO, F. F. DLLME-GC/ECD method for the residual analysis of parathion-methyl and its application in the study of the UV-photodegradation process. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 11, p. 2045–2053, 2017.

PINTO-ZEVALLOS, D. M.; PAREJA, M. & AMBROGI, B. G. Current knowledge and future research perspectives on cassava (*Manihot esculenta* Crantz) chemical defenses: An agroecological view. **Phytochemistry**, v. 130, p. 10–21, 2016.

PRESTES, O. D., FRIGGI, C. A., ADAIME, M. B., & ZANELLA, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009.

PSILLAKIS, E. & KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 565-574, 2003.

REZAEI, M., SHARIATIFAR, N., SHOEIBI, S., AHMADI, M. A., & KHANIKI, G. J. Simultaneous determination of residue from 58 pesticides in the wheat flour consumed in Tehran, Iran by GC/MS. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 3, p. 1050–1060, 2017.

SAMSIDAR, A.; SIDDIQUEE, S. & SHAARANI, S. M. A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, n. November 2017, p. 188–201, 2018.

SALEMI, A.; KHALEGHIFAR, N. & MIRIKARAM, N. Optimization and comparison of membrane-protected micro-solid-phase extraction coupled with dispersive liquid-liquid microextraction for organochlorine pesticides using three different sorbents. **Microchemical Journal**, v. 144, n. September 2018, p. 215–220, 2019.

SHEWRY, P. R. & HEY, S. Do “ancient” wheat species differ from modern bread wheat in their contents of bioactive components? **Journal of Cereal Science**, v. 65, p. 236–243, 2015.

SOARES, C. E., NEVES, A. A., QUEIROZ, M. E. L. R., OLIVEIRA, A. F., COSTA, A. I. G., ASSIS, R. C., & ANDRADE, C. E. O. Single drop microextraction: a sensitive multiresidue method for determination of pesticides in water using GC/ECD. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 11, p. 2016-2025, 2014.

SOARES, C. E., NEVES, A. A., QUEIROZ, M. E. L. R., OLIVEIRA, A. F., COSTA, A. I. G., ASSIS, R. C., ANDRADE, C. E. O. Determination of pesticides in soil using a hyphenated extraction technique. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 9, p. 1790-1797, 2015.

VIEIRA, H. P., NEVES, A. A., & QUEIROZ, M. E. L. R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 535-540, 2007

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

ZHANG, Z., DONG, M., HAO, X., HAN, L., SONG, S., E YAO, W. Evaluation of cleanup procedures in pesticide multi-residue analysis with QuEChERS in cinnamon bark. **Food Chemistry**, v. 276, p. 140–146, 2019.

## OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO SLE/LTP E OTIMIZAÇÃO DA HIFENAÇÃO SLE/LTP-DLLME PARA DETERMINAÇÃO MULTIRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FARINHA DE MANDIOCA

### RESUMO

No último relatório publicado pela ANVISA, em 2016, foi reportada a presença de resíduos de agrotóxicos em farinha de mandioca em níveis inferiores ou iguais aos limites máximos (LMRs). O método QuEChERS (*Quick* - rápido, *Easy* - fácil, *Cheap* - barato, *Effective* - eficaz, *Rugged* - robusto e *Safe* – seguro), é o método oficial empregado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos, embora não apresente alto fator de enriquecimento. No melhor do nosso conhecimento, na literatura não foram encontrados outros métodos para determinação multiresíduos de agrotóxicos em farinha de mandioca. Diante disso, este trabalho teve como objetivo otimizar e validar o método extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) e otimizar a hifenação das técnicas SLE/LTP e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), para determinar resíduos de agrotóxicos em farinha de mandioca por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). O método SLE/LTP otimizado consistiu em acrescentar a 2,0000 g de farinha de mandioca, 3,00 mL de água destilada e 4,00 mL de acetonitrila (ACN), agitar essa mistura em vórtex por 60 s, centrifugar por 9 min (1724 g) e refrigerar por 6 h em freezer a -20 °C. Nessas condições as fases são separadas e o extrato orgânico contendo os agrotóxicos foi analisado por GC-MS. A hifenação das técnicas SLE/LTP e DLLME otimizada para melhorar a sensibilidade do método consiste em adicionar 2 mL do extrato obtido da SLE/LTP, a um tubo falcon contendo 0,2500 g de C18, agitar por 1 min em vórtex e centrifugar por 5 min (2970 g), retirar 1,00 mL do sobrenadante e adicionar em tubos de ensaio de 10 mL, contendo 4,00 mL de uma solução aquosa de NaCl a 5%. Em seguida adicionar 120 µL de tolueno como solvente extrator, agitar em vórtex por 60 s, centrifugar por 5 min (1724 g). Após a separação das fases retirou-se fase orgânica formada na superfície da solução e analisou-se por GC-MS. O método otimizado SLE/LTP foi validado, avaliando os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão. Os limites de detecção foram entre 0,6 a 6,2 µg kg<sup>-1</sup> e os limites de quantificação entre 1,8 a 18,7 µg kg<sup>-1</sup>, valores abaixo dos limites de resíduos permitidos (LMRs). Os valores de recuperação ficaram no intervalo de 94,1 a 107,9%, com precisão ≤ 20%. Foi estudado também o efeito de matriz dos

agrotóxicos pirimifós-metílico, clorpirifós, tebuconazol, bifentrina e permetrina que, para a maioria dos agrotóxicos obteve um efeito de matriz positivo, aumentando o sinal cromatográfico. A aplicação do método otimizado e validado (SLE/LTP-GC-MS) nas amostras de farinha de mandioca adquiridas em supermercados e feiras de Viçosa-MG, não apresentaram presença de agrotóxicos. Este método se mostrou viável para determinação dos analitos em amostras de farinha de mandioca além de ser simples, eficaz, com baixo consumo de solvente e realizar a extração em etapa única. O método hifenado otimizado será validado futuramente, visto que a hifenação oferece alto fator de enriquecimento, podendo detectar concentrações muito baixas.

## ABSTRACT

In the last report published by ANVISA in 2016, the presence of pesticide residues in cassava flour at levels below or equal to the maximum limits (MRLs) established by the Brazilian Health Ministry and ANVISA was reported. The QuEChERS method - Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe, is the official method used to determine the pesticide residues in food, although it does not present a high enrichment factor. In the literature, no other method have been found for the determination of multiresidues of pesticides in cassava flour. The aim of this work was to optimize and validate the solid-liquid extraction with low temperature partitioning (SLE/LTP) and to optimize the hyphenation between SLE/LTP and liquid-liquid dispersive microextraction (DLLME) techniques to determine residues of pesticides in cassava flour by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The optimized SLE/LTP method consists of adding 2.0000 g of cassava flour, 3.00 mL of distilled water and 4.00 mL of acetonitrile (ACN), stirring of the mixture for 60 s in vortex, centrifuging for 9 min (at 1724 g) and freezing for 6 h at  $-20^{\circ}$  C. Under these conditions the phases are separated and the organic extract containing the pesticides was analyzed by GC-MS. The hyphenation of SLE/LTP and DLLME optimized techniques to improve the sensitivity of the method consists in to add 2.00 mL of the extract obtained from SLE / LTP to a falcon tube containing 0.2500 g of C18, stirring for 1 min in vortex and centrifuging for 5 min (2970 g), to transfer 1 mL of the supernatant and add in 10 glass tube containing 4 mL of a 5%-NaCl aqueous solution. Then add 120  $\mu$ L of toluene, as the extracting solvent, the mixture was vortexed for 60 s, centrifuge for 5 min (1724 g). After phase separations, the organic phase formed on the surface of the solution was removed and analyzed by GC-MS. The optimized SLE/LTP method was validated, evaluating the following parameters: selectivity, linearity, limits of detection and quantification, accuracy and precision. The limit of detection were between 0.6 and 6.2  $\mu$ g  $\text{kg}^{-1}$  and the limit of quantification between 1.88 and 18.7  $\mu$ g  $\text{kg}^{-1}$ , these values are below the permitted residue limits (LMRs). The recovery values were in the range of 94.1 to 107.9%, with precision  $\leq$  20%. The matrix effect of the pyrimiphos-methyl, chlorpyrifos, tebuconazole, bifenthrin and permethrin pesticides was also studied, which for most pesticides had a positive matrix effect, increasing the chromatographic signal. The application of the optimized and validated method (SLE/LTP-GC-MS) in cassava flour samples purchased in supermarkets and fairs of Viçosa-MG, showed no presence of pesticides. This method proved to be feasible for determination of the analytes in samples of cassava flour besides being simple, efficient, to present a low solvent consumption and perform the extraction in a single step. The optimized hyphenated method will be validated in the future, since the hyphenation offers a high enrichment factor, being able to detect very low concentrations.

## 1.1. INTRODUÇÃO

A cultura de mandioca vem ocupando um lugar de destaque em vários países, sendo os países da África, Ásia e América do Sul os principais produtores (FAO, 2018).

A mandioca, também conhecida por nomes populares como macaxeira, aipim, tornou-se base de uma variedade de produtos processados, desde a fabricação de alimentos e produtos farmacêuticos até a produção de madeira compensada, papel e bioetanol. Embora a produção de mandioca tenha apresentado um crescimento menor, se comparado ao aumento populacional, o crescimento observado nos últimos anos ocasionou mudanças nos monocultivos, no emprego de genótipos de maior rendimento, no maior uso de irrigação e de agrotóxicos, acarretando riscos para esta cultura, incluindo surtos de pragas e doenças e depleção do solo (FAO, 2013).

A forma predominante de controle e prevenção das doenças e pragas agrícolas tem sido o uso de agrotóxicos, e confirmando o aumento do emprego de agrotóxicos nesta cultura, em 2016, o último relatório publicado pela ANVISA reportou a presença de resíduos de agrotóxicos em farinha de mandioca em níveis inferiores ou iguais aos limites máximos de resíduos (LMRs) estabelecidos pela ANVISA (ANVISA, 2016). A presença de resíduos de agrotóxicos em farinha de mandioca pode estar relacionada à recente expansão da sua produção, uma vez que, pequenos agricultores raramente pulverizam agrotóxicos em plantações de mandioca, pelo fato do controle químico não ser economicamente viável (PINTO-ZEVALLOS; PAREJA & AMBROGI, 2016).

No melhor do nosso conhecimento, não existe nenhum método descrito na literatura indexada para determinação de resíduos de agrotóxicos em farinha de mandioca. Geralmente o método de extração mais utilizado para análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos é o QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*, isto é, rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro), desenvolvido por Anastassiades *et al.* em 2003. Outra técnica que vem sendo empregada com sucesso para extração de agrotóxicos em diversas matrizes é a extração com partição em baixa temperatura (LTP), que foi introduzida e otimizada por Lentza-Rizos *et al.* em 2001 para análise de inseticidas organofosforados e herbicidas triazina em azeite virgem. Este método foi aplicado posteriormente para determinação de resíduos de agrotóxicos e de outros contaminantes em diferentes matrizes (GOULART *et al.*, 2008; ÁVILA *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2018; FREITAS *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2017; SOUSA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2018 e SANTANA *et al.*, 2018). Este método apresenta vantagens como baixo consumo de solvente, e, para a maioria das amostras não necessita de etapas de *clean-up*, muitas vezes utilizadas em outros métodos. A técnica consiste na partição dos analitos entre a fase aquosa e a orgânica resultante do abaixamento de temperatura. Porém uma desvantagem dessas técnicas, QuEChERS e LTP, é que essas não apresentam um alto fator de enriquecimento. Uma alternativa

seria empregar microtécnicas de extração, ou a hifenação de duas técnicas, sendo uma de pré-extração e clean up e a outra de microextração, proporcionando assim, melhores fatores de pré-concentração (SOARES *et al.*, 2015; JOVANOVA *et al.*, 2014; PETRARCA *et al.*, 2016; ZHANG; ZHANG & JIAO, 2014 e ZHANG *et al.*, 2019).

A hifenação da LTP com a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), que é uma técnica que oferece uma série de vantagens em relação às técnicas correntes, como alto fator de recuperação e enriquecimento, miniaturização do uso de solventes, rapidez e simplicidade (NORONHA *et al.*, 2015; PIMENTA *et al.*, 2017) se mostra como uma alternativa interessante.

Dada a importância de se monitorar a quantidade de resíduos de agrotóxicos em farinha de mandioca, o presente estudo teve como objetivo otimizar e validar o método extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) e otimizar a hifenação desta técnica com microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), para determinar resíduos de agrotóxicos em farinha de mandioca por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

## **1.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **1.2.1. Reagentes e soluções**

Os agrotóxicos bifentrina (92,2%, FMC), cipermetrina (94,3%, Sigma-Aldrich), clorpirifós (99,0%, Sygenta), esfenvalerato (99,0%, Sigma-Aldrich), permetrina (92,4, Sygenta), pirimifós-metílico (99,5%, Sigma-Aldrich) e tebuconazol (99,3%, Sigma-Aldrich) foram empregados neste estudo. Foram preparadas soluções-estoque dos padrões de cada agrotóxico nas concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> em acetonitrila 99,9% grau HPLC (Sigma-Aldrich). Outras soluções de trabalho usadas foram preparadas a partir da solução estoque, por meio de diluições. Todas as soluções foram preparadas em acetonitrila e armazenadas em *freezer* na temperatura de -20 °C (± 2 °C).

### **1.2.2. Equipamentos**

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás (Shimadzu) equipado com um detector espectrômetro de massa (MS) tipo quadrupolo (GCMS-QP2020), um sistema de injeção (AOC-20i.), marca Shimadzu. Um banho ultrassônico (Sanders) operado a 280W e 40 kHz. Outro equipamento incluiu uma balança analítica (Shimadzu), um vórtex misturador (Certomat<sup>®</sup> MV) e uma centrífuga (Quimis<sup>®</sup>, ISO 8001).

### 1.2.3. Condições cromatográficas

A separação cromatográfica dos analitos foi realizada em uma coluna capilar (SH-Rtx-5MS) cuja fase estacionária é composta de 5% fenil e 95% dimetilpolissiloxano com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura do filme. O hélio (grau de pureza 99,999%, White Martins) foi utilizado como gás carreador a uma vazão de 1,08  $\text{mL min}^{-1}$ . A programação de temperatura da coluna consistia em manter a temperatura inicial a 150 °C por 1 min, aquecer a uma taxa de 30 °C  $\text{min}^{-1}$  até 210 °C, manter esta temperatura por 1 min, aumentar novamente a uma taxa de 30 °C  $\text{min}^{-1}$  até 250 °C, manter esta temperatura por 2 min, aquecer a uma taxa de 20 °C  $\text{min}^{-1}$  até 290 °C, e manter esta temperatura por 5 min. O tempo total de análise foi de 14,33 min. A temperatura do injetor foi mantida a 300 °C. Um volume de 1  $\mu\text{L}$  de amostra foi injetado no cromatógrafo, usando o modo de injeção splitless.

O espectrômetro de massas (MS) foi operado em modo de ionização positiva (PCI), impacto de elétrons 70 eV. Um tempo de corte de 5,0 min foi definido para evitar danos ao instrumento. As temperaturas da interface do detector foram fixadas em 300 °C, e a fonte de ionização em 200 °C. Antes de definir as condições do modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), foi feita uma análise no modo *Scan ou TIC (total ion chromatogram - cromatograma de íons totais)*, obtendo os tempos de retenção ( $t_R$ ) e os espectros de massas de todos os agrotóxicos conforme a Tabela 3.

A faixa de concentração da curva analítica foi obtida por superposição de matriz no intervalo de 16 a 266  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para bifentrina, esfenvalerato, permetrina, pirimifós-metílico e tebuconazol e 20 a 270  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para cipermetrina e clorpirifós.

No cromatograma, a presença de picos duplos para o agrotóxico permetrina e pico triplo para a cipermetrina é atribuído a conversão destes compostos a isômeros durante a injeção no cromatógrafo a gás (MASTOVSKA, 2004). A quantificação foi feita usando a soma das áreas dos picos isômeros.

**Tabela 3.** Tempo de retenção e íons monitorados nas respectivas janelas de tempo para os agrotóxicos nas análises por GC-MS no modo SIM

Nr.	Agrotóxico	t <sub>R</sub> (min)	Íons monitorados (m/z)	Janela do tempo (min)
1	Pirimifós-metílico	5,71	290 + 246 + 305	5,0-5,8
2	Clorpirifós	5,97	97 + 197 +199	5,8-6,2
3	Tebuconazol	8,54	125 + 70 + 250	8,4-8,8
4	Bifentrina	8,93	181 + 165 + 166	8,8-9,5
5	Permetrina	10,30 / 10,41	183 + 163 + 165	10,23-10,7
6	Cipermetrina	11,16 / 11,25 / 11,35	163 + 181 + 165	11,0-12,0
7	Esfenvalerato	12,55	125 + 167 + 225	12,4-13,2

t<sub>R</sub> = tempo de retenção

#### 1.2.4. Amostras

Foram adquiridas, em supermercados de Viçosa–MG, farinhas de mandioca isentas de agrotóxicos para o desenvolvimento desse trabalho. A ausência dos agrotóxicos foi previamente confirmada por meio da análise por cromatografia gasosa (GC-MS). Nas etapas de otimização e validação as matrizes foram fortificadas com solução padrão contendo os princípios ativos em estudo, preparados em acetonitrila. O método otimizado e validado foi aplicado em 7 marcas diferentes em mercados e feiras de Viçosa.

#### 1.2.5. Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP)

##### 1.2.5.1. Extração dos agrotóxicos em farinha de mandioca

As farinhas de mandioca isentas de agrotóxicos e utilizadas neste trabalho foram armazenadas a temperatura ambiente até o momento das análises. Para as análises, 2,0000 g de farinha de mandioca, medida em balança analítica com precisão de  $1 \times 10^{-4}$  g, foram colocados em frascos de vidro transparente com capacidade de 22 mL, sendo fortificados com 100 µL das soluções de trabalho contendo os setes agrotóxicos. As amostras foram fortificadas com 100 µg kg<sup>-1</sup> de bifentrina, permetrina e tebuconazol e 400 µg kg<sup>-1</sup> de pirimifós-metílico, clorpirifós, cipermetrina e esfenvalerato. Após adição dos analitos, as amostras foram agitadas em vórtex (certomat® MV) por 10 s e deixadas em repouso por 2 h para que houvesse maior interação dos agrotóxicos com a amostra. Posteriormente foram adicionados às amostras, volumes de 3 mL de água e 4 mL de acetonitrila. Estes volumes foram previamente estudados para determinar qual a

quantidade mínima e máxima que poderia ser empregada para fazer a extração. Em seguida, as misturas foram agitadas por 1 min em vórtex, centrifugadas a 1724 g por 9 min e colocadas em freezer a -20 °C por 6 horas. Após a separação das fases por congelamento da farinha juntamente com a fase aquosa, foram removidos 1,50 mL da fase orgânica contendo os agrotóxicos e colocados diretamente em frascos de análise (*vial*). Os extratos foram armazenados em *freezer*, até o momento da análise. Os extratos foram analisados por GC-MS nas condições analíticas previamente otimizadas.

#### 1.2.5.2. Otimização do método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LPT)

A otimização do método de extração SLE/LTP foi realizada por dois planejamentos fatoriais usando ensaios experimentais para avaliar as melhores respostas cromatográficas dos agrotóxicos. A otimização inicial foi feita utilizando um planejamento fatorial completo  $2^2$ , com ponto central (n=3), envolvendo duas repetições, para avaliar o volume de solvente extrator e o volume de água destilada (Tabela 4) a ser adicionado à farinha. No segundo planejamento as variáveis estudadas foram o tempo de agitação, de centrifugação e de congelamento. Foi feita uma otimização utilizando o planejamento fatorial completo  $2^3$ , com ponto central (n=3), envolvendo duas repetições (Tabela 5). O modelo para ambos os planejamentos foi gerado pelo software de estatística (Statistica, versão 8.0) a fim de descrever a influência das combinações das variáveis testadas sobre as respostas cromatográficas.

**Tabela 4.** Planejamento fatorial completo  $2^2$ , com ponto central n=3, utilizado para otimização da técnica SLE/LTP para determinação de resíduos de agrotóxicos em farinha de mandioca

Ensaio	Volume de água destilada (mL)		Volume de ACN (mL)	
	Real	Código	Real	Código
1 e 8	3,0	-	4,0	-
2 e 9	5,0	+	4,0	-
3 e 10	3,0	-	6,0	+
4 e 11	5,0	+	6,0	+
5 e 12	4,0	0	5,0	0
6 e 13	4,0	0	5,0	0
7 e 14	4,0	0	5,0	0

**Tabela 5.** Planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>, com ponto central n=3, utilizado para otimização dos métodos SLE/LTP para farinha de mandioca

Ensaio	Tempo de agitação (s)		Tempo de centrifugação (min)		Tempo de congelamento (h)	
	Real	Código	Real	Código	Real	Código
1 e 12	30,0	-	3,0	-	4,0	-
2 e 13	60,0	+	3,0	-	4,0	-
3 e 14	30,0	-	9,0	+	4,0	-
4 e 15	60,0	+	9,0	+	4,0	-
5 e 16	30,0	-	3,0	-	6,0	+
6 e 17	60,0	+	3,0	-	6,0	+
7 e 18	30,0	-	9,0	+	6,0	+
8 e 19	60,0	+	9,0	+	6,0	+
9 e 20	45,0	0	6,0	0	5,0	0
10 e 21	45,0	0	6,0	0	5,0	0
11 e 22	45,0	0	6,0	0	5,0	0

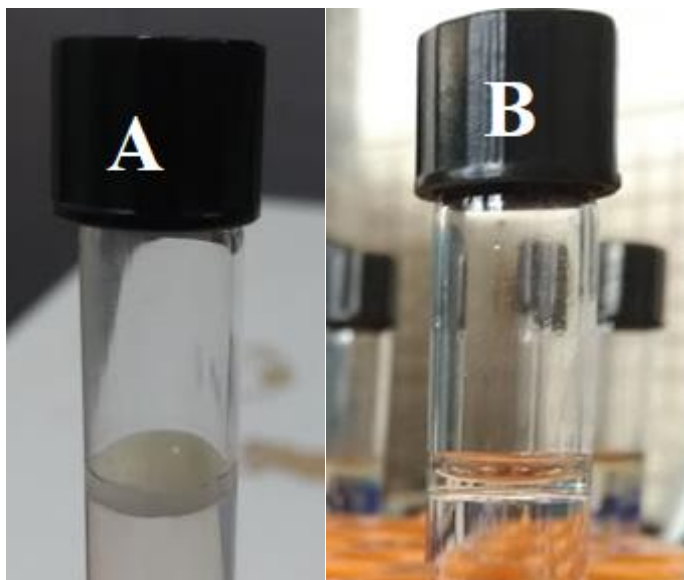
#### 1.2.6. Hifenação das técnicas de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) com a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

A extração dos resíduos de agrotóxicos em farinha de mandioca foi realizada com acetonitrila aplicando o método SLE/LTP descrita no item 1.2.5.1. Posteriormente, o extrato foi submetido aos procedimentos de DLLME e analisado por GC-MS, visto que essa técnica oferece alto fator de enriquecimento.

##### 1.2.6.1. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) dos agrotóxicos em farinha de mandioca

Foram realizados testes preliminares para a microextração DLLME. O primeiro teste consistiu em eliminar o efeito de emulsão da matriz observada após o procedimento da DLLME, no qual um anel branco formado na camada superior, impossibilitou a extração da fase orgânica. Para eliminar esse efeito, foi alterada a força iônica do meio, empregando o cloreto de sódio a 5% (m/v) na fase aquosa para a realização da microextração DLLME (ALVES, 2014). A Figura 1 mostra o procedimento DLLME com efeito de emulsão na camada superior (A) e o resultado do procedimento DLLME com a adição de NaCl na fase aquosa (B). O segundo teste consistiu em avaliar a inclusão de uma etapa de *clean up* ao processo, empregando adsorventes. Aos extratos obtidos pela SLE/LTP, foram adicionados diferentes sorventes antes da extração por DLLME. Foram testados o C18 (octadecilsiloxano), PSA (amina secundária primária), Celite, Sílica e

Florisil (silicato de magnésio). A escolha do sorvente foi determinada por GC-MS, avaliando o extrato final que não teria pico interferente com os analitos em estudo. Após definir qual o melhor sorvente, a etapa de *clean-up* foi de acordo com o método desenvolvido por KOLBERG *et al.* (2011), que consistia em utilizar 0,2500g do sorvente, agitar por 1 min em vortex e centrifugar por 5 min com velocidade de 2970 g.



**Figura 1.** Resultado do procedimento DLLME em extrato de acetonitrila obtida da SLE/LTP de farinha de mandioca com efeito de emulsão (A) e da DLLME em extrato de acetonitrila obtida da SLE/LTP de farinha de mandioca com adição de NaCl 5% (B).

O procedimento DLLME consistiu em adicionar 2,00 mL da fase orgânica obtida pelo processo de extração SLE/LTP, em tubos falcon com 15 mL capacidade, contendo 0,2500 g de C18. Estes tubos foram, posteriormente agitados por 1 min em vórtex e centrifugados por 5 min com velocidade de 2970 g (KOLBERG *et al.*, 2011). Em seguida, foi recolhido 1 mL do sobrenadante (fase extratora) e adicionado em tubos de ensaio de 10 mL, contendo 5,00 mL de uma solução aquosa de NaCl a 5%. Em seguida foram adicionados 120  $\mu$ L de tolueno, solvente extrator, ocorrendo a dispersão deste nas amostras. Estas foram homogeneizadas em vórtex, por 60 segundos, centrifugadas por 5 min a 1724 g para separação das fases. Cem microlitros (100  $\mu$ L) da fase orgânica formada na superfície da solução aquosa de NaCl foram retirados e armazenados em um frasco de vidro de 2,0 mL (*vial*), com insert redutor de volume (150  $\mu$ L). Os extratos foram analisados por GC-MS nas condições analíticas previamente estabelecidas. Nessa etapa de DLLME foram otimizados o volume de solvente extrator e o volume de solução aquosa de NaCl, as demais condições usadas na extração foram de acordo com o trabalho desenvolvido por NORONHA *et al.* (2015).

### 1.2.6.2. Otimização do método de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Para avaliar os fatores volume de solvente extrator tolueno e volume de solução aquosa de NaCl do método de DLLME foi realizado um planejamento composto central (PCC)  $2^2$ , envolvendo duas repetições em cada ponto, incluindo os 3 pontos centrais. Os valores reais das variáveis independentes foram convertidos em valores adimensionais (volume de tolueno 113,8 e 156,2 mL, e volume de água 3,6 e 6,4 mL). Para calcular os efeitos principais, quadráticos e das relações entre os fatores, foi realizada a análise de variância (ANOVA) usando o *software* de estatística (Statistica, versão 8.0), que descreveu a influência da combinação das duas variáveis testadas sobre as respostas cromatográficas. Os dados do planejamento são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Planejamento composto central (PCC)  $2^2$ , utilizado para otimização do método DLLME para farinha de mandioca

Ensaio	Volume de Tolueno ( $\mu\text{L}$ )		Volume de solução aquosa de NaCl (mL)	
	Real	Código	Real	Código
1 e 12	120,0	-	4,0	-
2 e 13	120,0	-	6,0	+
3 e 14	150,0	+	4,0	-
4 e 15	150,0	+	6,0	+
5 e 16	113,8	$-\alpha$	5,0	0
6 e 17	156,2	$+\alpha$	5,0	0
7 e 18	135,0	0	3,6	$-\alpha$
8 e 19	135,0	0	6,4	$+\alpha$
9 e 20	135,0	0	5,0	0
10 e 21	135,0	0	5,0	0
11 e 22	135,0	0	5,0	0

$$\alpha = 1,414$$

### 1.2.7. Validação do método SLE/LTP

A validação do método SLE/LTP otimizado seguiu os critérios estabelecidos pelo órgãos regulamentadores ANVISA, Resolução RDC n° 166/17 (ANVISA, 2017), INMETRO, DOQ-CCGRE-008 (INMETRO, 2018) e MAPA, 2011. As figuras de mérito avaliadas foram seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, precisão e efeito de matriz.

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas dos extratos das amostras de farinha de mandioca isenta (branco analítico) com os cromatogramas dos extratos das amostras de farinha de mandioca fortificadas com os agrotóxicos, bifentrina, cipermetrina, clorpirifós, esfenvalerato, permetrina, pirimifós-metílico e tebuconazol.

A linearidade do método SLE/LTP foi avaliada por curvas analíticas que foram construídas plotando-se um gráfico relacionando a área do analito de interesse com suas respectivas concentrações. A linearidade foi determinada com base no coeficiente de determinação ( $r^2$ ), coeficiente de correlação ( $r$ ) e gráfico de resíduos.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram definidos em termos do desvio-padrão de medidas do branco analítico em relação a inclinação da curva analítica, calculados conforme as Equações 1 e 2.

$$LD = 3,3 \frac{s}{S} \quad (\text{Equação 1})$$

$$LQ = 10 \frac{s}{S} \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo:  $s$  = Desvio padrão das áreas obtidas para o branco da matriz e  $S$  = Inclinação da curva analítica.

A exatidão do método foi obtida por ensaios de recuperação, realizados em três concentrações diferentes e em triplicata (ANVISA, 2017). A porcentagem de recuperação (%R) foi calculada conforme a Equação 3.

$$\%R = \left[ \frac{C_E \times 100}{C_R} \right] \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:  $C_E$  = Média das concentrações obtidas experimentalmente (calculadas por meio das equações da reta de cada analito, obtidas pelas curvas analíticas) e  $C_R$  = Concentração real (concentração em que as amostras foram fortificadas).

A precisão do método SLE/LTP otimizado para determinação de resíduos em farinha de mandioca foi avaliada pelos coeficientes de variação obtidos nos ensaios de repetitividade e de precisão intermediária. O coeficiente de variação (CV) foi calculado conforme a Equação 4.

$$CV = \left( \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \right) \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:  $s$  = Desvio padrão das concentrações obtidas experimentalmente para o analito de interesse e  $\bar{x}$  = média das concentrações obtidas experimentalmente para o analito de interesse.

Os experimentos realizados para o estudo de repetitividade do método foi executado em triplicata, com 3 diferentes concentrações dos analitos (intra-dia) (ANVISA, 2017). A precisão intermediária foi realizada pelo mesmo analista e os mesmos equipamentos utilizados em 3 dias diferentes (dia 1, dia 3 e dia 5).

A avaliação do efeito de matriz foi realizada comparando as curvas analíticas de análises cromatográficas das soluções padrão preparadas em acetronitrila e nos extratos orgânicos da farinha de mandioca insenta de agrotóxicos, obtidos após a realização da extração SLE/LTP (PINHO *et al.*, 2009). O efeito de matriz percentual (%EM) foi calculado conforme a Equação 5 (KWON *et al.*, 2012).

$$\%EM = \left[ \frac{a_E - a_S}{a_S} \right] \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:  $a_E$  = Inclinação da curva analítica de cada agrotóxico preparada em extrato da matriz e  $a_S$  = Inclinação da curva analítica de cada agrotóxico preparada em solvente puro.

### 1.2.8. Aplicação do método

O método otimizado e validado foi aplicado em sete amostras de farinha de mandioca de diversas marcas adquiridas em supermercados e feiras de Viçosa-MG.

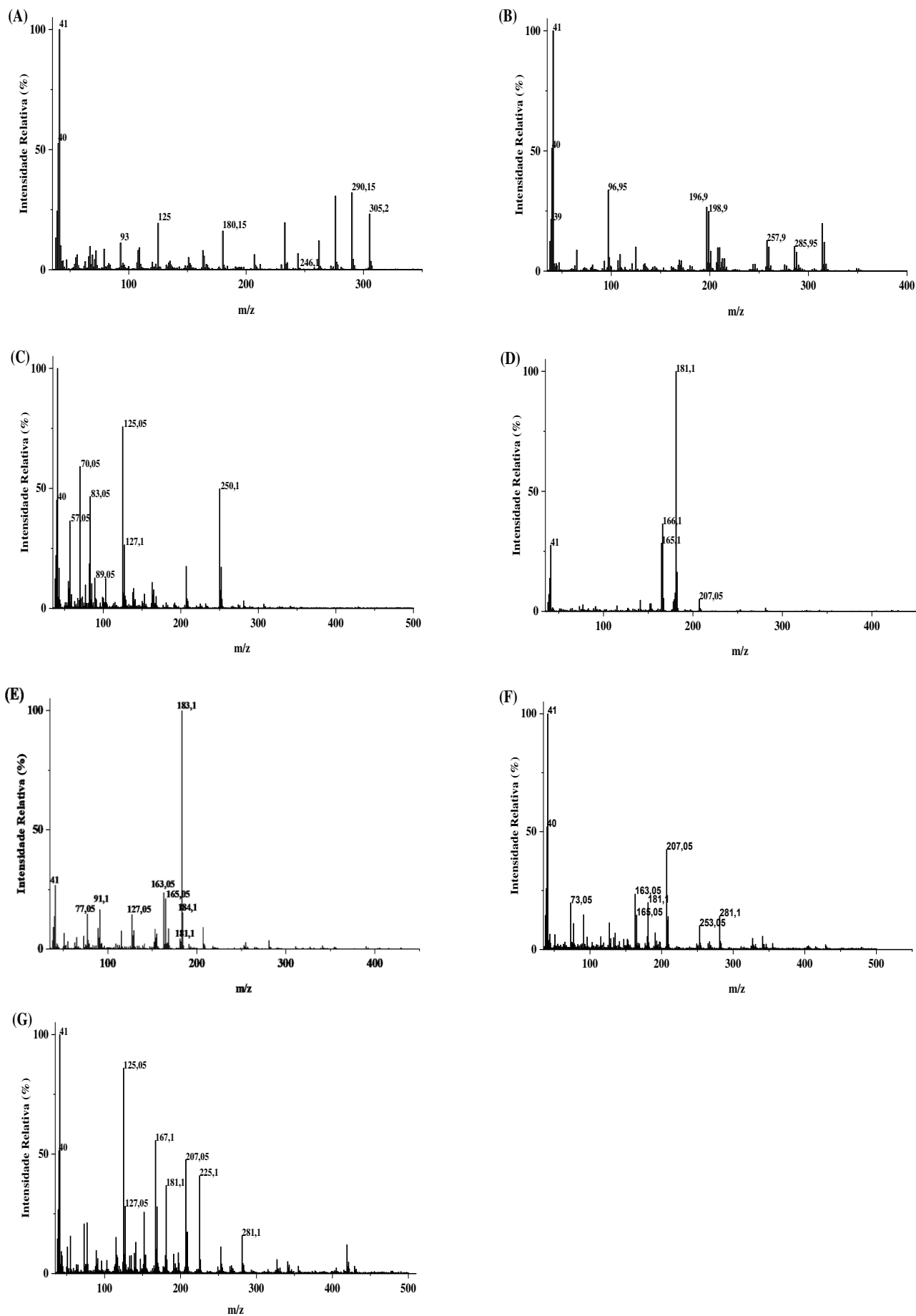
## 1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1.3.1. Análises cromatográfica dos métodos

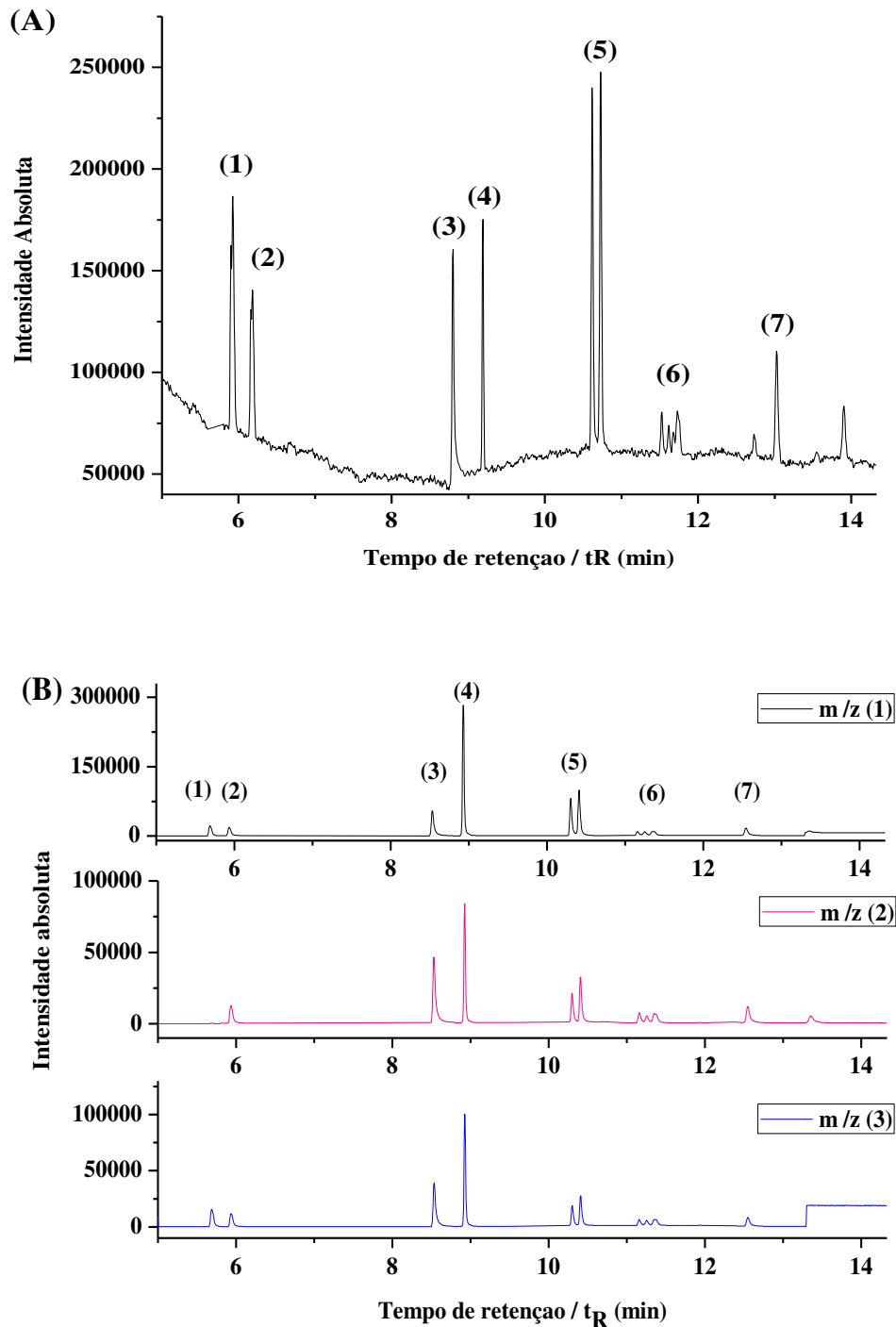
Os agrotóxicos foram identificados e quantificados no GC-MS pelo modo *Scan* e *SIM*, respectivamente. Para determinar o tempo de retenção dos analitos e o espectro de massas de cada composto (Figura 2), uma solução-padrão contendo os agrotóxicos pirimifós-metílico, clorpirifós, tebuconazol, bifentrina, permetrina, cipermetrina e esfenvalerato na concentração de 2 mg L<sup>-1</sup> foi preparada em acetoneitrila e analisada no modo *Scan* (Figura 3 (A)). Com auxílio da biblioteca (NIST 2014) foi possível identificar cada agrotóxico em estudo.

A Figura 3 (B) ( $m/z$  (1);  $m/z$  (2) e  $m/z$  (3)) apresenta o cromatograma no modo SIM de uma solução-padrão contendo todos os analitos na concentração de 85 µg L<sup>-1</sup>. Este cromatograma

foi subdividido em três, considerando as razões massa carga de cada agrotóxico em seu respectivo tempo de retenção (Tabela 3), isto é  $m/z$  (1) se refere às primeiras  $m/z$  de cada composto,  $m/z$  (2) se refere às segundas  $m/z$  de cada composto e  $m/z$  (3) se refere às terceiras  $m/z$  de cada composto. Observa-se que os picos foram simétricos, possibilitando uma boa separação e resolução dos princípios ativos analisados para ambos os modos de injeção no GC-MS. O tempo total de análise obtido foi de 14,33 min.



**Figura 2.** Espectros de massas total (SCAN) para os agrotóxicos pirimifós-metílico (A), clorpirifós (B), tebuconazol (C) e bifentrina (D), permetrina (E), cipermetrina (F) e esfenvalerato (G).

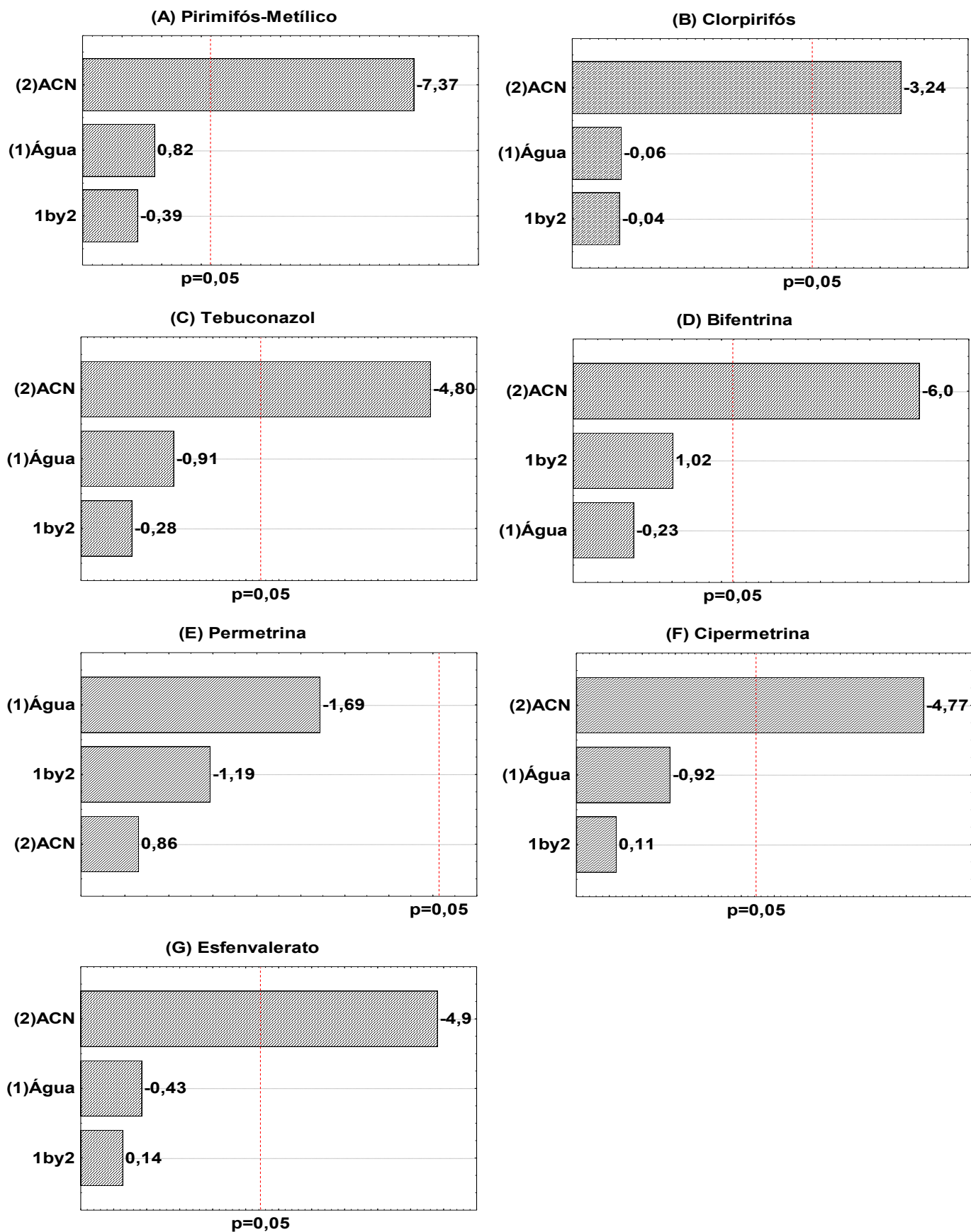


**Figura 3.** (A) Cromatograma no modo *Scan* de uma solução-padrão contendo todos os agrotóxicos na concentração  $2 \text{ mg L}^{-1}$ . (B) Cromatograma no modo SIM de uma solução-padrão contendo todos os analitos na concentração  $85 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo,  $m/z$  (1)= 290; 97; 125; 181; 183; 163 e 125,  $m/z$  (2)= 246; 197; 70; 165; 163; 181; 167,  $m/z$  (3)= 305; 199; 250; 166; 165; 165; 225. Os tempos de retenção obtidos foram: (1) pirimifós-metílico ( $t_R = 5,70 \text{ min}$ ), (2) clorpirifós ( $t_R = 5,95 \text{ min}$ ), (3) tebuconazol ( $t_R = 8,53 \text{ min}$ ), (4) bifentrina ( $t_R = 8,93 \text{ min}$ ), (5) permetrina ( $t_R = 10,297 / 10,404$ ), (6) cipermetrina ( $t_R = 11,152 / 11,245 / 11,342$ ) e (7) esfenvalerato ( $t_R = 12,538$ ).

## **1.3.2. Otimização dos métodos de extração**

### **1.3.2.1. Otimização do método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP)**

No primeiro planejamento foram estudados dois parâmetros, volume de água destilada e volume de solvente extrator (ACN), conforme descrito na Tabela 4. A otimização destes fatores foi feita através do planejamento fatorial completo  $2^2$ , com ponto central (n=3), envolvendo duas repetições. A significância de cada fator foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), usando níveis de significância p-valor. As áreas de cada agrotóxico no extrato de cada ensaio foram determinadas experimentalmente, e utilizadas como resposta para gerar os gráficos de Pareto dos efeitos e interações (Figura 4). Estes gráficos mostram os valores dos efeitos de cada uma das variáveis, possibilitando verificar se os mesmos são estatisticamente significativos.

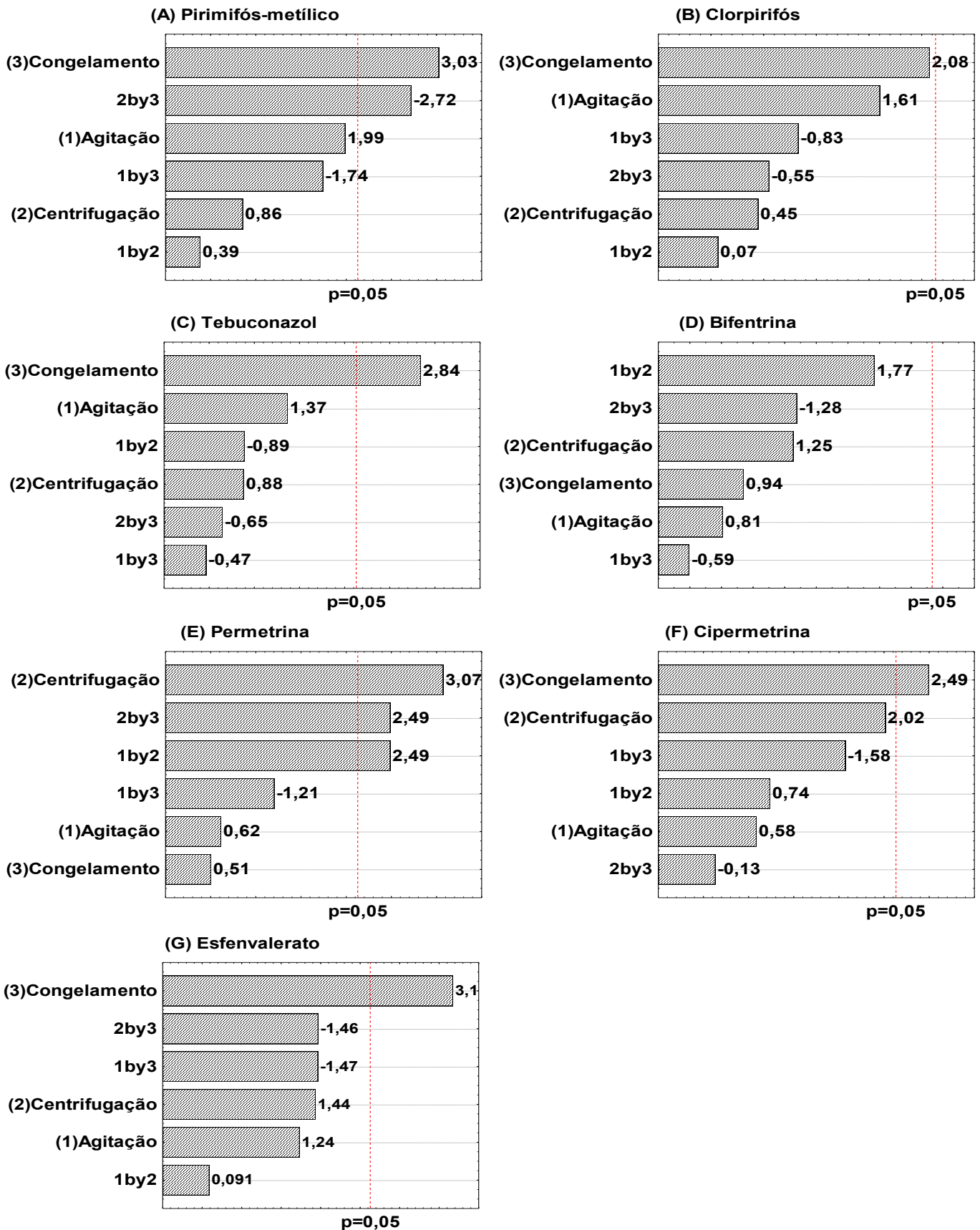


**Figura 4.** Gráficos de Pareto dos efeitos das variáveis volume de água (1) e volume de ACN (2) para os agrotóxicos pirimifós-metílico (A), clorpirifós (B), tebuconazol (C) e bifentrina (D), permetrina (E), cipermetrina (F) e esfenvalerato (G).

Verificou-se pelos dos gráficos de Pareto, que o fator volume de solvente extrator, ACN (2), influenciou significativamente e negativamente, a 95% de significância ( $p < 0,5$ ), na extração de todos agrotóxicos com exceção da permetrina. Em função deste resultado foi escolhido o volume mínimo de ACN (4,00 mL), o que é analiticamente interessante, uma vez que quanto menor o volume de ACN maior a concentração do analito no extrato. Já o fator volume de água não teve influência significativa na extração de nenhum dos agrotóxicos, podendo escolher qualquer um dos volumes. Entretanto, optou-se por usar o valor mínimo de água destilada (3,00 mL), para gerar menor quantidade de resíduos.

Assim, no método de extração SLE/LTP-GC-MS para determinação de agrotóxicos em amostras de farinha de mandioca deve-se empregar 3,00 mL de água destilada e 4,00 mL de ACN.

No segundo planejamento foram estudados três parâmetros: tempo de agitação, tempo de centrifugação e tempo de congelamento. A otimização destes fatores foi feita empregando o planejamento fatorial  $2^3$ , com ponto central ( $n=3$ ), envolvendo duas repetições. A significância de cada fator foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), usando níveis de significância p-valor (Tabela 5). Sendo determinadas experimentalmente as áreas de cada agrotóxico no extrato de cada ensaio, as quais foram utilizadas como respostas para gerar os gráficos de pareto dos efeitos (Figura 5).



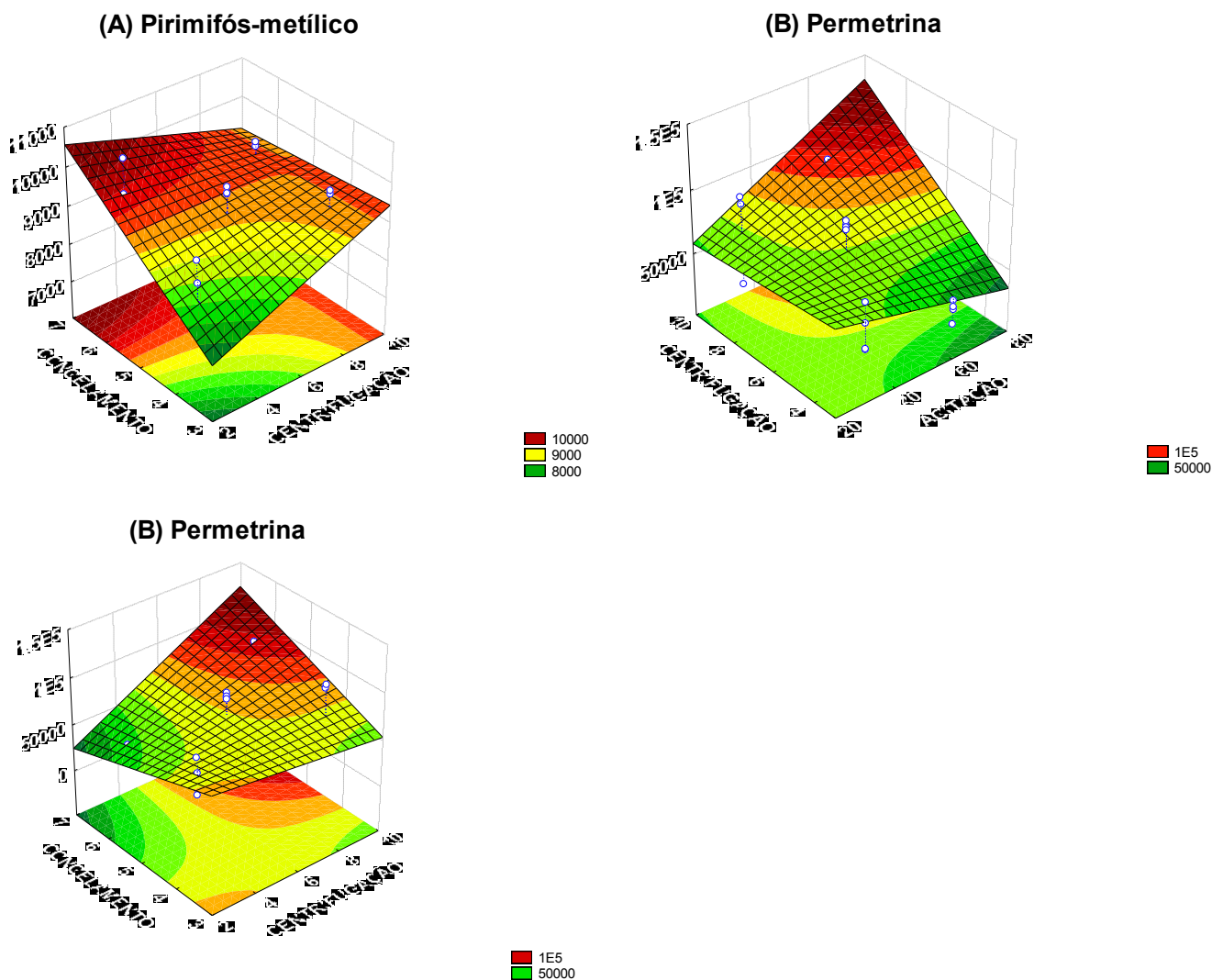
**Figura 5.** Gráficos de Pareto dos efeitos das variáveis tempo de agitação (1), de centrifugação (2) e congelamento (3) para os agrotóxicos pirimifós-metílico (A), clorpirifós (B), tebuconazol (C) e bifentrina (D), permetrina (E), cipermetrina (F) e esfenvalerato (G).

A partir dos gráficos de pareto (Figura 5), pode-se observar que o tempo de agitação (Fator 1), não foi estatisticamente significativo para nenhum dos compostos em estudo. Observa-se também, que o tempo de centrifugação (Fator 2) foi significativo e positivo apenas para permetrina.

Já o fator tempo de congelamento (3) foi estatisticamente significativo, influenciando e positivamente na extração dos agrotóxicos pirimifós-metílico, tebuconazol, cipermetrina e esfenvalerato. Entretanto, não foi significativo para clorpirifós, bifentrina e permetrina. Analisando a interação entre os parâmetros tempo de centrifugação (2) e tempo de congelamento (3); e os parâmetros tempo de agitação (1) e de centrifugação (2) foram significativos e de forma positiva para a permetrina, indicando que quanto maior o tempo de agitação, de centrifugação e de congelamento, melhor a resposta. E a interação centrifugação (2) e congelamento (3) foi significativamente negativo para pirimifós-metílico.

Contudo, como as interações dos fatores foram estatisticamente significativa apenas para os agrotóxicos permetrina e pirimifós-metílico, foram construídos gráficos de superfície de resposta (Figura 6). As interações (2) e (3), e (1) e (2) teve uma tendência positiva entre as interações para permetrina. Como esse composto durante os testes não estava tendo uma resposta cromatografica boa, optou-se por escolher o maior tempo de agitação, centrifugação e congelamento para todos os compostos, visto que o tempo de congelamento foi significativo positivo, a 95% de significância ( $p < 0,5$ ), para a maioria dos compostos.

Desse modo, foram consideradas as condições ótimas para extração SLE/LTP em amostras de farinha de mandioca, o tempo de agitação de 60 s, o tempo de centrifugação 9 min e tempo de congelamento de 6 h para os agrotóxicos pirimifós-metílico, clorpirifós, tebuconazol, bifentrina, permetrina, cipermetrina e esfenvalerato.

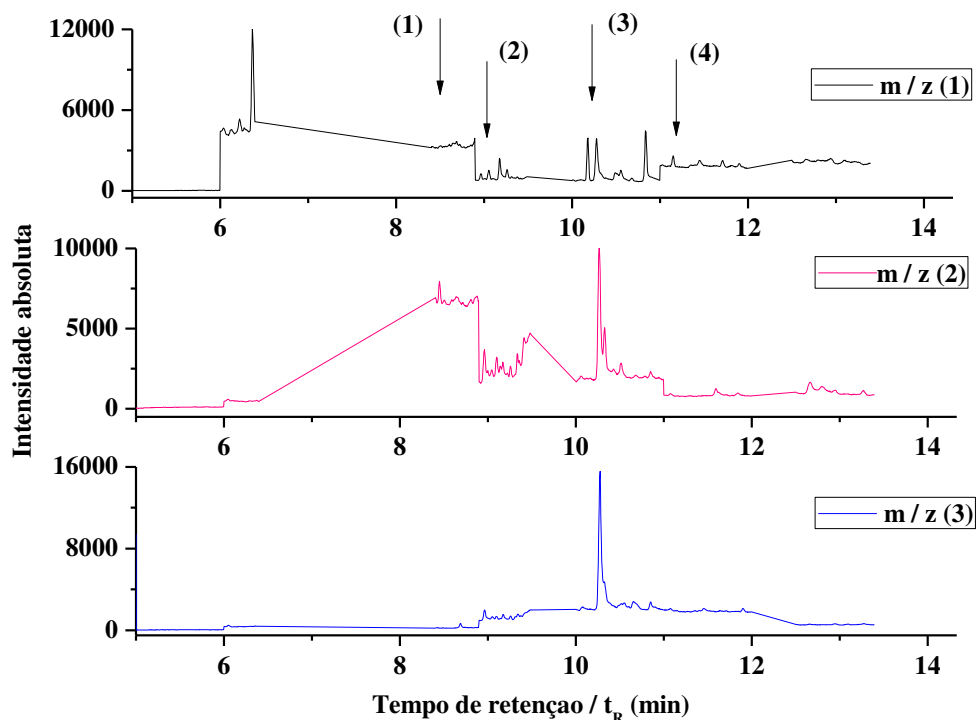


**Figura 6.** Superfícies de resposta das variáveis tempo de agitação (1), tempo de centrifugação (2) e tempo de congelamento (3) para a extração SLE/LTP dos agrotóxicos pirimifós- metílico (A) e permetrina (B), de amostras de farinha de mandioca.

### 1.3.2.2. Hifenação das técnicas extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) com a microextração líquido-líquido dispersivo (DLLME)

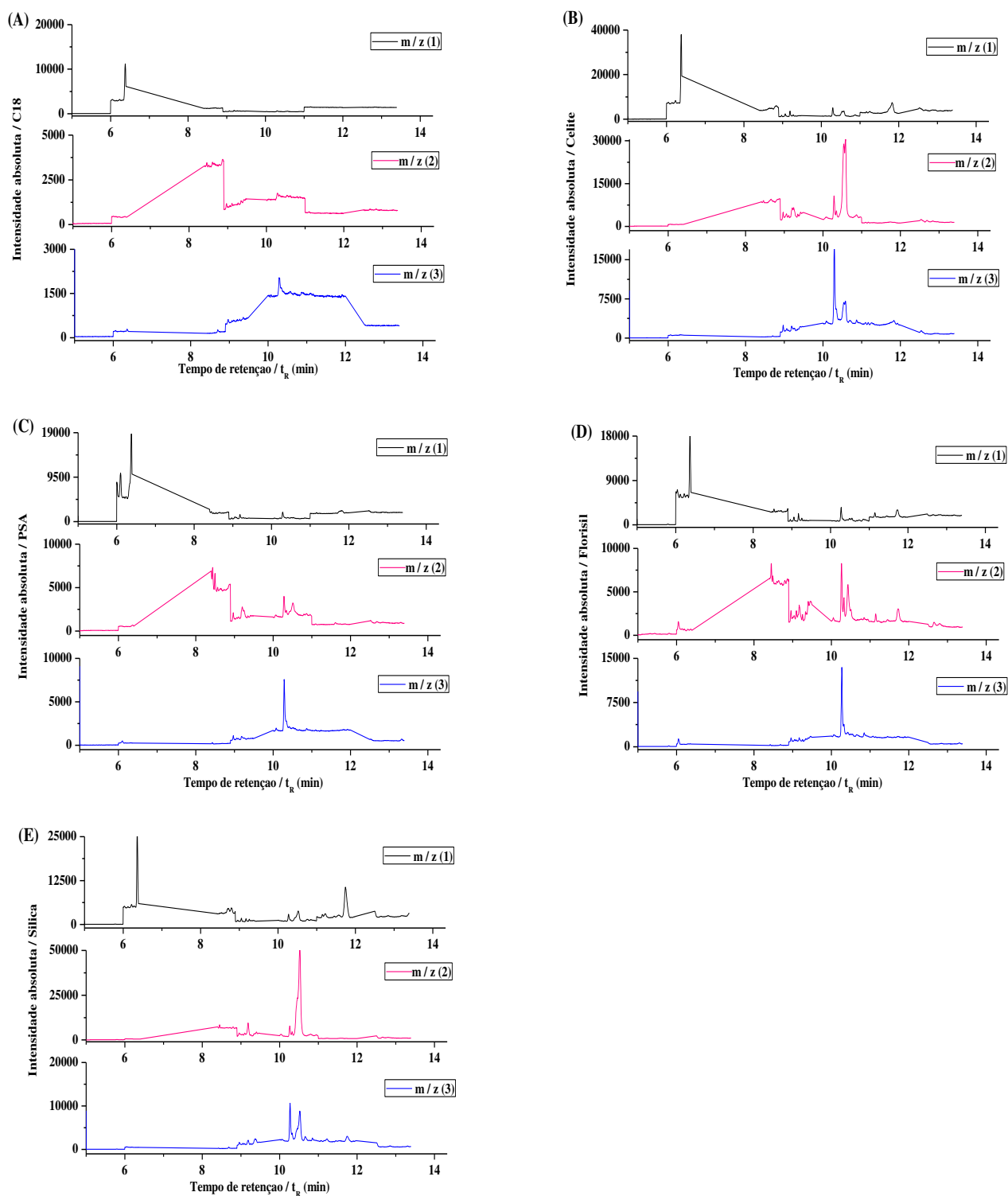
A farinha de mandioca é uma matriz complexa, além disso as hifenações das técnicas resultam em uma pré-concentração dos compostos e de interferentes, sendo necessário incluir uma etapa de *clean-up*, antes da hifenação, para remoção de co-extrativos, promovendo a limpeza das amostras de farinha de mandioca. Com isso, os sorventes C18, PSA, Celite, Sílica e Florisil foram testados para realizar um *clean-up* dos extratos das amostras obtidas pela técnica SLE/LTP. A escolha do sorvente foi determinada por GC-MS, avaliando qual adsorvente eliminaria picos de compostos interferentes sem prejudicar a determinação dos analitos em estudo. A Figura 7 (m/z (1); m/z (2) e m/z (3)) apresenta o cromatograma de extrato de SLE/LTP da amostra de farinha de

mandioca isenta de agrotóxicos (branco analítico) sem a etapa de *clean-up* (limpeza), obtido no modo SIM. Este cromatograma foi subdividido em três, considerando as razões massa carga de cada agrotóxico em seu respectivo tempo de retenção (Tabela 3), isto é m/z (1) se refere às primeiras m/z de cada composto, e assim sucessivamente.



**Figura 7.** Cromatogramas do branco analítico da amostra de farinha de mandioca sem a etapa de *clean-up*. Sendo m / z (1)= 290; 97; 125; 181; 183; 163 e 125, m / z (2)= 246; 197; 70; 165; 163; 181; 167, m / z (3)= 305; 199; 250.

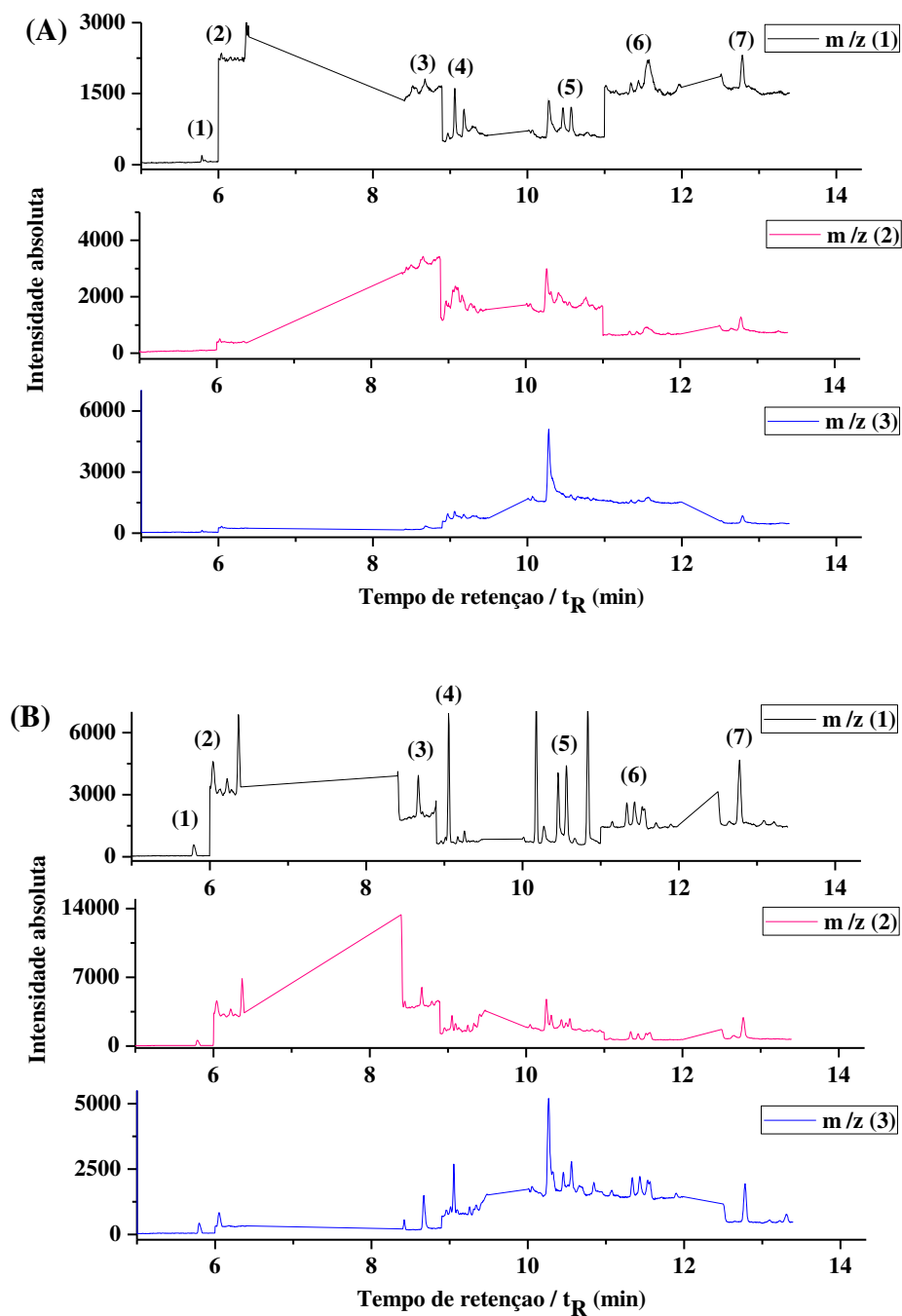
Os resultados contidos na Figura 7 mostram a necessidade de acrescentar uma etapa de *clean-up* antes da hifenação da otimização da técnica DLLME, devido a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos compostos (1) tebuconazol ( $t_R = 8,53$  min), (2) bifentrina ( $t_R = 8,93$ min), (3) permetrina ( $t_R = 10,297 / 10,404$ ) e (4) cipermetrina ( $t_R = 11,152 / 11,245 / 11,342$ ). Assim, foram testados vários tipos de sorvetes, com características diferentes de adsorção, podendo remover os co-extrativos, individualmente ou simultaneamente (Figura 8).



**Figura 8.** Cromatogramas dos sorventes testados. C18 (A), Celite (B), PSA (C), Florisil (D) e Sílica (E). Sendo  $m/z$  (1)= 290; 97; 125; 181; 183; 163 e 125,  $m/z$  (2)= 246; 197; 70; 165; 163; 181; 167,  $m/z$  (3)= 305; 199; 250.

Dentre todos os sorventes testados, observou-se que o C18 (A) foi o que teve melhor resultado em relação aos outros sorventes para as amostras de farinha de mandioca, obtendo a remoção (Figura 8). Esse sorvente vem sendo muito utilizado em trabalhos com matrizes

alimentícias para a remoção de componentes não polares (MADEJ *et al.*, 2018, KOLBERG *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2019). Após definir o sorvente como sendo o C18, foi feito o estudo fortificando os extratos da farinha de mandioca, para verificar se os compostos analisados tiveram alterações nas respostas (Figura 9).



**Figura 9.** (A) Cromatograma do extrato fortificado sem a etapa de *clean-up*. (B) Cromatograma do extrato fortificado com a etapa de *clean-up* (C18). Sendo (1) pirimifós-metílico, (2) clorpirifós, (3) tebuconazol, (4) bifentrina, (5) permetrina, (6) cipermetrina e (7) esfenvalerato.

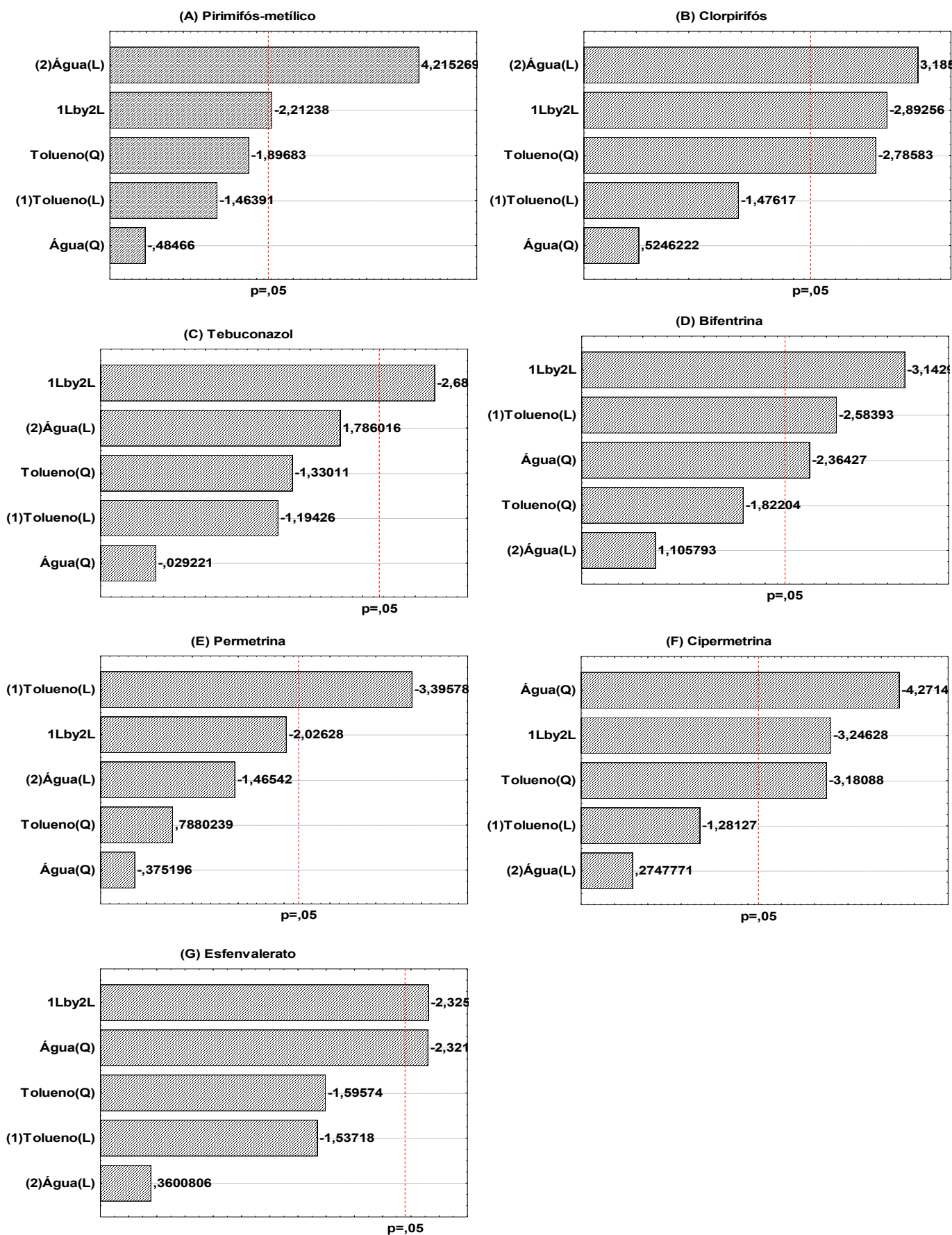
A Figura 9 representa os cromatogramas de extrato fortificado sem fazer a etapa de *clean-up* (A) e o extrato fortificado com a etapa de *clean-up* (C18) (B). Observa-se que quando foi realizado o *clean-up* (B) as respostas foram melhores para as áreas dos analitos.

#### 1.3.2.2.1. Otimização da hifenação das técnicas SLE/LPT-DLLME

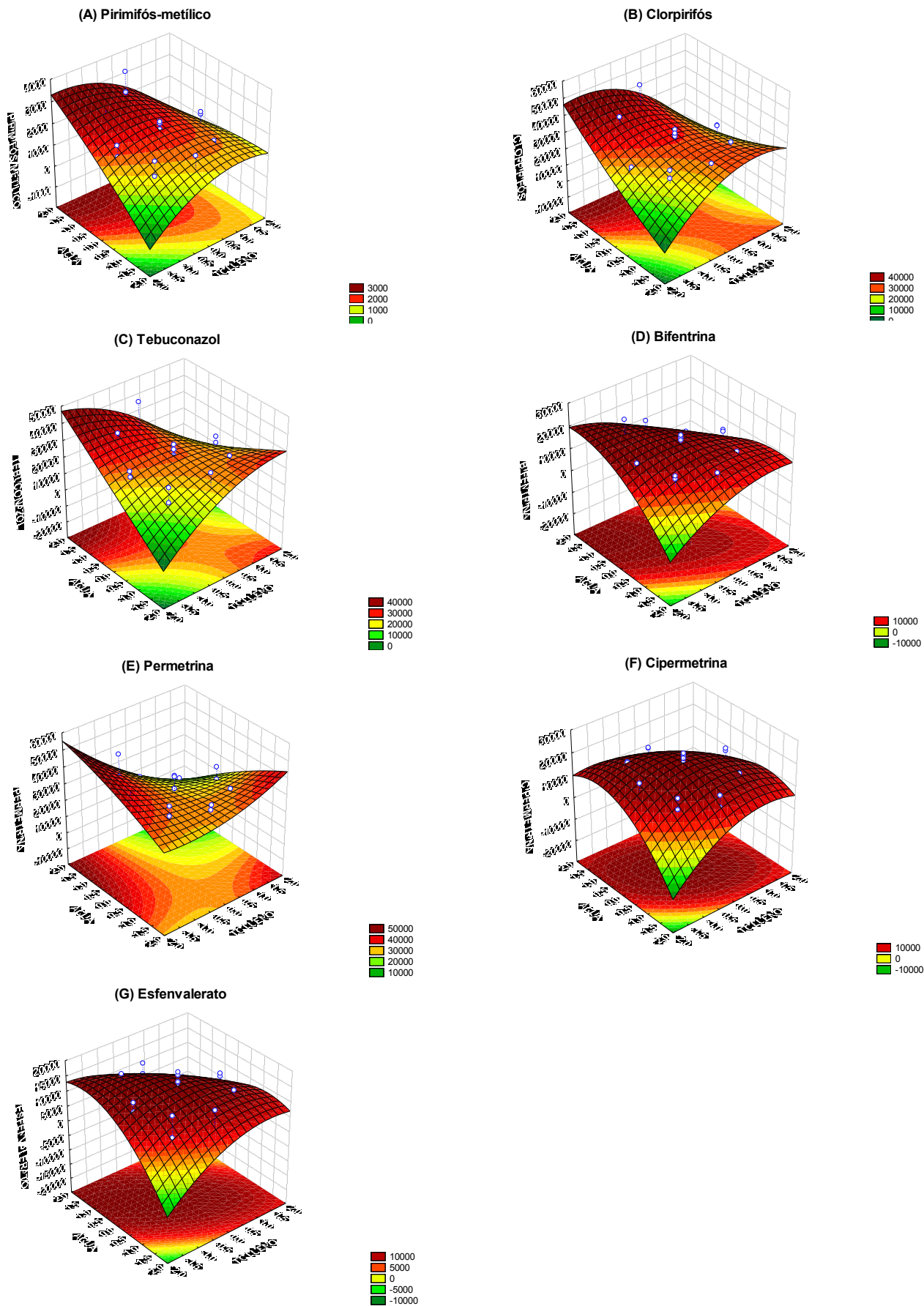
Na otimização do método DLLME foram avaliados os parâmetros, volume de solvente extrator (tolueno) (1) e volume de solução aquosa de NaCl (2), conforme descrito na Tabela 6. A otimização destes fatores foi feita empregando o planejamento composto central (PCC) 2<sup>2</sup>, com ponto central (n=3), envolvendo duas repetições. A significância de cada fator foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), usando níveis de significância p-valor. As áreas de cada agrotóxico no extrato de cada ensaio foram determinadas experimentalmente, e utilizadas como resposta para gerar os gráficos de pareto dos efeitos e superfícies de resposta.

Nos gráficos de pareto (Figura 10) foram analisados os coeficientes linear (L) para os fatores (1) e (2). O parâmetro (1) volume de tolueno (L) foi significativo negativo apenas para bifentrina e permetrina. O (2) volume de solução aquosa de NaCl (L) foi significativo positivo apenas para pirimifós-metílico e clorpirifós, a 95% de significância ( $p < 0,05$ ). Os demais compostos não foram significativos. Ocasionalmente que para os compostos bifentrina (D) e permetrina (E), quando menor o volume de tolueno, melhores respostas. Já para os compostos pirimifós-metílico e clorpirifós, quanto maior o volume de solução aquosa de NaCl, melhores respostas cromatográficas. As interações (1) (L) e (2) (L) foram significativas negativo para todos os agrotóxicos estudados, exceto permetrina.

Contudo, para analisar o coeficiente quadrático (Q) foi utilizado a superfície de resposta de cada composto (Figura 11).



**Figura 10.** Gráficos de pareto das variáveis volume de tolueno (1), de solução aquosa de NaCl (2) para os agrotóxicos pirimifós- metílico (A), clorpirifós (B), tebuconazol (C), bifentrina (D), permetrina (E), cipermetrina (F) e esfenvalerato (G).



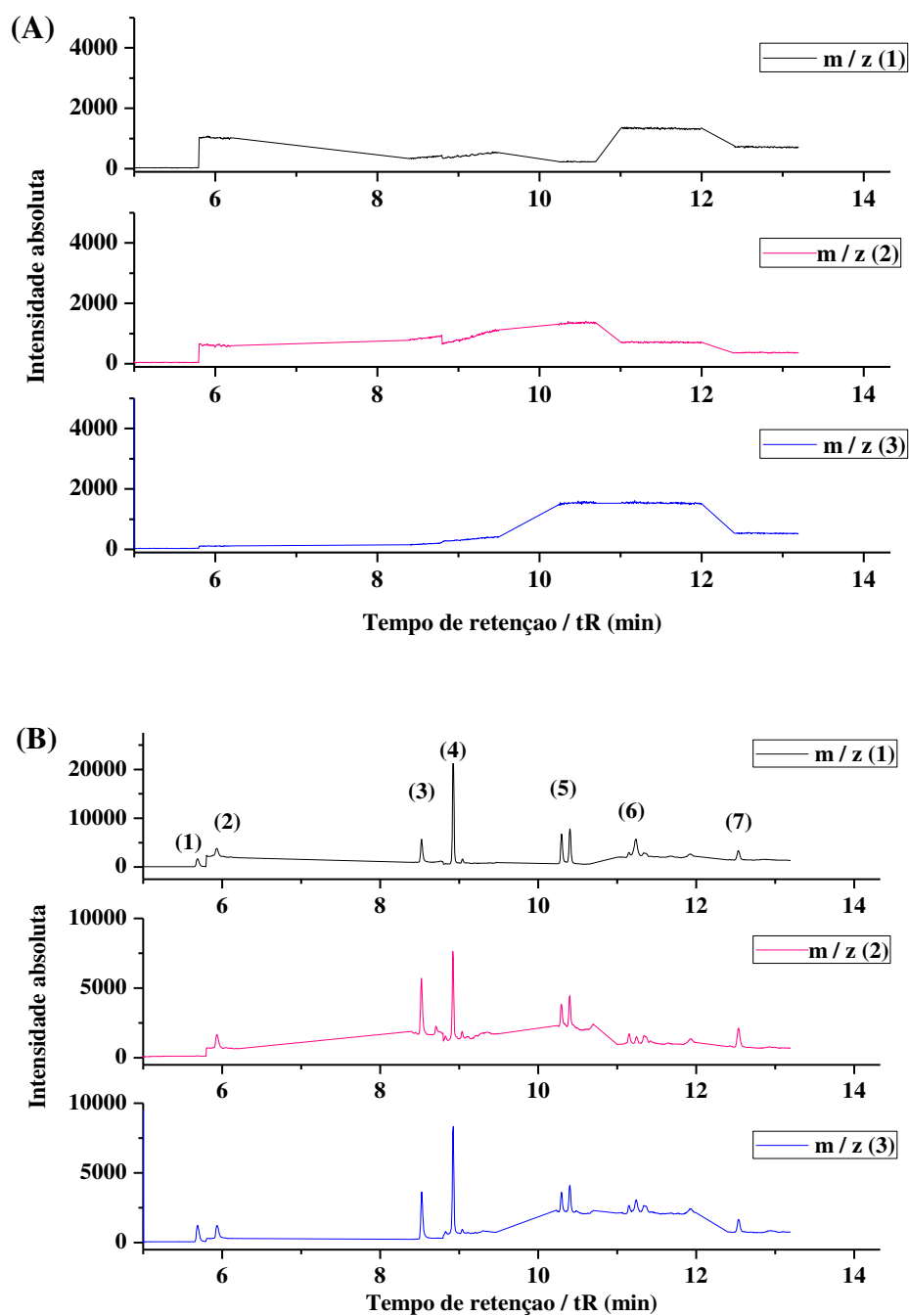
**Figura 11.** Superfície de resposta das variáveis volume de tolueno (1), de solução aquosa de NaCl (2) para os agrotóxicos pirimifós- metílico (A), clorpirifós (B), tebuconazol (C), bifentrina (D), permetrina (E), cipermetrina (F) e esfenvalerato (G).

Observando a Figura 11, nota-se que o volume de tolueno (1) teve a mesma tendência para todos os agrotóxicos, a menor quantidade de tolueno, ocasionou um aumento na resposta. Para o volume de solução aquosa de NaCl (2) a maior quantidade de água, ocasionou um aumento na resposta. Com base nas análises dos gráficos de pareto e das superfícies de resposta, pode-se concluir que de uma maneira geral, para os sete agrotóxicos, as melhores condições seriam menores volumes de tolueno (120  $\mu\text{L}$ ) e maiores volumes de solução aquosa de NaCl (6,00 mL). Visto que quanto menor a quantidade do volume extrator mais concentrado o analito, resultando em uma melhor extração simultânea dos sete agrotóxicos.

### **1.3.3. Validação do método SLE-LTP**

#### **1.3.3.1. Seletividade**

A seletividade do método foi comprovada por comparação dos cromatogramas obtidos de extratos de amostras de farinha de mandioca isentas dos agrotóxicos, com os dos extratos das amostras de farinha de mandioca fortificadas com concentração de 266  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para os agrotóxicos bifentrina, esfenvalerato, permetrina, pirimifós-metílico e tebuconazol e 270  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para cipermetrina e clorpirifós. Para facilitar a visualização, os cromatogramas foram subdividido em três (Figura 12), considerando as razões massa carga de cada agrotóxico em seu respectivo tempo de retenção (Tabela 3), isto é, m/z (1) se refere às primeiras m/z de cada composto, m/z (2) se refere às segundas m/z de cada composto e m/z (3) se refere às terceiras m/z de cada composto.



**Figura 12.** (A) Cromatograma da análise GC-MS das amostras de farinha de mandioca, isentas dos analitos. (B) Cromatograma das amostras de farinha de mandica fortificadas com  $266 \mu\text{g kg}^{-1}$  de (1) pirimifós-metílico ( $t_R = 5,7$ ), (3) tebuconazol ( $t_R = 8,5$ ), (4) bifentrina ( $t_R = 8,9$ ), (5) permetrina ( $t_R = 10,3 / 10,4$ ) e (7) esfenvalerato ( $t_R = 12,5$ ) e  $270 \mu\text{g kg}^{-1}$  (2) clorpirifós ( $t_R = 5,9$ ) e (6) cipermetrina ( $t_R = 11,1 / 11,2 / 11,3$ ). Sendo, m / z (1)= 290; 97; 125; 181; 183; 163 e 125, m / z (2)= 246; 197; 70; 165; 163; 181; 167, m / z (3)= 305; 199; 250; 166; 165; 165; 225.

Observa-se que o cromatograma do branco da matriz não apresenta picos interferentes no mesmo tempo de retenção dos compostos de interesse. Portanto, o método proposto para determinação de resíduos de agrotóxicos é seletivo, não sendo afetado pelos outros constituintes da matriz ou por interferentes dos reagentes e solventes.

### 1.3.3.2. Linearidade de resposta do método

A linearidade do método foi determinada pela injeção de extratos de amostras de farinha de mandioca fortificadas com os agrotóxicos em seis concentrações (bifentrina, esfenvalerato, permetrina, pirimifós-metílico e tebuconazol: 16; 66; 116; 166; 216; 266  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e cipermetrina e clorpirifós: 20; 70; 120; 170; 220; 270  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) em triplicatas e submetidas à técnica de extração otimizada. As curvas analíticas foram plotadas com a média das áreas representadas na Figura 13.

Os parâmetros utilizados para estimar a linearidade do método foram o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) coeficiente de correlação ( $r$ ) e gráfico de resíduo. De acordo com a ANVISA (2017) o coeficiente de correlação ( $r$ ) deve está acima de 0,990.

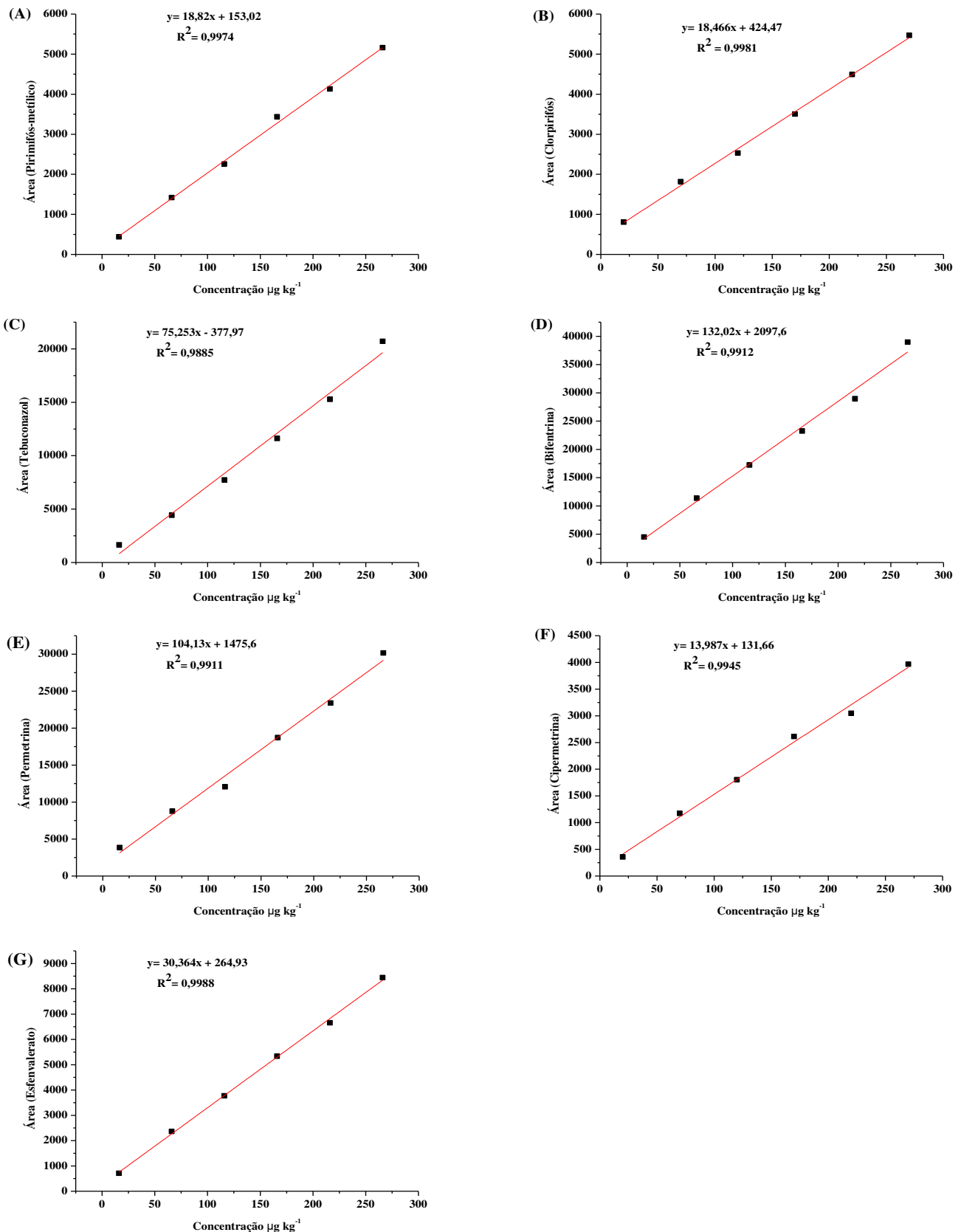
**Tabela 7.** Equações da reta e coeficiente de correlação ( $r$ ) dos agrotóxicos pirimifós-metílico, clorpirifós, tebuconazol, bifentrina, permetrina, cipermetrina e esfenvalerato

Agrotóxico	Modelo linear	Coefficiente de correlação ( $r$ )
Pirimifós-metílico	$A = 18,82c + 153,02$	0,9989
Clorpirifós	$A = 18,466c + 424,47$	0,9990
Tebuconazol	$A = 75,253c - 377,97$	0,9942
Bifentrina	$A = 132,02c + 2097,6$	0,9956
Permetrina	$A = 104,13c + 1475,6$	0,9955
Cipermetrina	$A = 13,987c + 131,66$	0,9972
Esfenvalerato	$A = 30,364c + 264,93$	0,9994

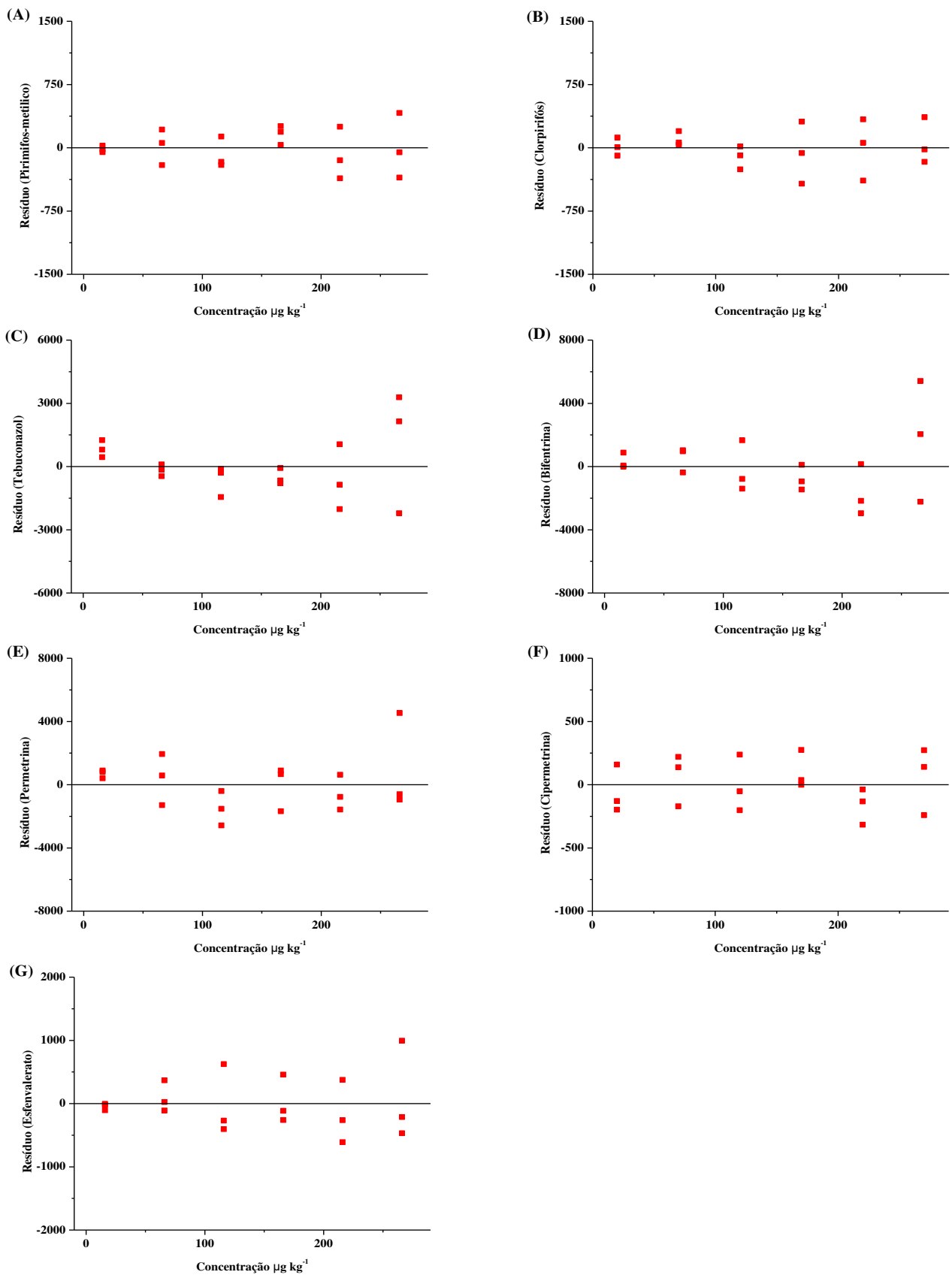
A = Área; c = concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )

Os coeficientes de correlação ( $r$ ), permitem estimar se a curva obtida é adequada ao modelo matemático, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão dos pontos experimentais e menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004). Observa-se na Tabela 7 que o  $r$  de todos os agrotóxicos foram superiores a 0,990, atendendo as exigências da ANVISA. Apesar do coeficiente de correlação ( $r$ ) indicar se a curva é adequada ao modelo matemático, ele não é conclusivo. Desse modo, devem ser avaliados os gráficos de resíduos para verificar essa adequação (INMETRO, 2018). Os dados dos gráficos de resíduos de

todos os agrotóxicos (Figura 14) apresentaram comportamento aleatório. Como não demonstram um padrão de distribuição pode-se dizer que a variância é constante e que a relação é linear. Isso indica que o modelo de regressão escolhido se ajustou adequadamente aos dados.



**Figura 13.** Curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de farinha de mandioca fortificadas com padrão dos analitos e submetidas à SLE/LTP e analisado por GC-MS, em uma faixa de concentração de 16 a 266  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para (A) pirimifós-metílico, (C) tebuconazol, (D) bifentrina, (E) permetrina e (G) esfenvalerato e 20 a 270  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para (B) clorpirifós e (F) cipermetrina.



**Figura 14.** Gráficos de resíduos para curva analítica de amostras de farinha de mandioca fortificadas com padrão dos analitos e analisados por GC-MS, em uma faixa de concentração de 16 a 266  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para (A) pirimifós-metílico, (C) tebuconazol, (D) bifentrina, (E) permetrina e (G) esfenvalerato e 20 a 270  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para (B) clorpirifós e (F) cipermetrina.

### 1.3.3.3. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção de acordo com a ANVISA é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado. Já o limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2017).

Para determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método, foram utilizados as Equações 1 e 2. Os resultados estão dispostos na Tabela 8.

**Tabela 8.** Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método para os sete agrotóxicos em estudo

Agrotóxico	LD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Pirimifós-metílico	1,2	3,7
Clorpirifós	6,2	18,7
Tebuconazol	1,5	4,6
Bifentrina	0,6	1,9
Permetrina	0,6	1,8
Cipermetrina	4,9	14,6
Esfenvalerato	1,1	3,2

LD = Limite de detecção; LQ = Limite de quantificação

Os valores dos limites de detecção obtidos para os agrotóxicos, utilizando GC-MS variaram de 0,6 a 6,2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Enquanto os limites de quantificação variaram de 1,8 a 18,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Os menores valores de LD e LQ são observados para bifentrina e tebuconazol.

Tendo em vista os limites máximos de resíduos (LMRs) estabelecidos pela ANVISA, Codex e União Européia (Tabela 1) para os agrotóxicos em estudo, nota-se que os valores de LQ obtidos estão bem abaixo do LMR permitido para a mandioca.

### 1.3.3.4. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada, em triplicata, por ensaios de recuperação em três níveis de concentração, 66, 166 e 266  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para os agrotóxicos bifentrina, esfenvalerato, permetrina, pirimifós-metílico e tebuconazol e 70, 170 e 270  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para os agrotóxicos

cipermetrina e clorpirifós. A porcentagem de recuperação (%R) obtidas para cada um dos analitos presentes nas amostras de farinha de mandioca, foram calculados conforme as Equação 3 , e estão descritos na Tabela 9.

**Tabela 9.** Porcentagens de recuperação (R %  $\pm$  DP) obtidos para análise das amostras de farinha de mandioca fortificadas em três níveis de concentração, pelo método SLE/LTP- GC-MS

Agrotóxico	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	R (% $\pm$ DP)
Pirimifós-metílico	66	110,7 $\pm$ 12,2
	166	88,1 $\pm$ 20,4
	266	101,2 $\pm$ 7,76
Clorpirifós	70	110,9 $\pm$ 2,41
	170	87,6 $\pm$ 12,9
	270	101,5 $\pm$ 9,02
Tebuconazol	66	109,1 $\pm$ 8,64
	166	89,9 $\pm$ 18,5
	266	101,0 $\pm$ 13,3
Bifentrina	66	113,1 $\pm$ 10,4
	166	85,4 $\pm$ 28,9
	266	101,5 $\pm$ 11,4
Permetrina	66	110,6 $\pm$ 6,59
	166	88,2 $\pm$ 15,9
	266	101,2 $\pm$ 12,0
Cipermetrina	70	103,6 $\pm$ 9,52
	170	95,9 $\pm$ 17,8
	270	100,5 $\pm$ 21,3
Esfenvalerato	70	105,5 $\pm$ 10,0
	170	93,9 $\pm$ 22,5
	270	100,7 $\pm$ 17,0

R (%  $\pm$  DP) = Porcentagem de recuperação mais ou menos o desvio padrão

A recuperação do método desenvolvido ficou entre 85,4 e 113,1%. Mostrando que o método apresentou uma recuperação dentro dos intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos que geralmente é entre 70 a 120% (MAPA, 2011). O método teve uma boa exatidão, sendo adequado para extração e análise dos agrotóxicos pirimifós-metílico, clorpirifós, tebuconazol, bifentrina, permetrina, cipermetrina e esfenvalerato.

#### 1.3.3.5. Precisão

Neste trabalho, a precisão do método foi medida por meio da repetibilidade, precisão intermediária, sendo usualmente expressas pelo coeficiente de variação. De acordo com a

ANVISA (2017) o experimento de precisão deve ser feito em três dias diferentes e replicatas de cada concentração.

### 1.3.3.5.1. Repetitividade

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, sendo essas: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local, repetições em um curto intervalo de tempo (ANVISA, 2017).

**Tabela 10.** Coeficientes de variação (CV) obtidos para análise das amostras de farinha de mandioca fortificadas em três níveis de concentração. Sendo estes ensaios intra-dia

Agrotóxicos	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	CV (%)
Pirimifós-metílico	66	16,1
	166	11,8
	266	3,5
Clorpirifós	70	9,1
	170	6,1
	270	2,8
Tebuconazol	66	11,4
	166	8,7
	266	3,3
Bifentrina	66	5,7
	166	14,5
	266	3,6
Permetrina	66	10,3
	166	9,6
	266	3,2
Cipermetrina	70	5,6
	170	18,4
	270	5,4
Esfenvalerato	70	10,4
	170	8,4
	270	7,9

CV= Coeficiente de variação

Os resultados obtidos mostram uma boa repetitividade dos dados para todos os agrotóxicos (Tabela 10), pois apresentou coeficientes de variação menor ou igual 20% (MAPA, 2011).

### 1.3.3.5.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada utilizando o guia da ANVISA (2017) como base. O experimento foi feito em 3 níveis de 66, 166 e 266  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para os agrotóxicos bifentrina, esfenvalerato, permetrina, pirimifós-metílico e tebuconazol e 70, 170 e 270  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para os agrotóxicos cipermetrina e clorpirifós. Os ensaios foram realizados em triplicata e pelo mesmo analista em três dias diferentes (dia 1, dia 3 e dia 5). A estimativa dessa precisão foi feita por meio dos coeficientes de variação (CV). Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Coeficientes de variação (CV) obtidos para análise das amostras de farinha de mandioca em três níveis de concentração, inter-dia

Agrotóxicos	Precisão intermediária (n=3)	
	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	CV (%)
Pirimifós-metílico	66	16,3
	166	11,7
	266	4,9
Clorpirifós	70	10,3
	170	10,9
	270	4,2
Tebuconazol	66	10,9
	166	8,5
	266	8,0
Bifentrina	66	10,5
	166	13,3
	266	6,3
Permetrina	66	13,6
	166	9,5
	266	6,2
Cipermetrina	70	13,8
	170	11,9
	270	6,1
Esfenvalerato	70	11,7
	170	9,6
	270	7,1

Nota-se, uma boa precisão intermediária para todos os agrotóxicos, pois os coeficientes de variação do método desenvolvido foi menor que 20% (MAPA, 2011).

#### 1.3.4. Efeito de matriz

A presença de co-extrativos podem causar alterações na resposta cromatográfica induzida pela matriz. Essa alteração pode ser denominada como efeito de matriz, a qual pode ser usada para explicar taxas de recuperação que excedem de 100% e baixa precisão do método (PINHO *et al.*, 2009).

O efeito de matriz pode ser analisado pelas curvas analíticas dos agrotóxicos preparados em solvente puro (acetonitrila) e no extrato orgânico da matriz farinha de mandioca após a aplicação do método SLE/LTP. Ambas as curvas analíticas foram construídas em concentrações de 8, 33, 58, 83, 108 e 133  $\mu\text{g L}^{-1}$  para pirimifós-metilíco, tebuconazol, bifentrina e permetrina e para clorpirifós em 10, 35, 60, 85, 110 e 135  $\mu\text{g L}^{-1}$ . E os resultados são apresentados na Figura 15.

Observa-se na Figura 15, que para todos os agrotóxicos exceto a bifentrina houve diferenças discrepantes entre os coeficientes angulares e lineares. Para os agrotóxicos pirimifós-metilíco, clorpirifós, tebuconazol e permetrina, os coeficientes angulares foram menores para as curvas analíticas preparadas em acetonitrila, obtendo menores respostas cromatográficas quando comparadas aos coeficientes angulares das curvas preparadas no extrato da matriz. Isso indica que os interferentes da matriz influenciaram positivamente na quantificação dos analitos nessa faixa de concentração. Por outro lado, a bifentrina apresentou uma sobreposição das curvas analíticas, indicando que não há influência de interferentes na matriz.

Para cada agrotóxico a porcentagem do efeito de matriz foi determinada a partir da Equação 5. E descritos na Tabela 12.

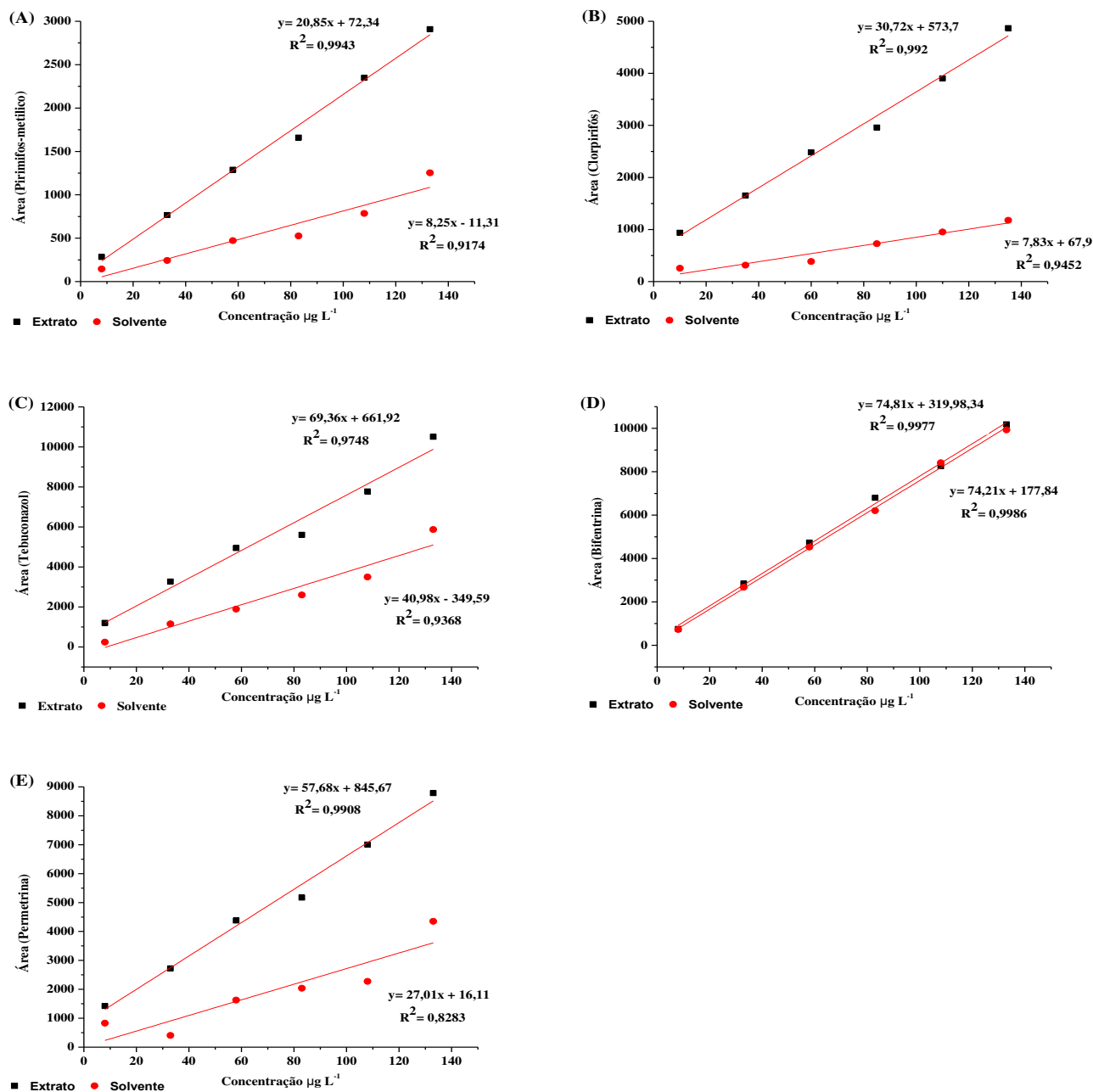
**Tabela 12.** Porcentagem do efeito de matriz (%EM) para cada agrotóxico

Agrotóxico	EM (%)
Pirimifós-metilíco	163,9
Clorpirifós	342,9
Tebuconazol	69,17
Bifentrina	2,338
Permetrina	119,3

EM (%) = porcentagem efeito de matriz

O efeito de matriz pode ser positivo, aumentando o sinal cromatográfico, ou negativo, ocorrendo uma diminuição do sinal. Nota-se que os resultados mostraram efeitos de matriz significativos positivos para todos os agrotóxicos exceto a bifentina. Esse aumento na resposta

cromatográfica, pode ser devido aos co-extrativos da matriz ocuparem os sítios ativos do injetor em uma quantidade significativa em relação aos analitos. Com isso, uma quantidade maior do analito é transferida para coluna cromatográfica (HAJŠLOVÁ & ZROSTLIKOVA, 2003, SOUSA *et al.*, 2012).



**Figura 15.** Gráficos das curvas analíticas preparadas em acetonitrila e no extrato para cada agrotóxicos, em uma faixa de concentração de 8, 33, 58, 83, 108 e 133 µg L<sup>-1</sup> para pirimifós-metilíco (A), tebuconazol (C), bifentrina (D) e permetrina (E) e para clorpirifós (B) em 10, 35, 60, 85, 110 e 135 µg L<sup>-1</sup>.

### **1.3.5. Aplicação do método SLE/LTP**

O método SLE/LTP desenvolvido, otimizado e validado foi aplicado para determinação dos agrotóxicos em 7 diferentes amostras comerciais de farinha de mandioca, a fim de verificar a eficiência do método proposto. Não foram detectados a presença dos agrotóxicos estudados nas amostras de farinha de mandioca.

## **1.4. CONCLUSÃO**

O método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) foi otimizado e validado para a determinação de resíduos dos agrotóxicos pirimifós-metílico, clorpirifós, tebuconazol, bifentrina, permetrina, cipermetrina e esfenvalerato em farinha de mandioca por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Este método é simples, com baixo consumo de solvente, apresentou limites de quantificação (1,9 a 18,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) abaixo dos limites máximos de resíduos (LMR) permitidos pela ANVISA, Codex e União Europeia, sendo, portanto viável para determinação de resíduos de agrotóxicos em farinha de mandioca, em uma única etapa. Com o objetivo de melhorar o limite de quantificação do método foi proposta a hifenação da técnica SLE/LTP com a DLLME para monitorar a presença de resíduos em farinha de mandioca em níveis abaixo dos LMRs, se necessário. Entretanto para se otimizar este método foi necessário incluir uma etapa de *clean-up* para remoção de co-extrativos, promovendo a limpeza dos extratos de farinha de mandioca. Dos diferentes sorventes testados na etapa de *clean-up* o C18 foi o mais eficiente. A validação deste método será realizada em uma etapa futura para dar continuidade ao desenvolvimento do método. A aplicação do método SLE/LTP-GC-MS otimizado e validado para determinar resíduos de agrotóxicos em amostras de farinha de mandioca adquiridas em supermercados e feiras de Viçosa-MG, não detectou a presença de agrotóxicos. Em função dos resultados obtidos, pode-se concluir que o método desenvolvido é capaz de identificar e quantificar a presença de resíduos dos agrotóxicos estudados, bem como de outros que possam estar presentes na farinha de mandioca.

## **1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALVES, R. D. Desenvolvimento de métodos baseados na microextração líquido-líquido dispersiva e partição em agrotóxicos em água e solo por cromatografia gasosa. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2014.

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

ANVISA. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). Relatório de Atividades de 2013 a 2015. Diário oficial da União; Poder executivo, Brasília, DF, de 25 de novembro de 2016. p. 1–246, 2016.

ANVISA. RDC N. 166, de 25 de Julho de 2017,. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, v. 2017, p. 1–21, 2017.

ÁVILA, M. B., FARONI, L. R. A., HELENO, F. F., QUEIROZ, M. E. L. R., COSTA, L. P. Ozone as degradation agent of pesticide residues in stored rice grains. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 12, p. 4092–4099, 2017.

FREITAS, R. D. S., FARONI, L. R. D. A., QUEIROZ, M. E. L. R., HELENO, F. F., & PRATES, L. H. F. Degradation kinetics of pirimiphos-methyl residues in maize grains exposed to ozone gas. **Journal of Stored Products Research**, v. 74, p. 1–5, 2017

FAO. Save and Grow: Cassava A guide to sustainable production intensification. p. 1–142, 2013.

FAO. Food Outlook- Biannual Report on global Food Markets. **Global information and early warning system on food and agriculture**, n. November, p. 1–108, 2018.

GOULART, S. M., QUEIROZ, M. E. L. R., NEVES, A. A., & DE QUEIROZ, J. H. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 1320–1323, 2008.

HAJŠLOVÁ, J., & ZROSTLIKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra) trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1-2, p. 181-197, 2003.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. DOQ-CGCRE-008, 2018.

JOVANOVIĆ, P., GUZSVÁNY, V., FRANKO, M., LAZIĆ, S., SAKAČ, M., MILOVANOVIĆ, I., E NEDELJKOVIĆ, N. Development of multiresidue DLLME and QuEChERS based LC – MS / MS method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey liqueur. **Food research international**, v. 55, p. 11–19, 2014.

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**, v. 125, n. 4, p. 1436–1442, 2011.

KWON, H., LEHOTAY, S. J., & GEIS-ASTEGGIANTE, L. Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography–mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops. **Journal of chromatography A**, v. 1270, p. 235-245, 2012.

LENTZA-RIZOS, C., AVRAMIDES, E. J., CHERASCO, F. Low-temperature clean-up method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. **Journal of Chromatography A**, v. 912, n. 1, p. 135-142, 2001.

MADEJ, K., KALENIK, T. K., PIEKOSZEWSKI, W. Sample preparation and determination of pesticides in fat-containing foods. **Food chemistry**, v. 269, p. 527-541, 2018.

MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica. MAPA/ACS: Brasília, 2011.

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

NORONHA, L., NEVES, A. A., QUEIROZ, M. E. L. R., & OLIVEIRA, A. F. Evaluation of the Effects of Hofmeister Series on Salting Out in the Determination of Organophosphorous Pesticides and Pyrethroids by LDS/DLLME. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 9, p. 1897-1901, 2015.

PETRARCA, M. H., FERNANDES, J. O., GODOY, H. T., & CUNHA, S. C. Multiclass pesticide analysis in fruit-based baby food : A comparative study of sample preparation techniques previous to gas chromatography – mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 212, p. 528–536, 2016.

PIMENTA, G. G., DE QUEIROZ, M. E., VICTOR, R. P., NORONHA, L. M., NEVES, A. A., OLIVEIRA, A. F., HELENO, F. F. DLLME-GC/ECD method for the residual analysis of parathion-methyl and its application in the study of the UV-photodegradation process. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 11, p. 2045–2053, 2017.

PINHO, G. P., NEVES, A. A., QUEIROZ, M. E. L. R., & SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 987-995, 2009.

PINTO-ZEVALLOS, D. M.; PAREJA, M.; AMBROGI, B. G. Current knowledge and future research perspectives on cassava (*Manihot esculenta* Crantz) chemical defenses: An agroecological view. **Phytochemistry**, v. 130, p. 10–21, 2016.

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**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RODRIGUES, A. A., QUEIROZ, M. E. L. R., DE OLIVEIRA, A. F., NEVES, A. A., HELENO, F. F., ZAMBOLIM, L., & MORAIS, E. H. C. Pesticide residue removal in classic domestic processing of tomato and its effects on product quality. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 52, n. 12, p. 850–857, 2017.

RODRIGUES, R. P., FARIAS, W. R., GOULART, S. M., GOULART, A. C., SANTOS, J. P. V., & QUEIROZ, M. E. L. R. Optimization of solid-liquid extraction with low temperature partition for determination of carbofuran in cucurbita pepo 1 (“zucchini”) by high performance liquid chromatography. **Química Nova**, v. 41, n. 2, p. 213-218, 2018.

SANTANA, E. T. D.; SOARES, D. F.; FARIA, A. M. Development of a methodology for the determination of pesticide residues in cajá-manga pulp (*Spondias dulcis* L.) using solid-liquid extraction with low-temperature partitioning. **Journal of Chemistry**, v. 2018, 2018.

SOUZA, L. P., FARONI, L. R. A., HELENO, F. F., PINTO, F. G., QUEIROZ, M. E. L. R., & PRATES, L. H. F. Ozone treatment for pesticide removal from carrots: Optimization by response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 243, n. September 2017, p. 435–441, 2018.

SOARES, C. E., NEVES, A. A., QUEIROZ, M. E. L. R., OLIVEIRA, A. F., COSTA, A. I. G., ASSIS, R. C., ANDRADE, C. E. O. Determination of pesticides in soil using a hyphenated extraction technique. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 9, p. 1790-1797, 2015.

SOUSA, D. A., GONÇALVES, R. M., HELENO, F. F., QUEIROZ, M. E. L. R., & MARCHI, M. R. R. Chemometric optimization of solid–liquid extraction with low-temperature partition (SLE-LTP) for determination of persistent organic pollutants in Caiman yacare eggs. **Microchemical Journal**, v. 114, p. 266-272, 2014.

SOUSA, F. A., COSTA, A. I. G., DE QUEIROZ, M. E. L. R., TEÓFILO, R. F., NEVES, A. A., & DE PINHO, G. P. Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA. **Food Chemistry**, v. 135, n. 1, p. 179-185, 2012.

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

ZHANG, Z., DONG, M., HAO, X., HAN, L., SONG, S., E YAO, W. Evaluation of cleanup procedures in pesticide multi-residue analysis with QuEChERS in cinnamon bark. **Food Chemistry**, v. 276, p. 140–146, 2019.

### OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO SLE/LTP PARA DETERMINAÇÃO MULTIRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FARINHA DE TRIGO

#### RESUMO

O trigo se insere mundialmente como matéria prima principal de diversos produtos. Embora se tenha uma alta produtividade desses grãos, os problemas com insetos-praga podem ocorrer. Para a prevenção e o controle de doenças agrícolas, normalmente são utilizados agrotóxicos, aplicados na fase de produção ou na pós-colheita e no armazenamento, levando à contaminação do produto final, caso seja usado de forma inadequada. Diante disso, este trabalho teve como objetivo desenvolver o método extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP), para determinar resíduos de sete agrotóxicos (pirimifós-metílico, clorpirifós, tebuconazol, bifentrina, permetrina, cipermetrina e esfenvalerato) em farinha de trigo por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Na otimização multivariada do método foram avaliadas os volumes de solvente extrator (acetonitrila ACN), de água destilada, os tempos de agitação, de centrifugação e de congelamento. O método otimizado consistiu em acrescentar 2,0000 g de farinha de trigo, 3,00 mL de água destilada, 4,00 mL de ACN. Essa mistura foi agitada em vórtex por 30 s, centrifugada por 3 min (1724 g) e refrigerada por 4 h em um *freezer* a -20 °C. Nessas condições as fases são separadas e o extrato orgânico contendo os agrotóxicos é adicionado em um *vial* e analisados po GC-MS. O método otimizado foi validado, avaliando os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão. Os limites de detecção foram entre 0,23 a 6,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e os limites de quantificação entre 0,68 a 19,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , valores considerados abaixo dos limites de resíduos permitidos (LMRs). Os valores de recuperação ficaram no intervalo de 92,7 e 107,8%, com precisão  $\leq 20\%$ . Foi estudado também o efeito de matriz dos agrotóxicos pirimifós-metílico, clorpirifós, tebuconazol, bifentrina e permetrina que, para todos agrotóxico obteve um efeito de matriz positivo, aumentando o sinal cromatográfico. A aplicação do método otimizado e validado na análise de amostras de farinha de trigo compradas em supermercado e feiras de Viçosa-MG, apresentou níveis de resíduo de agrotóxico em todas as amostras com valores iguais ou acima do LMR permitidos pelos órgãos regulamentadores ANVISA, Codex e União Europeia. Conclui-se que o método desenvolvido resultou em um método viável para análise dos analitos em amostras de farinha de trigo, por ser simples, eficaz, com baixo consumo de solvente e a extração realizado em etapa única.

## ABSTRACT

Wheat is found worldwide as the main raw material for various products. Although high productivity of these grains is present, problems with insect pests can occur. For the prevention and control of these agricultural diseases, pesticides are usually used, applied in the production phase or in the post-harvest and in the storage, leading to the contamination of the final product, if used improperly. In this work the objective of this work was to develop the solid-liquid extraction method with low temperature partitioning (SLE/LTP) to determine seven agrochemical residues (pyrimiphos-methyl, chlorpyrifos, tebuconazole, bifenthrin, permethrin, cypermethrin and esfenvalerate) in flour of wheat by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). In the multivariate optimization of the method the volumes of solvent extractor (acetonitrile ACN), distilled water, agitation, centrifugation and cooling times were evaluated. The optimized method consists in adding 2,0000 g of wheat flour, 3.00 mL of distilled water, 4.00 mL of ACN, this mixture is vórtexed for 30 s, centrifuged for 3 min (1724 g) and refrigerated for 4 h in a freezer at -20 ° C. Under these conditions the phases are separated and the organic extract containing the agrochemicals are added into a vial and analyzed by GC-MS. The optimized method was validated, evaluating the following parameters: selectivity, linearity, limits of detection and quantification, accuracy and precision. Detection limits were between 0.23 and 6.6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and the quantification limits were 0.68 to 19.7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , below the permitted residue limits (LMRs). The recovery values were in the range of 92,7 to 107,8%, with precision  $\leq 20\%$ . The matrix effect of the pyrimiphos-methyl, chlorpyrifos, tebuconazole, bifenthrin and permethrin pesticides was also studied, which for all pesticides obtained a positive matrix effect, increasing the chromatographic signal. The application of the optimized and validated method in samples of wheat flour purchased at supermarkets and Viçosa-MG fairs showed levels of pesticide residue in all samples with values equal to or above the MRL allowed by the regulatory bodies ANVISA, Codex and European Union. It is concluded that the method developed resulted in a viable method for analysis of analytes in samples of wheat flour, because it is simple, effective, with low solvent consumption and extraction carried out in a single step.

## 2.1. INTRODUÇÃO

O trigo, em escala mundial, é de grande relevância para a agricultura devido às numerosas cadeias produtivas em que se insere como matéria prima principal na elaboração de diversos produtos, especialmente no setor de alimentos (FARIAS *et al.*, 2016). Além disso, contribui para a dieta alimentar, pois possui características como fonte de energia, altos teores de ácidos graxos essenciais, proteínas nutritivas, fibra alimentar e micronutrientes (REZAEI *et al.*, 2017).

O grão é usado para fabricação da farinha de trigo, que é produzida a partir da moagem do mesmo. Nesse processo o grão de trigo é fracionado em farelo, endosperma e gérmen. Os constituintes nutricionais, micronutricionais, fitoquímicos e fibras, são geralmente encontrados em grandes concentrações no gérmen e farelo (OLIVEIRA NETO & SANTOS, 2017). No mercado existe uma grande variedade de farinhas de trigo, sendo farinhas de trigo refinadas brancas e amarelas, farinhas integrais, farelo, fibra, gérmen, flocos, grão inteiro e triguenho. A farinha de trigo é muito usada no mundo inteiro para a fabricação de massas, macarrões, pães, bolos e biscoitos. A farinha branca usada para produção de pão e bolo será objeto de estudo neste trabalho.

Embora se tenha uma alta produtividade desses grãos, os problemas com insetos, praga e fungos podem ocorrer, principalmente durante o armazenamento. Considera-se que desde que as Boas Práticas Agrícolas (BPA) sejam empregadas e que se obedeça ao intervalo de segurança, os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos não serão ultrapassados e a maioria dos agrotóxicos serão metabolizados pelas plantas, e conseqüentemente não permanecerão resíduos nos grãos no momento da colheita. Portanto, a qualidade do produto final depende tanto da produção quanto da pós-colheita. Quando executadas de forma irregular poderão levar a contaminação do produto final com resíduos de agrotóxicos (EMBRAPA, 2018).

Na pós-colheita os agrotóxicos podem ser utilizados no processo de armazenamento, para evitar a proliferação de insetos-praga que são capazes de deteriorar todo o lote do grão armazenado, bem como de fungos toxigênicos, que produzem micotoxinas. A proliferação de pragas no armazenamento se deve a fatores como alta temperatura e alta umidade. A prevenção de pragas no processo de armazenamento consiste na aplicação de agrotóxicos via líquida sobre os grãos na correia transportadora, no momento do abastecimento do silo (EMBRAPA, 2018).

O último relatório emitido pelo PARA (Programa Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil, publicado no final de 2016 (ANVISA, 2016), informou que no período de 2013 a 2015 foram analisadas 506 amostras de farinha de trigo, sendo que destas amostras 37 foram consideradas insatisfatórias por apresentarem resíduos de agrotóxicos não autorizados para a cultura e em uma amostra foi detectado o agrotóxico pirimifós-metílico em concentração acima do LMR. As demais (468) foram

consideradas satisfatórias, embora tenham sido encontrados níveis de resíduos de agrotóxicos em concentrações iguais ou inferiores aos limites máximos de resíduos (LMRs) permitidos, em 220 amostras. Dos agrotóxicos estudados os que apresentaram maior número de detecção foram pirimifós-metílico (135 amostras), bifentrina (87 amostras), fenitrotiona (31 amostras) e clorpirifós (31 amostras). Sendo o pirimifós-metílico detectado em concentrações acima do LMR. Com base neste relatório e nos produtos recomendados para esta cultura, alguns agrotóxicos como bifentrina, cipermetrina, clorpirifós, esfenvalerato, permetrina, pirimifós-metílico e tebuconazol foram selecionados para este trabalho.

O método de extração mais utilizado para análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos por cromatografia é o QuEChERS (*Quick* - rápido, *Easy* - fácil, *Cheap* - barato, *Effective* - eficaz, *Rugged* - robusto e *Safe* - seguro), que foi desenvolvido por Anastassiades em 2003 para análise de frutas e vegetais. Este método foi sendo modificado para extração de agrotóxicos, em diferentes matrizes alimentícias e ambientais como farelo e grãos de trigo (KOLBERG *et al.*, 2011; GULER *et al.*, 2010), cereais (HE *et al.*, 2015), farinha de trigo (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2017; REZAEI *et al.*, 2017), arroz e trigo (GRANDE-MARTÍNEZ *et al.*, 2015), solos (ZAIDON *et al.*, 2019). Embora a eficiência de extração de resíduos de agrotóxicos apresentada por essa técnica seja satisfatória, ela apresenta várias etapas, envolvendo uma etapa de extração inicial em acetonitrila, uma etapa de extração / partição após a adição de sal e uma etapa de *clean-up* utilizando extração dispersiva em fase sólida (PRESTES *et al.*, 2009).

Outro método que vem sendo empregado com sucesso para determinação de agrotóxicos em diversas matrizes é a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura e a extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP e LLE/LTP), que foi introduzida e otimizada por Lentza-Rizos *et al.* em 2001 para análise de inseticidas organofosforados e herbicidas triazina em azeite virgem. Este método apresenta como vantagens à simplicidade, o baixo consumo de solvente e ausência de etapas de *clean-up* no preparo da amostra de algumas matrizes, muitas vezes utilizadas em outros métodos. Ao longo dos anos muitos trabalhos foram desenvolvidos aplicando essa técnica, para determinação de resíduos de agrotóxicos em diferentes matrizes como grãos de milho (FREITAS *et al.*, 2017), grãos de arroz (ÁVILA *et al.*, 2017), alface (COSTA *et al.*, 2015), cenoura (ARAÚJO *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2018), etc.

O método consiste em colocar a amostra líquida ou sólida em contato com um solvente extrator, miscível e menos denso do que a água e que se mantenha líquido a -20 °C. Posteriormente, a mistura, constituída de amostra e mistura extratora é agitada e levada ao *freezer* para separação das fases. Nesta etapa, a fase aquosa junto com a amostra é congelada, ficando na parte inferior do recipiente, e a fase superior, contendo o solvente e os agrotóxicos, é removida e analisada por cromatografia (GOULART *et al.*, 2008).

No melhor do nosso conhecimento, este método não foi descrito na literatura científica indexada para determinação de resíduos de agrotóxicos em farinha de trigo e dada a importância de se monitorar resíduos de agrotóxicos nesta matriz, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um método utilizando a técnica extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP), para determinar resíduos de agrotóxicos em farinha de trigo por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

## **2.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1. Reagentes e soluções**

Foram preparadas, em acetonitrila 99,9% grau HPLC (Sigma-Aldrich), soluções-estoque dos padrões analíticos dos seguintes agrotóxicos, bifentrina (92,2%, FMC), cipermetrina (94,3%, Sigma-Aldrich), clorpirifós (99,0%, Sygenta), esfenvalerato (99,0%, Sigma-Aldrich), permetrina (92,4, Sygenta), pirimifós-metílico (99,5%, Sigma-Aldrich) e tebuconazol (99,3%, Sigma-Aldrich). A concentração das soluções-estoque foi de 1000 mg L<sup>-1</sup>. Outras soluções de trabalho usadas foram preparadas a partir da solução estoque, por meio de diluições dos padrões em acetonitrila. Todas as soluções foram armazenadas no *freezer* a uma temperatura de aproximadamente de -20 °C.

### **2.2.2. Equipamentos**

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás (GC) acoplado a um detector espectrométrico de massas (MS) equipado com um analisador tipo quadrupolo (GCMS-QP2020), um sistema de injeção (AOC-20i.), da Shimadzu. Um banho ultrassônico (Sanders,) operado a 280W e 40 kHz. Outros equipamentos incluíram balança analítica (Shimadzu), vórtex misturador (Certomat<sup>®</sup> MV), centrífuga (Quimis<sup>®</sup>, ISO 8001).

### **2.2.3. Condições cromatográficas**

A separação cromatográfica dos analitos foi realizada em uma coluna capilar (SH-Rtx-5MS) cuja fase estacionária é composta de 5% fenil e 95% dimetilpolissiloxano com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme. O hélio (grau de pureza 99,999%, White Martins) foi utilizado como gás carreador a uma vazão de 1,08 mL min<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>. A programação de temperatura da coluna consistiu em manter a temperatura inicial a 150 °C por 1 min, aquecer a uma taxa de 30 °C min<sup>-1</sup> até 210 °C, manter esta temperatura por 1 min, aumentar novamente a uma taxa de 30 °C min<sup>-1</sup> até 250 °C, manter esta temperatura por 2 min e, aquecer a uma taxa de 20 °C min<sup>-1</sup> até 290 °C, e manter esta temperatura por 5 min. O tempo total de análise foi de 14,33 min. A temperatura do injetor foi mantida a 300 °C. Um volume de 1 µL de amostra foi injetado no cromatógrafo, usando o modo de injeção splitless.

O espectrômetro de massas (MS) foi operado em modo de ionização positiva (PCI), impacto de elétrons 70 eV. Um tempo de corte de 5,0 min foi definido para evitar danos ao instrumento. As temperaturas da interface do detector foram fixadas em 300 °C e a fonte de ionização em 200 °C. Antes de definir as condições do modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), foi feita uma análise no modo *Scan ou TIC (total ion chromatogram - cromatograma de íons totais)*, obtendo os tempos de retenção ( $t_R$ ) e os espectros de massas de todos os agrotóxicos conforme a Tabela 13.

A faixa de concentração da curva analítica foi obtida por superposição de matriz no intervalo de 66 a 266 µg kg<sup>-1</sup> para bifentrina, esfenvalerato, permetrina, pirimifós-metílico e tebuconazol e 70 a 270 µg kg<sup>-1</sup> para cipermetrina e clorpirifós.

No cromatograma, a presença de picos duplos para o agrotóxico permetrina e pico triplo para a cipermetrina é atribuído a conversão destes compostos a isômeros durante a injeção no cromatógrafo a gás (MASTOVSKA, 2004). A quantificação foi feita usando a soma das áreas dos picos isômeros.

**Tabela 13.** Íons monitorados no modo SIM na análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, tempos de retenção e janela de tempos dos agrotóxicos

Nr.	Agrotóxico	$t_R$ (min)	Íons monitorados	Janela do tempo (min)
1	Pirimifós-metílico	5,71	290 + 246 + 305	5,0-5,8
2	Clorpirifós	5,97	97 + 197 + 199	5,8-6,2
3	Tebuconazol	8,54	125 + 70 + 250	8,4-8,8
4	Bifentrina	8,93	181 + 165 + 166	8,8-9,5
5	Permetrina	10,30 / 10,41	183 + 163 + 165	10,23-10,7
6	Cipermetrina	11,16 / 11,25 / 11,35	163 + 181 + 165	11,0-12,0
7	Esfenvalerato	12,55	125 + 167 + 225	12,4-13,2

$t_R$  = Tempo de retenção

#### **2.2.4. Amostras**

Foram adquiridas no mercado farinhas de trigo isentas de agrotóxicos para o desenvolvimento desse trabalho. Entretanto, durante as etapas de otimização e validação do método de extração (SLE/LTP) e análise por cromatografia gasosa, utilizando as matrizes fortificadas com os princípios ativos dos agrotóxicos, uma amostra, sem adição de agrotóxicos “branco”, também era sistematicamente analisada para garantir que os princípios ativos estudados não estavam presentes na matriz. Essas matrizes foram fortificadas com soluções padrão contendo os princípios ativos em estudo, nas concentrações necessárias para o desenvolvimento do método.

O método otimizado e validado foi empregado para determinar resíduos de agrotóxicos em amostras de farinha de trigo adquiridas aleatoriamente em mercados e feiras de Viçosa-MG.

#### **2.2.5. Preparação das amostras para o estudo de otimização**

As amostras de farinha de trigo, isenta de agrotóxicos, adquiridas no supermercado localizado na cidade de Viçosa –MG, foram armazenadas em local fresco à temperatura ambiente até o momento das análises. Para as análises foram pesados 2,0000 g da farinha de trigo, medida em balança analítica, com precisão de  $1 \times 10^{-4}$  g em frascos de vidro transparente com capacidade de 22 mL, sendo fortificados com 100  $\mu$ L das soluções de trabalho contendo agrotóxicos. As amostras fortificadas tinham 100  $\mu$ g  $\text{kg}^{-1}$  de bifentrina, permetrina e tebuconazol e 400  $\mu$ g  $\text{kg}^{-1}$  de pirimifós-metílico, clorpirifós, cipermetrina e esfenvalerato. Após adição dos analitos, as amostras foram agitadas em vórtex por 10 s e deixadas em repouso por 2 h para que houvesse maior interação dos agrotóxicos com a amostra. Posteriormente, estas amostras foram submetidas aos procedimentos de extração para estabelecer as condições ótimas para determinação de agrotóxicos, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

#### **2.2.6. Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP)**

##### **2.2.6.1. Extração dos agrotóxicos em farinha de Trigo**

Aos frascos de vidro transparente contendo 2,0000 g de farinha de trigo fortificada, foram adicionados 3,00 mL água e 4,00 mL acetonitrila volumes esses previamente estabelecidos para definir a quantidade mínima necessária para se fazer a extração nesta matriz. Em seguida, o frasco era agitado por 30 s em vórtex, centrifugado a 1724 g por 3 min e colocado em *freezer* a  $-20$  °C,

por 4 h. Após a separação por congelamento da farinha de trigo juntamente com a fase aquosa, 1,50 mL da fase orgânica sobrenadante contendo os agrotóxicos foi retirada do frasco e colocada diretamente no frasco de amostra (*vial*) para análise. Quando necessário, os extratos foram armazenados em freezer, até o momento da análise. Os extratos foram analisados por GC-MS nas condições analíticas previamente otimizadas.

#### 2.2.6.2. Otimização do método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP)

Para avaliar os efeitos dos fatores volume de solvente extrator, volume de água destilada, tempo de agitação em vórtex, tempo de centrifugação e tempo de congelamento em *freezer* foi realizado um planejamento fatorial fracionário  $2^{(5-1)}$ , com ponto central (n=4) (Tabela 14). O modelo, foi gerado pelo software de estatística (Statistica, versão 8.0) a fim de descrever a influência das combinações das variáveis testadas sobre as respostas cromatográficas.

**Tabela 14.** Variáveis, níveis e matriz do planejamento fatorial utilizado para otimização dos métodos SLE/LTP para farinha de trigo

Ensaio	Volume de água destilada (mL)		Volume de ACN (mL)		Tempo de agitação (s)		Tempo de centrifugação (min)		Tempo de congelamento (h)	
	Real	Código	Real	Código	Real	Código	Real	Código	Real	Código
1	3,0	-	4,0	-	30,0	-	3,0	-	6,0	+
2	3,0	-	4,0	-	30,0	-	9,0	+	4,0	-
3	3,0	-	4,0	-	60,0	+	3,0	-	4,0	-
4	3,0	-	4,0	-	60,0	+	9,0	+	6,0	+
5	3,0	-	6,0	+	30,0	-	3,0	-	4,0	-
6	3,0	-	6,0	+	30,0	-	9,0	+	6,0	+
7	3,0	-	6,0	+	60,0	+	3,0	-	6,0	+
8	3,0	-	6,0	+	60,0	+	9,0	+	4,0	-
9	5,0	+	4,0	-	30,0	-	3,0	-	4,0	-
10	5,0	+	4,0	-	30,0	-	9,0	+	6,0	+
11	5,0	+	4,0	-	60,0	+	3,0	-	6,0	+
12	5,0	+	4,0	-	60,0	+	9,0	+	4,0	-
13	5,0	+	6,0	+	30,0	-	3,0	-	6,0	+
14	5,0	+	6,0	+	30,0	-	9,0	+	4,0	-
15	5,0	+	6,0	+	60,0	+	3,0	-	4,0	-
16	5,0	+	6,0	+	60,0	+	9,0	+	6,0	+
17	4,0	0	5,0	0	45,0	0	6,0	0	5,0	0
18	4,0	0	5,0	0	45,0	0	6,0	0	5,0	0
19	4,0	0	5,0	0	45,0	0	6,0	0	5,0	0
20	4,0	0	5,0	0	45,0	0	6,0	0	5,0	0

### **2.2.7. Validação do método**

A validação do método analíticos SLE/LTP-GC-MS otimizado busca atender aos critérios estabelecidos pelo órgãos regulamentadores ANVISA, Resolução RDC nº 166/17 (ANVISA, 2017), INMETRO, DOQ-CGCRE-008, (INMETRO, 2018) e MAPA (MAPA, 2011). As figuras de mérito avaliadas foram a seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, precisão e efeito de matriz.

#### **2.2.7.1. Seletividade**

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas dos extratos das amostras de farinha de trigo isentas dos agrotóxicos (branco) com os cromatogramas dos extratos das amostras fortificadas com os agrotóxicos. Para obtenção desses extratos as amostras foram submetidas ao procedimento de extração SLE/LTP otimizado e posterior análise por GC-MS. As análises dos dados cromatográficos foram feitas utilizando o *software* GCsolution (Shimadzu) e os cromatogramas obtidos com auxílio do *software* OrigenPro8.

#### **2.2.7.2. Linearidade da resposta do método**

Para o estudo da linearidade do método, amostras de farinha de trigo, foram fortificadas em triplicata com bifentrina, esfenvalerato, permetrina, pirimifós-metílico e tebuconazol nas seguintes concentrações 66; 116; 166; 216; 266  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e com cipermetrina e clorpirifós nas concentrações 70; 120; 170; 220; 270  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e submetidas ao método SLE/LTP otimizado. Os extratos foram analisados por GC-MS e as áreas dos análitos de interesse obtidas foram utilizadas para construção de uma curva analítica (áreas dos picos versus concentração). A linearidade foi determinada com base no coeficiente de determinação ( $r^2$ ), coeficiente de correlação ( $r$ ) e gráfico de resíduos.

#### **2.2.7.3. Limite de detecção e limite de quantificação**

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram definidos em termos do desvio-padrão de medidas do branco analítico em relação a inclinação da curva analítica, calculados conforme as Equações 1 e 2.

$$LD = 3,3 \frac{s}{S} \quad (\text{Equação 1})$$

$$LQ = 10 \frac{s}{S} \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo:

s = Desvio padrão das áreas obtidas para branco da matriz;

S = Inclinação da curva analítica.

#### 2.2.7.4. Exatidão

A exatidão do método proposto foi realizada por ensaios de recuperação. Tais ensaios consiste em aplicar o método de extração, em amostras de farinha de trigo fortificadas em 3 diferentes concentrações 66, 166 e 266  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para os agrotóxicos bifentrina, esfenvalerato, permetrina, pirimifós-metílico e tebuconazol e 70, 170 e 270  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para os agrotóxicos cipermetrina e clorpirifós. Estes experimentos foram feitos em triplicata e a exatidão foi avaliada pela porcentagem de recuperação (%R) conforme a Equação 3.

$$\%R = \left[ \frac{C_E \times 100}{C_R} \right] \quad (\text{Equação 3})$$

Em que:

$C_E$  = Média das concentrações obtidas experimentalmente;

$C_R$  = Concentração real (concentração em que as amostras foram fortificadas).

As médias das concentrações obtidas experimentalmente foram calculadas por meio das equações da reta de cada analito, obtidas pelas curvas analíticas.

#### 2.2.7.5. Precisão

A avaliação da precisão do método SLE/LTP otimizado em farinha de trigo foi realizada por estudos de repetitividade e de precisão intermediária. A precisão representa a dispersão de seus resultados em diferentes ensaios. Tais resultados são avaliados através do coeficiente de variação (CV) calculado conforme a Equação 4.

$$CV = \left( \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \right) \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

s = Desvio padrão das concentrações obtidas experimentalmente para o analito de interesse;

$\bar{x}$  = Média das concentrações obtidas experimentalmente para o analito;

#### **2.2.7.5.1. Repetitividade**

A repetitividade foi avaliada tendo como base o guia da ANVISA (2017). O experimento foi realizado em triplicata para 3 diferentes concentrações 66, 166 e 266  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para os agrotóxicos bifentrina, esfenvalerato, permetrina, pirimifós-metílico e tebuconazol e 70, 170 e 270  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para os agrotóxicos cipermetrina e clorpirifós.

#### **2.2.7.5.2. Precisão intermediária**

Neste estudo, a precisão intermediária foi avaliada pelo mesmo analista empregando os mesmos equipamentos e condições analíticas em 3 dias diferentes (dia 1, dia 3 e dia 5). As amostras foram fortificadas em 3 concentrações diferentes, sendo 66, 166 e 266  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para os agrotóxicos bifentrina, esfenvalerato, permetrina, pirimifós-metílico e tebuconazol e 70, 170 e 270  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para os agrotóxicos cipermetrina e clorpirifós.

#### **2.2.8. Efeito de matriz**

O efeito de matriz foi analisados pelas curvas analíticas dos agrotóxicos preparados em solvente puro (acetonitrila) e no extrato orgânico da matriz farinha de trigo após a aplicação do método SLE/LTP. Ambas as curvas analíticas foram construídas em concentrações de 8, 33, 58, 83, 108 e 133  $\mu\text{g L}^{-1}$  para pirimifós-metílico, tebuconazol, bifentrina e permetrina e para clorpirifós em 10, 35, 60, 85, 110 e 135  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A determinação do efeito de matriz percentual (%EM) foi calculado conforme a Equação 5 (KWON *et al.*, 2012).

$$\%EM = \left[ \frac{a_E - a_S}{a_S} \right] \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:  $a_E$  = Inclinação da curva analítica de cada agrotóxico preparada em extrato da matriz e  
 $a_S$  = Inclinação da curva analítica de cada agrotóxico preparada em solvente puro.

### 2.2.9. Aplicação do método

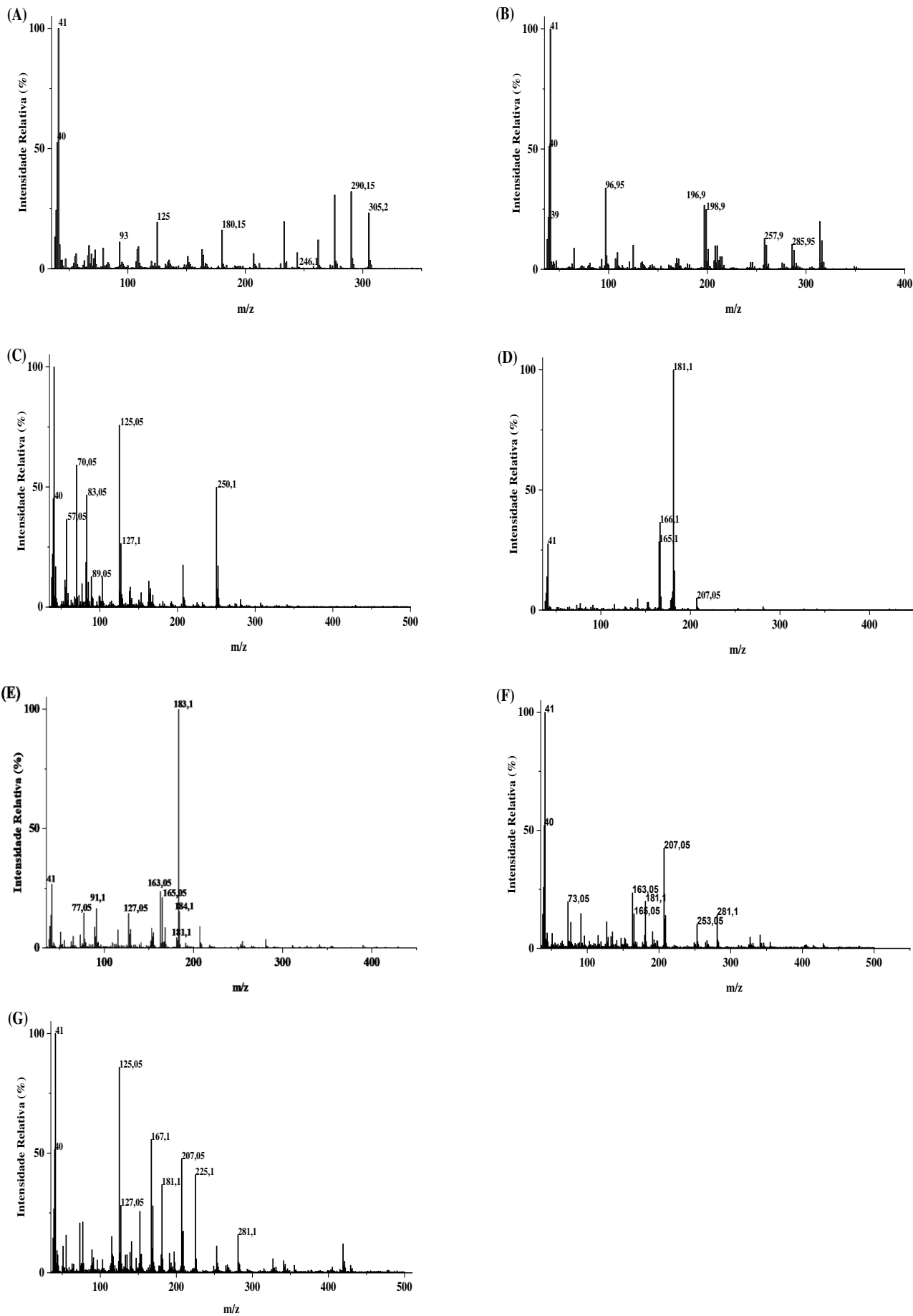
Após o desenvolvimento do método e validação foram adquiridos 6 diferentes marcas de farinhas de trigo, 1 de farinha de trigo integral e 1 marca de farelo de trigo compradas nos supermercados e feiras de Viçosa-MG. Posteriormente o método desenvolvido foi aplicado em farinhas não fortificadas para determinação de resíduos de agrotóxicos.

## 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

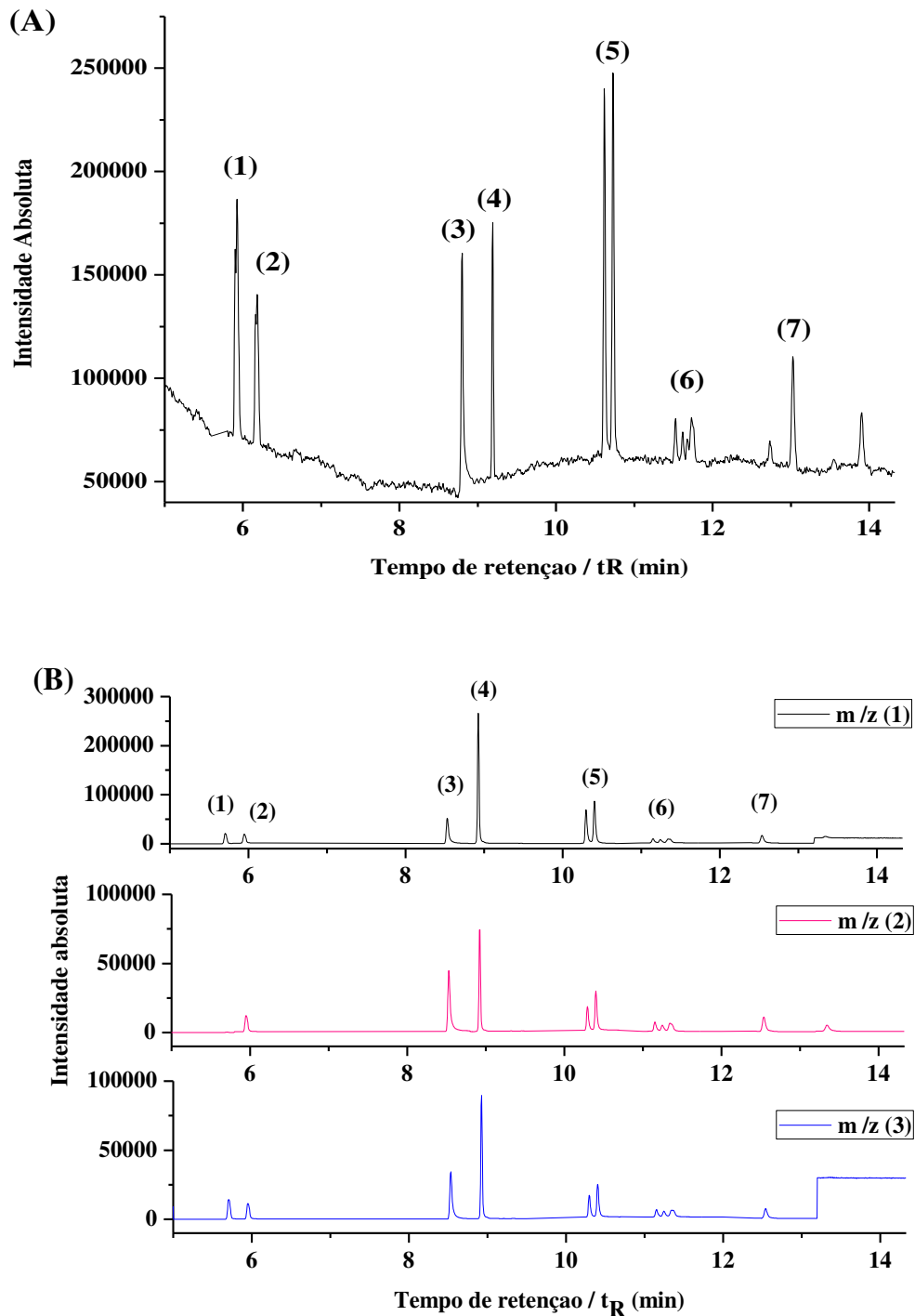
### 2.3.1. Análises cromatográfica do método

Análises por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas foram realizadas no modo *Scan* e *SIM* para identificar e quantificar, respectivamente, os analitos de interesse. Para determinar o tempo de retenção dos analitos e o espectro de massas de cada composto (Figura 16), uma solução-padrão contendo os agrotóxicos pirimifós-metílico, clorpirifós, tebuconazol, bifentrina, permetrina, cipermetrina e esfenvalerato na concentração de 2 mg L<sup>-1</sup> foi preparada em acetonitrila e analisada no modo *Scan* (Figura 17 (A)). Com auxílio da biblioteca (*NIST* 2014) foi possível identificar cada agrotóxico em estudo.

A Figura 17 (B) (*m/z* (1); *m/z* (2) e *m/z* (3)) apresenta o cromatograma no modo *SIM* de uma solução-padrão contendo todos os analitos na concentração de 85 µg L<sup>-1</sup>. Este cromatograma foi subdividido em três, considerando as razões massa carga de cada agrotóxico em seu respectivo tempo de retenção (Tabela 3), isto é *m/z* (1) se refere às primeiras *m/z* de cada composto, *m/z* (2) se refere às segundas *m/z* de cada composto e *m/z* (3) se refere às terceiras *m/z* de cada composto. Observa-se que os picos foram simétricos, possibilitando uma boa separação e resolução dos princípios ativos analisados para ambos os modos de injeção no GC-MS. O tempo total de análise obtido foi de 14,33 min.



**Figura 16.** Espectros de massas total (*Scan*) para os agrotóxicos pirimifós-metílico (A), clorpirifós (B), tebuconazol (C) e bifentrina (D), permetrina (E), cipermetrina (F) e esfenvalerato (G).



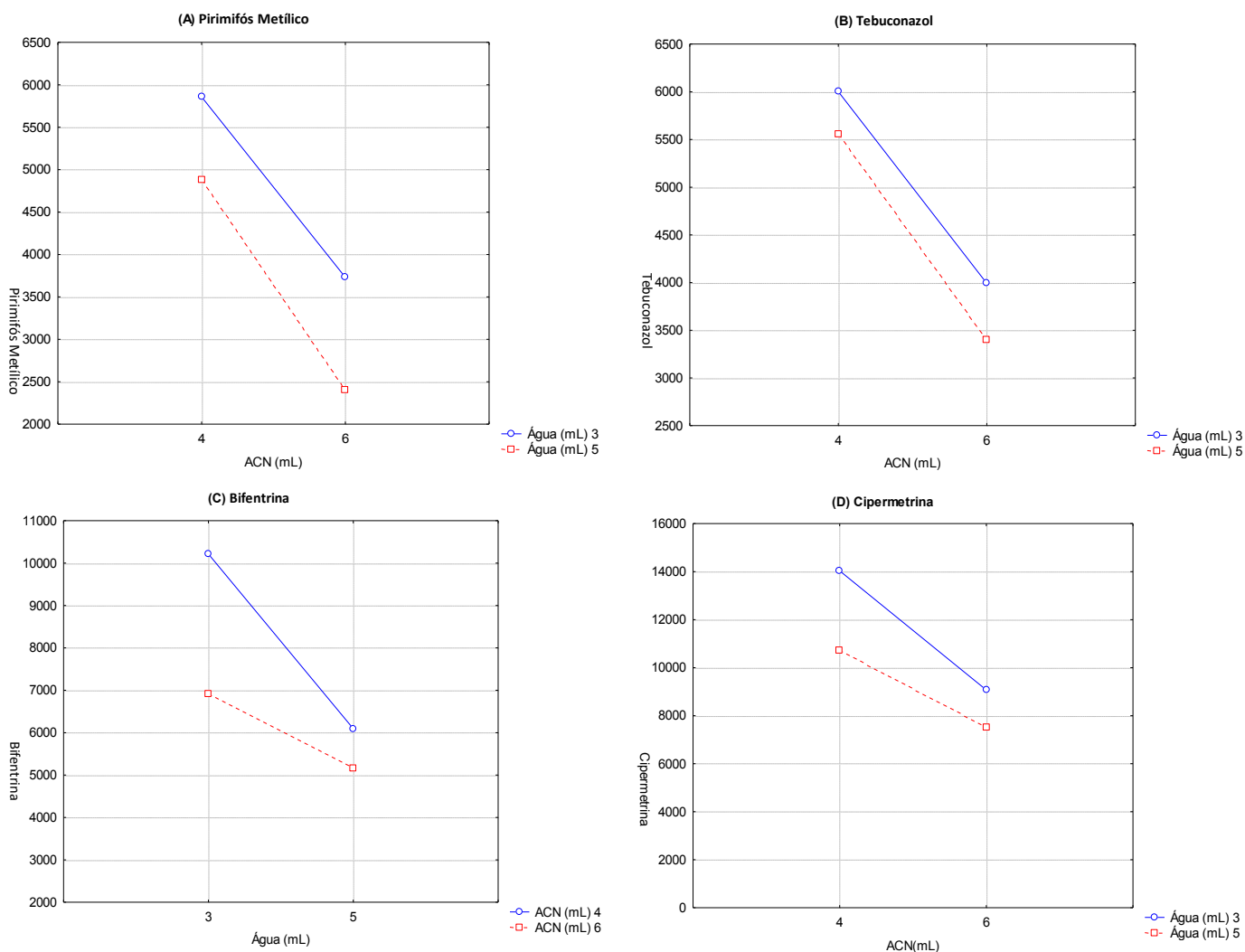
**Figura 17.** (A) Cromatograma no modo *Scan* de uma solução-padrão contendo todos os agrotóxicos na concentração 2 mg L<sup>-1</sup>. (B) Cromatograma no modo SIM de uma solução-padrão contendo todos os analitos na concentração 85 µg L<sup>-1</sup>, sendo, m / z (1)= 290; 97; 125; 181; 183; 163 e 125, m / z (2)= 246; 197; 70; 165; 163; 181; 167, m / z (3)= 305; 199; 250; 166; 165; 165; 225. (B). Os tempos de retenção obtidos foram: (1) pirimifós-metílico (t<sub>R</sub> = 5,70 min), (2) clorpirifós (t<sub>R</sub> = 5,95 min), (3) tebuconazol (t<sub>R</sub> = 8,53 min), (4) bifentrina (t<sub>R</sub> = 8,93min), (5) permetrina (t<sub>R</sub> = 10,297 / 10,404), (6) cipermetrina (t<sub>R</sub> = 11,152 / 11,245 / 11,342) e (7) esfenvalerato

### 2.3.2. Otimização do método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP)

No planejamento descrito no item 2.2.6.2., foram avaliadas as variáveis volume de solvente extrator, acetonitrila (ACN), volume de água destilada, tempo de agitação, tempo de centrifugação e tempo de congelamento. E a significância de cada fator foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) usando níveis de significância p-valor. A área de cada agrotóxico obtida pela análise do extrato de cada ensaio foi determinada experimentalmente e utilizada como resposta para gerar os gráficos das médias marginais. Estes gráficos mostram os valores dos efeitos de cada uma das variáveis: volume de ACN e água destilada, possibilitando verificar se os mesmos são estatisticamente significativos.

Na Figura 18, são apresentados os gráficos de médias marginais para os efeitos do volume de ACN e do volume de água sobre a extração dos agrotóxicos da farinha de trigo. Verificou-se que o limite mínimo do fator volume do solvente extrator (4,00 mL) e o volume mínimo de água (3,00 mL) apresentaram efeito significativo, a 95% de significância ( $p < 0,05$ ), para os compostos pirimifós-metilíco, tebuconazol, bifentrina e cipermetrina. Para os demais agrotóxicos não foram significativos. Constatou-se que os fatores tempo de agitação, tempo de centrifugação e tempo de congelamento não foram significativos para extração dos agrotóxicos em estudo. Assim, optou-se pelo uso de 4,00 mL de acetonitrila e 3,00 mL de água, 30 s de agitação em vórtex, 3 min de centrifugação e 4 h de congelamento em *freezer* a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

O método SLE/LTP otimizado apresentou baixo consumo de amostra e de solvente extrator, em relação ao trabalho desenvolvido por KOLBERG *et al.* (2011) para determinação de agrotóxicos em amostras secas (grão de trigo, farinha e farelo), o qual utilizou 10 mL de solvente extrator (ACN) e 10 g de amostra. Além disso, no método SLE/LTP desenvolvido não foi necessário implementar etapas de evaporação e de *clean-up*, o que reduziu os riscos de contaminação e perdas de amostras.



**Figura 18.** Diagramas das médias marginais dos efeitos das variáveis volume de acetonitrila (ACN) e volume de água para pirimifós-metílico (A), tebuconazol (B), bifentrina (C) e cipermetrina (D).

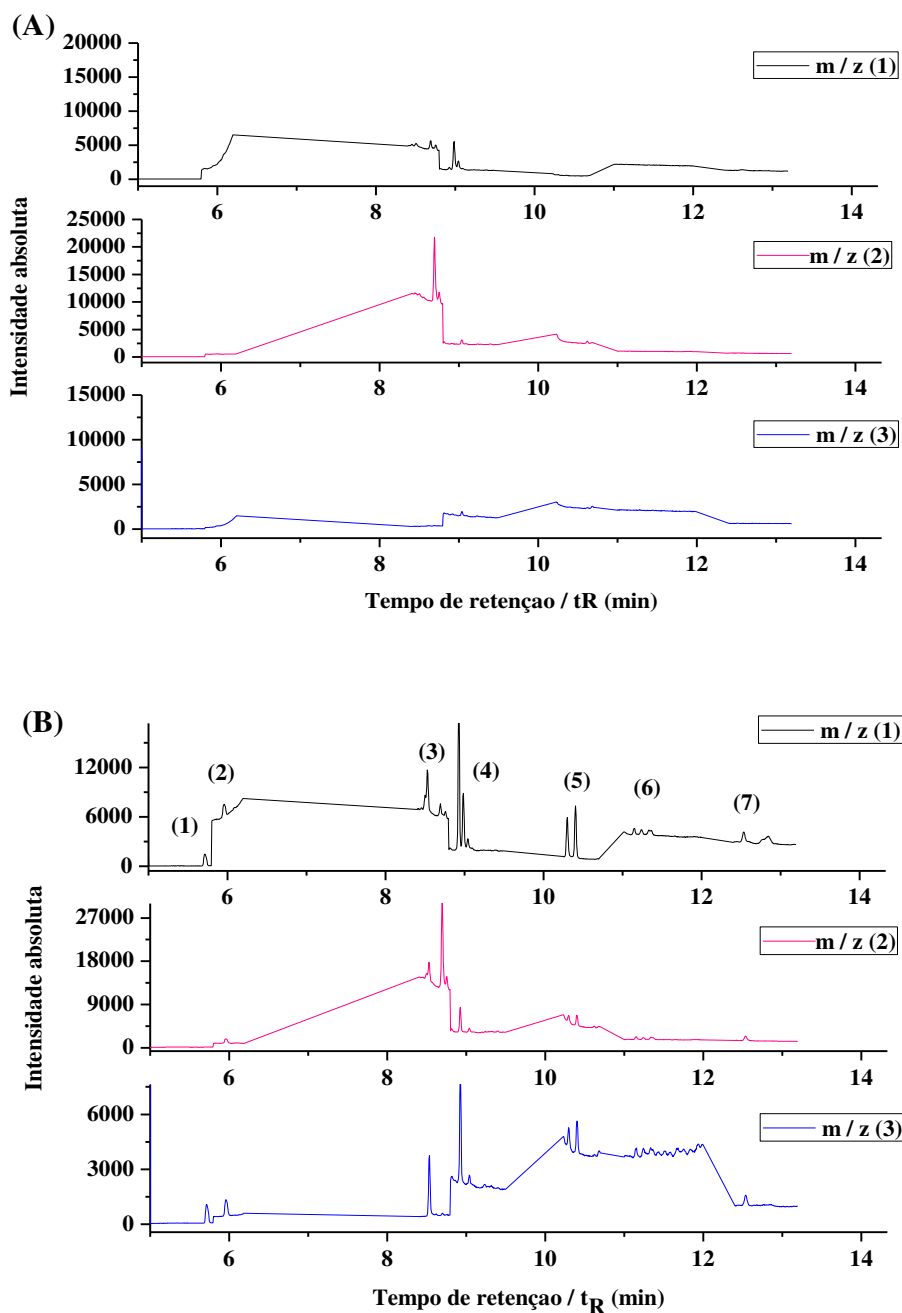
### 2.3.3. Validação do método

#### 2.3.3.1. Seletividade

A seletividade do método analítico consiste em identificar ou quantificar o analito de interesse, mesmo na presença de impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2017; RIBANI *et al.*, 2004). Para os métodos cromatográficos a seletividade é analisada a fim de garantir que o pico de resposta do analito identificado pelo tempo de retenção seja proveniente do mesmo e não de interferentes presentes na amostra (PASCHOAL *et al.*, 2008).

Contudo, para avaliar a seletividade do método foi realizada a comparação do cromatograma das amostras de farinha de trigo otimizado isentas dos agrotóxicos com os

cromatogramas das amostras de farinha de trigo fortificados com os agrotóxicos, conforme apresentados na Figura 19.



**Figura 19.** (A) Cromatograma da análise GC-MS das amostras de farinha de trigo, isentas dos analitos. (B) Cromatograma das amostras de farinha de trigo fortificadas com  $266 \mu\text{g kg}^{-1}$  de (1) pirimifós-metílico ( $t_R = 5,7$ ), (3) tebuconazol ( $t_R = 8,5$ ), (4) bifentrina ( $t_R = 8,9$ ), (5) permetrina ( $t_R = 10,3 / 10,4$ ) e (7) esfenvalerato ( $t_R = 12,5$ ) e  $270 \mu\text{g kg}^{-1}$  (2) clorpirifós ( $t_R = 5,9$ ) e (6) cipermetrina ( $t_R = 11,1 / 11,2 / 11,3$ ). Sendo, m / z (1)= 290; 97; 125; 181; 183; 163 e 125, m / z (2)= 246; 197; 70; 165; 163; 181; 167, m / z (3)= 305; 199; 250; 166; 165; 165; 225.

Observa-se que os cromatogramas dos extratos do branco da matriz e da matriz fortificada obtidos pelo método SLE/LTP otimizado foram seletivos para os sete agrotóxicos em estudo, pois os extratos dos brancos não mostram picos de interferentes no mesmo tempo de retenção dos compostos analisados. O método proposto se mostrou seletivo, não sendo afetado pelos outros constituintes da matriz ou por interferentes dos reagentes e solventes.

### 2.3.3.2. Linearidade de resposta do método

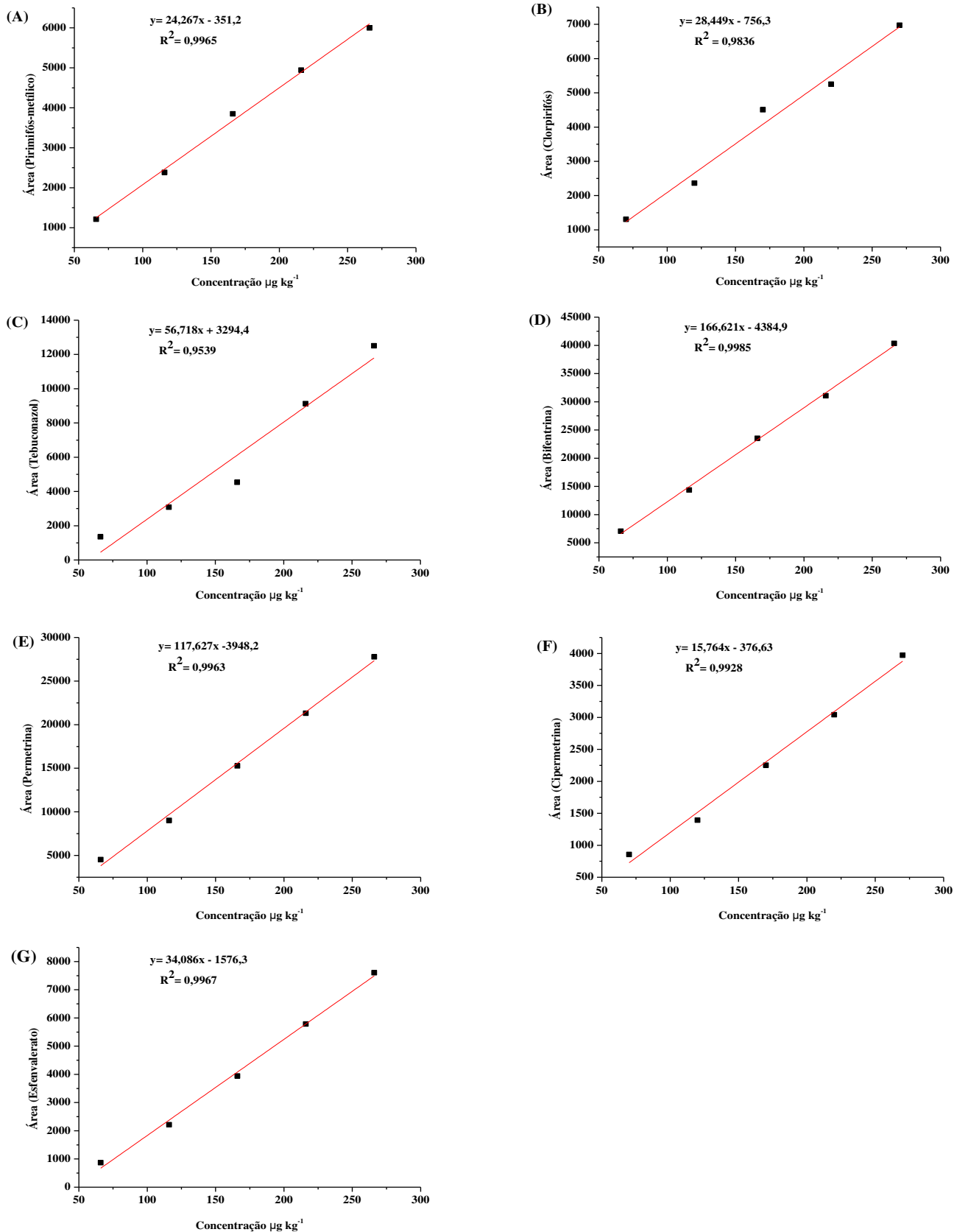
O estudo de linearidade do método consiste em demonstrar a capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (ANVISA, 2017). O parâmetro utilizado para estimar a linearidade do método foi o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), coeficiente de correlação ( $r$ ) e gráfico de resíduos. De acordo com a (ANVISA, 2017) coeficiente de correlação ( $r$ ) deve estar acima de 0,990.

**Tabela 15.** Equações da reta e coeficiente de correlação ( $r$ ) dos agrotóxicos pirimifós-metílico, clorpirifós, tebuconazol, bifentrina, permetrina, cipermetrina e esfenvalerato

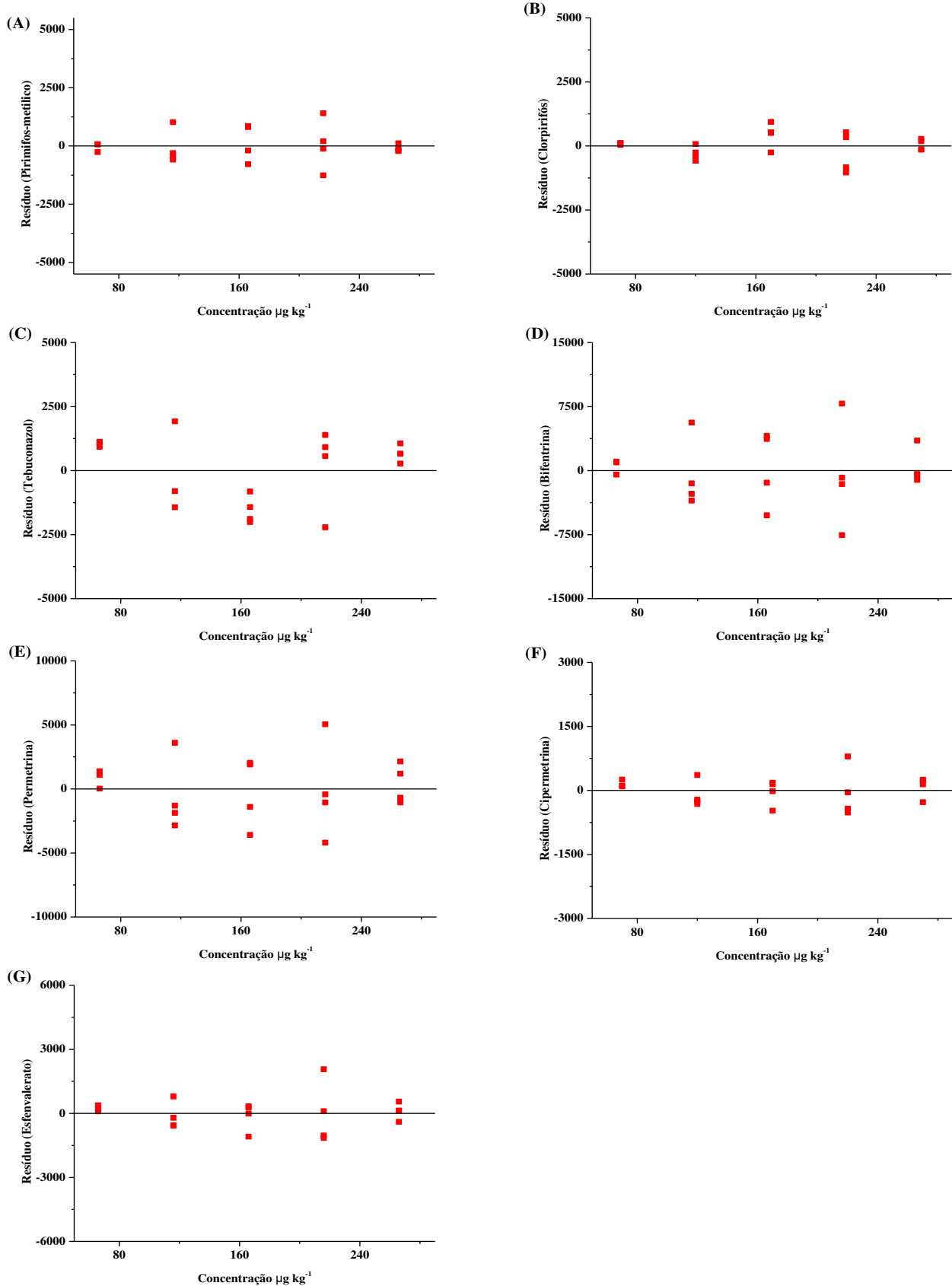
Agrotóxico	Modelo linear	Coefficiente de correlação ( $r$ )
Pirimifós-metílico	$A = 24,267c - 351,2$	0,9982
Clorpirifós	$A = 28,449c - 756,3$	0,9918
Tebuconazol	$A = 56,718c - 3294,4$	0,9767
Bifentrina	$A = 166,621c - 4384,9$	0,9992
Permetrina	$A = 117,627c - 3948,2$	0,9981
Cipermetrina	$A = 15,764c - 376,63$	0,9964
Esfenvalerato	$A = 34,086c - 1576,3$	0,9983

A = Área; c = concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )

Os coeficientes de correlação ( $r$ ), descritos na Tabela 15 para todos os agrotóxicos, exceto tebuconazol, foram acima de 0,990, atendendo as exigências da ANVISA. Apesar do coeficiente de correlação ( $r$ ) indicar se a reta é adequada ao modelo matemático, ele não é conclusivo. Desse modo, devem ser avaliados os gráficos de resíduos para verificar essa adequação (INMETRO, 2018). Os gráficos de resíduos de todos os agrotóxicos (Figura 21) apresentaram comportamento aleatório. Como não demonstram um padrão de distribuição pode-se dizer que a variância é constante e que a relação é linear. Isso indica que o modelo de regressão escolhido se ajustou adequadamente aos dados.



**Figura 20.** Curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de farinha de trigo, fortificadas com padrão dos analitos e submetidas à SLE/LTP e analisado por GC-MS, em uma faixa de concentração de 66 a 266  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para (A) pirimifós-metílico, (C) tebuconazol, (D) bifentrina, (E) permetrina e (G) esfenvalerato e 70 a 270  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para (B) clorpirifós e (F) cipermetrina.



**Figura 21.** Gráficos de resíduos para curva analítica de amostras de farinha de trigo, fortificadas com padrão dos analitos e submetidas à SLE/LTP e analisado por GC-MS, em uma faixa de concentração de 66 a 266  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para (A) pirimifós-metílico, (C) tebuconazol, (D) bifentrina, (E) permetrina e (G) esfenvalerato e 70 a 270  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para (B) clorpirifós e (F) cipermetrina.

### 2.3.3.3. Limite de detecção e limite de quantificação do método

O limite de detecção de acordo com a ANVISA é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado. Já o limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2017).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método foram calculados conforme as Equações 1 e 2, e descritos na Tabela 16.

**Tabela 16.** Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método para os sete agrotóxicos em estudo

Agrotóxico	LD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Pirimifós-metílico	2,8	8,5
Clorpirifós	4,5	13,5
Tebuconazol	0,26	0,79
Bifentrina	0,23	0,68
Permetrina	1,0	3,1
Cipermetrina	6,6	19,7
Esfenvalerato	2,1	6,4

LD = Limite de detecção; LQ = Limite de quantificação

Os valores dos limites de detecção obtidos para os agrotóxicos, utilizando GC-MS variaram de 0,23 a 6,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e os limites de quantificação variaram de 0,68 a 19,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Os menores valores de LD e LQ são observados para bifentrina e tebuconazol.

O método otimizado proporcionou valores de LD e LQ abaixo dos LMRs estabelecidos pela ANVISA, Codex e União Européia (Tabela 1). Estes também foram menores do que os obtidos por REZAEI *et al.* (2017) para análise de resíduos de agrotóxicos em farinha de trigo aplicando o método QuEChERS por GC-MS. Eles obtiveram valores de LD e LQ de 10 e 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente.

### 2.3.3.4. Exatidão do método

A exatidão de um método analítico reflete o grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. De acordo com

a ANVISA (2017) para verificar a exatidão deve-se realizar no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações, com 3 (três) réplicas em cada nível (ANVISA, 2017).

**Tabela 17.** Porcentagens de recuperação (%R) obtidos para análise de amostras de farinha de trigo fortificadas em três níveis de concentração

Agrotóxico	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	R (% $\pm$ DP)
Pirimifós-metílico	66	89,9 $\pm$ 3,92
	166	111,2 $\pm$ 8,26
	266	98,8 $\pm$ 6,58
Clorpirifós	70	86,1 $\pm$ 2,13
	170	115,8 $\pm$ 12,5
	270	98,1 $\pm$ 22,5
Tebuconazol	66	95,4 $\pm$ 12,5
	166	105,1 $\pm$ 8,05
	266	99,5 $\pm$ 3,42
Bifentrina	66	100,7 $\pm$ 5,88
	166	99,1 $\pm$ 5,84
	266	100,1 $\pm$ 8,43
Permetrina	66	98,5 $\pm$ 0,55
	166	101,7 $\pm$ 7,39
	266	99,8 $\pm$ 7,28
Cipermetrina	70	98,6 $\pm$ 10,6
	170	101,6 $\pm$ 5,00
	270	99,8 $\pm$ 11,4
Esfenvalerato	70	99,4 $\pm$ 12,5
	170	100,7 $\pm$ 8,45
	270	99,9 $\pm$ 1,94

R (%  $\pm$  DP) = Porcentagem de recuperação mais ou menos o desvio padrão

A recuperação do método desenvolvido ficou entre 86,1 e 115,8%. Estes valores de recuperação estão dentro dos intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos de agrotóxicos, que geralmente estão entre 70 a 120% (MAPA, 2011). Assim, o método teve uma boa exatidão, sendo adequado para extração e análise dos agrotóxicos pirimifós-metílico, clorpirifós, tebuconazol, bifentrina, permetrina, cipermetrina e esfenvalerato.

### 2.3.3.5. Precisão

A precisão do método é medida por meio da repetibilidade e precisão intermediária, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão e coeficiente de variação. De acordo com a ANVISA

(2017) o experimento de precisão deve ser feito em três dias, com três níveis de concentração e em triplicata.

### 2.3.3.5.1. Repetitividade

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, sendo essas: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local, repetições em um curto intervalo de tempo (ANVISA, 2017).

**Tabela 18.** Coeficientes de variação (CV) obtidos para análise das amostras de farinha de trigo fortificadas em três níveis de concentração. Sendo estes ensaios intra-dia

Agrotóxicos	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	CV (%)
Pirimifós-metílico	66	12,9
	166	6,6
	266	3,4
Clorpirifós	70	4,4
	170	2,1
	270	8,3
Tebuconazol	66	3,8
	166	1,9
	266	3,2
Bifentrina	66	8,9
	166	9,1
	266	3,6
Permetrina	66	14,3
	166	7,3
	266	3,9
Cipermetrina	70	16,9
	170	7,4
	270	2,1
Esfenvalerato	70	12,7
	170	7,3
	270	4,7

CV = Coeficiente de variação

Os resultados descritos na Tabela 18 mostraram uma boa repetitividade para todos os agrotóxicos, em que os CVs foram menores que 20% (MAPA, 2011).

### 2.3.3.5.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária indica os efeitos das variações dentro do laboratório, como: diferentes dias, diferentes analistas ou diferentes equipamentos. Verificando se o método fornecerá os mesmos resultados (ANVISA, 2017). A estimativa dessa precisão foi feita por meio dos coeficientes de variação (CV), conforme descrito no item 2.2.7.5.2. Os resultados estão apresentados na Tabela 19.

**Tabela 19.** Coeficientes de variação (CV) obtidos para análise das amostras de farinha de trigo em três níveis de concentração (inter-dia)

Agrotóxicos	Precisão intermediária (n=3)	
	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	CV (%)
Pirimifós-metílico	66	10,6
	166	11,6
	266	2,5
Clorpirifós	70	9,7
	170	8,0
	270	6,2
Tebuconazol	66	18,4
	166	13,2
	266	4,0
Bifentrina	66	7,4
	166	10,5
	266	3,6
Permetrina	66	9,6
	166	9,2
	266	3,7
Cipermetrina	70	13,3
	170	7,7
	270	4,2
Esfenvalerato	70	10,0
	170	8,7
	270	3,5

CV = Coeficiente de variação

Nota-se, uma boa precisão intermediária para todos os agrotóxicos, pois os coeficientes de variação do método desenvolvido foi menor que 20% (MAPA, 2011).

#### 2.3.4. Efeito de matriz

A avaliação do efeito de matriz foi realizada comparando as curvas analíticas de análises cromatográficas obtidas da solução padrão preparadas em acetronitrila e no extrato orgânico da farinha de trigo insenta de agrotóxicos, obtidos após a realização da extração SLE/LTP. A presença de co-extrativos podem levar alterações da resposta cromatografica induzida pela matriz (PINHO *et al.*, 2009).

Para todos os agrotóxicos pirimifós-metilíco, clorpirifós, tebuconazol, bifentrina e permetrina, nota-se na Figura 22 que os coeficientes angulares foram menores para as curvas analíticas preparadas em acetnitrila, obtendo menores respostas cromatográficas quando comparadas aos coeficientes angulares das curvas preparadas no extrato da matriz. Isso indica que os interferentes da matriz influenciaram positivamente na quantificação dos analitos nessa faixa de concentração.

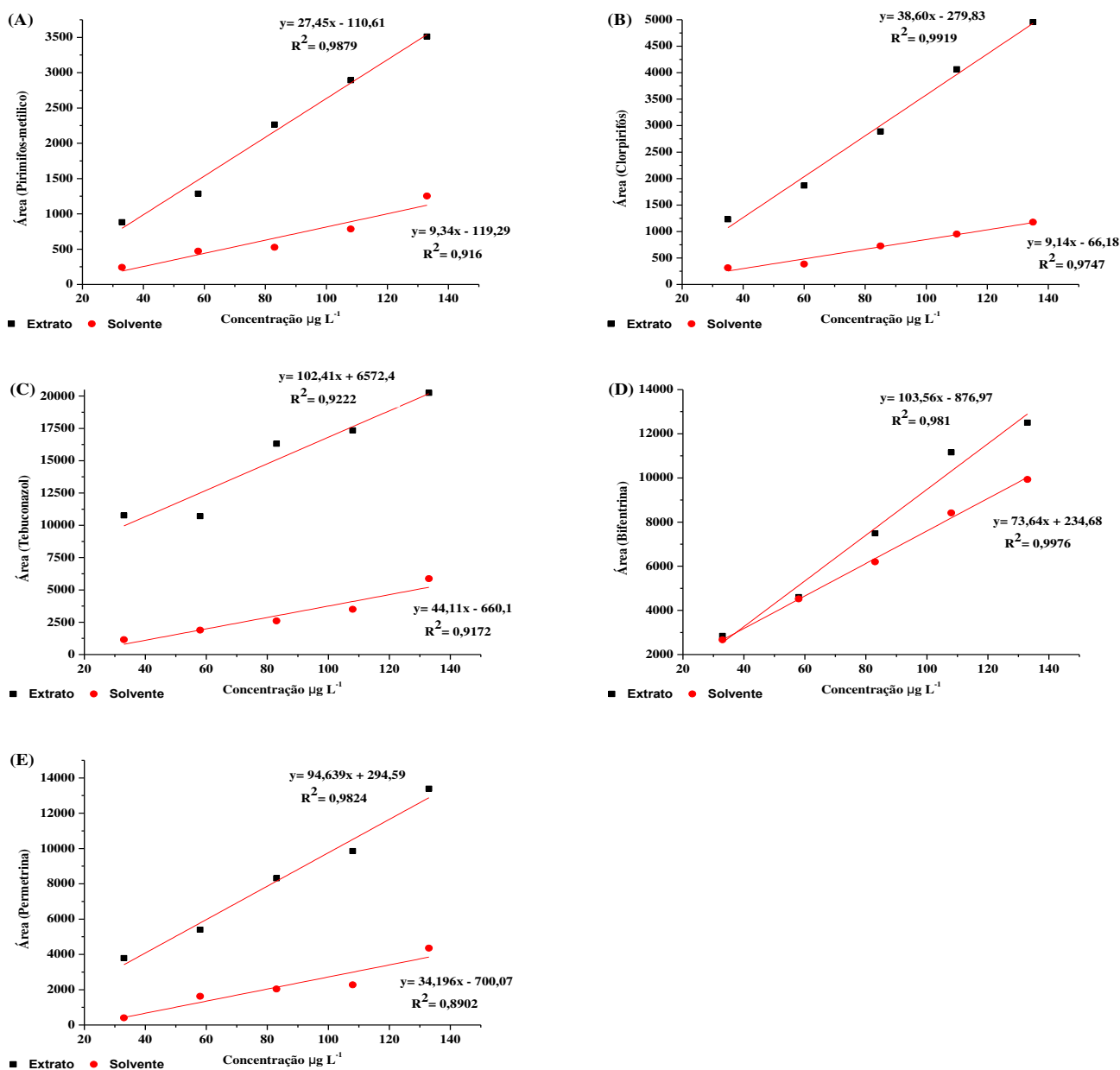
O efeito de matriz percentual para cada agrotóxico foi determinado a partir da Equação 5. E descritos na Tabela 20.

**Tabela 20.** Porcentagem do efeito de matriz para cada agrotóxico

Agrotóxico	EM (%)
Pirimifós-metilíco	194,0
Clorpirifós	321,9
Tebuconazol	132,2
Bifentrina	40,63
Permetrina	176,8

EM (%) = porcentagem efeito de matriz

Os resultados da Tabela 20, mostraram que para a todos os agrotóxicos houve um aumento positivo nas respostas cromatográficas. Esse aumento na resposta cromatográfica, pode ser devido aos co-extrativos da matriz ocuparem os sítios ativos do injetor em uma quantidade significativa em relação aos analitos. Com isso, uma quantidade maior do analito é transferida para coluna cromatográfica (HAJŠLOVÁ & ZROSTLIKOVA, 2003, SOUSA *et al.*, 2012).



**Figura 22.** Gráficos das curvas analíticas preparadas em acetonitrila e no extrato para cada agrotóxicos, em uma faixa de concentração de 8, 33, 58, 83, 108 e 133  $\mu\text{g L}^{-1}$  para pirimifós-metilico (A), tebuconazol (C), bifentrina (D) e permetrina (E) e para clorpirifós (B) em 10, 35, 60, 85, 110 e 135  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

### 2.3.5. Aplicação do método

O método SLE/LTP desenvolvido, otimizado e validado, foi aplicado na determinação de agrotóxicos em 8 amostra comerciais, sendo 6 de farinhas de trigo, 1 de farinha de trigo integral e 1 de fibra de trigo, a fim de verificar a eficiência do método proposto. Essas amostras foram analisadas em triplicada.

Os resultados são apresentados na Tabela 21. Nesta, está presente também os valores de limite máximo de resíduos permitidos para farinha de trigo pelos órgãos regulamentadores, ANVISA, Codex e União Europeia (UE).

**Tabela 21.** Níveis de agrotóxicos ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) encontrados em farinha e farelo de trigo distribuídas em Viçosa-MG e os limites máximos de resíduos permitidos pelos órgãos regulamentadores

Agrotóxico	Concentração ( $\text{mg kg}^{-1}$ )										
	LMR			Farinha de trigo						Farinha de trigo integral	Farelo de trigo
	Anvisa <sup>a</sup>	Codex <sup>b</sup>	UE <sup>c</sup>	A	B	C	D	E	F	G	H
Pirimifós-metílico	0,7	0,5	0,01	0,07	n.d.	0,26	0,11	0,02	0,02	n.d.	0,51
Tebuconazol	0,2	0,1	0,05	n.d.	0,05	n.d.	0,07	n.d.	0,12	0,27	n.d.
Bifentrina	1	0,05	0,02	n.d.	n.d.	0,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,03
Permetrina	0,02	0,5	0,05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,06
Cipermetrina	5	n.a.	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,02	0,01	n.d.	0,4

LMR = Limite máximo de resíduo; n.d.= não detectado; n.a. = não autorizado. <sup>a</sup>(ANVISA, 2016), <sup>b</sup>(CODEX, 2018), <sup>c</sup>(EUROPEAN COMMISSION, 2018)

Todas as amostras apresentaram resíduos de pelo menos um dos agrotóxicos avaliados neste trabalho. Pode-se constatar que os LMRs estabelecidos pela UE são menores do que os de outros órgãos regulamentadores. Assim, todos os agrotóxicos determinados nas diversas amostras de farinha de trigo, farinha de trigo integral e farelo de trigo apresentaram valores iguais ou acima do LMR permitido pela EU, exceto a cipermetrina. Já pela ANVISA, duas amostras tiveram o nível de resíduos dos agrotóxicos permetrina e tebuconazol acima do LMR. O pirimifós-metílico foi determinado na maioria das amostras com concentrações entre 0,02 a 0,51  $\text{mg kg}^{-1}$ , sendo que esse é o agrotóxico mais utilizado em cereais (KOLBERG *et al.*, 2011). Esses resultados mostram a necessidade de se continuar monitorando a presença de resíduos nesta matriz, bem como a eficácia deste método para este fim.

## 2.4. CONCLUSÃO

O método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) para determinação de resíduos dos agrotóxicos pirimifós-metílico, clorpirifós, tebuconazol, bifentrina, permetrina, cipermetrina e esfenvalerato em farinha de trigo por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) foi otimizado e validado apresentado limites de detecção (0,23 a 6,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e limites de quantificação (0,68 a 19,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) abaixo dos limites máximos de resíduos (LMR) permitidos pela ANVISA, Codex e União Europeia. O método se mostrou viável para análise dos analitos em farinha de trigo, além de ser simples, eficaz, com baixo consumo de solvente e ser realizado em etapa única extração.

Amostras de farinha de trigo adquiridas em supermercados e feiras de Viçosa-MG, apresentaram níveis de resíduo de agrotóxicos em todas as amostras. Das oito amostras analisadas, o pirimifós-metílico foi detectado em seis. Sendo que os agrotóxicos determinados nas diversas amostras de farinha de trigo, farinha de trigo integral e farelo de trigo apresentaram valores iguais ou acima do LMR permitido pela União Europeia, exceto a cipermetrina.

Conclui-se que o método desenvolvido resultou em um método viável para análise dos analitos em amostras de farinha de trigo, por ser simples, eficaz, com baixo consumo de solvente e a extração realizado em etapa única.

## 2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Programa de análise de resíduos de agróxicos em alimentos (PARA). Relatório de Atividades de 2013 a 2015. Diário oficial da União; Poder executivo, Brasília, DF, de 25 de novembro de 2016. p. 1–246, 2016.

ANVISA. RDC N. 166, de 25 de Julho de 2017. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, v. 2017, p. 1–21, 2017.

ARAÚJO, E. A., LARA, M. C. R., REIS, M. R., VIRIATO, R. L. S., ROCHA, R. A. R., GONÇALVES, R. G. L., HELENO, F. F., QUEIROZ, M. E. L. R., TRONTO, J., PINTO, F. G. Determination of haloxyfop-methyl, linuron, and procymidone pesticides in carrot using SLE-LTP Extraction and GC-MS. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 5, p. 1344–1352, 2016.

CODEX. **Codex alimentarius international food standards**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/>>. Acesso em: 3 dez. 2018.

COSTA, A. I., QUEIROZ, M. E. L. R., NEVES, A. A., SOUSA, F. A., & ZAMBOLIM, L. Determination of pesticides in lettuce using solid-liquid extraction with low temperature partitioning. **Food Chemistry**, v. 181, p. 64–71, 2015.

ÁVILA, M. B., FARONI, L. R. A., HELENO, F. F., QUEIROZ, M. E. L. R., & COSTA, L. P. Ozone as degradation agent of pesticide residues in stored rice grains. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 12, p. 4092–4099, 2017.

FREITAS, R. D. S., FARONI, L. R. D. A., QUEIROZ, M. E. L. R., HELENO, F. F., & PRATES, L. H. F. Degradation kinetics of pirimiphos-methyl residues in maize grains exposed to ozone gas. **Journal of Stored Products Research**, v. 74, p. 1–5, 2017

SOUZA, L. P., FARONI, L. R. D. A., HELENO, F. F., PINTO, F. G., QUEIROZ, M. E. L. R., & PRATES, L. H. F. Ozone treatment for pesticide removal from carrots: Optimization by response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 243, n. May 2017, p. 435–441, 2018.

EMBRAPA. **Cultivo de trigo**. Disponível em: <[https://www.spo.cnptia.embrapa.br /conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistemasdeproducaolf6\\_lga1ceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view & p \\_ p \\_ col \\_ id=column-1&p\\_p\\_col\\_count=1&p\\_r\\_p\\_-76293187\\_sistemaProducaoId=3704&p\\_r\\_p\\_-996514994\\_topicoId=1](https://www.spo.cnptia.embrapa.br /conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6_lga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view & p _ p _ col _ id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=3704&p_r_p_-996514994_topicoId=1)>. Acesso em: 3 dez. 2018.

EUROPEAN COMMISSION. **Pesticides database - European Commission (EU)**. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage &language=EN>>. Acesso em: 3 dez. 2018.

FARIAS, A. R., MINGOTI, R., HOLLER, W., SPADOTTO, C., LOVISI FILHO, E., DA CUNHA, G. R., & SÓ E SILVA, M. Potencial de produção de trigo no Brasil a partir de diferentes cenários de expansão da área de cultivo. **Embrapa Gestão Territorial-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2016.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á., SOCAS-RODRÍGUEZ, B., HERRERO, M., HERRERA-HERRERA, A. V., & HERNÁNDEZ-BORGES, J. Dissipation kinetics of organophosphorus pesticides in milled toasted maize and wheat flour (gofio) during storage. **Food Chemistry**, v. 229, p. 854–859, 2017.

GOULART, S. M., QUEIROZ, M. E. L. R., NEVES, A. A., & QUEIROZ, J. H. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 1320–1323, 2008.

GRANDE-MARTÍNEZ, Á., ARREBOLA, F. J., MORENO, L. D., VIDAL, J. L. M., & FRENICH, A. G. Development and validation of a multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (rice and wheat flour) using liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 5, p. 1186–1198, 2015.

GULER, G. O., CAKMAK, Y. S., DAGLI, Z., AKTUMSEK, A., & OZPARLAK, H. Organochlorine pesticide residues in wheat from Konya region, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1218–1221, 2010.

HAJŠLOVÁ, J., & ZROSTLIKOVA, J. Matrix effects in (ultra) trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1-2, p. 181-197, 2003.

HE, Z., WANG, L., PENG, Y., LUO, M., WANG, W., & LIU, X. Multiresidue analysis of over 200 pesticides in cereals using a QuEChERS and gas chromatography-tandem mass spectrometry-based method. **Food Chemistry**, v. 169, p. 372–380, 2015.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. DOQ-CGCRE-008, 2018.

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**, v. 125, n. 4, p. 1436–1442, 2011.

KWON, H., LEHOTAY, S. J., & GEIS-ASTEGGIANTE, L. Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography–mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops. **Journal of chromatography A**, v. 1270, p. 235-245, 2012.

LENTZA-RIZOS, C., AVRAMIDES, E. J., CHERASCO, F. Low-temperature clean-up method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. **Journal of Chromatography A**, v. 912, n. 1, p. 135-142, 2001.

MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica. MAPA/ACS: Brasília, 2011.

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

OLIVEIRA NETO, A. A.; SANTOS, C. M. R. A cultura do trigo. **Conab**, p. 1–220, 2017.

PASCHOAL, J. A. R., RATH, S., AIROLDI, F. P. D. S., & REYES, F. G. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190–1198, 2008.

PINHO, G. P., NEVES, A. A., QUEIROZ, M. E. L. R., & SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 987-995, 2009.

PRESTES, O. D., FRIGGI, C. A., ADAIME, M. B., & ZANELLA, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009.

REZAEI, M., SHARIATIFAR, N., SHOEIBI, S., AHMADI, M. A., & KHANIKI, G. J. Simultaneous determination of residue from 58 pesticides in the wheat flour consumed in Tehran, Iran by GC/MS. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 3, p. 1050–1060, 2017.

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**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

SOUSA, F. A., COSTA, A. I. G., DE QUEIROZ, M. E. L. R., TEÓFILO, R. F., NEVES, A. A., & DE PINHO, G. P. Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA. **Food Chemistry**, v. 135, n. 1, p. 179-185, 2012.

ZAIDON, S. Z., HO, Y. B., HAMSAN, H., HASHIM, Z., SAARI, N., & PRAVEENA, S. M. Improved QuEChERS and solid phase extraction for multi-residue analysis of pesticides in paddy soil and water using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 614-621, 2019.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura SLE/LTP-GC-MS otimizado e validado para a determinação de pirimifós-metílico, clorpirifós, tebuconazol, bifentrina, permetrina, cipermetrina e esfenvalerato resultou em um método simples, eficiente, menor consumo de solvente e de amostra, gerando pequenas quantidades de rejeitos. Além disso, apresentou uma boa repetitividade e baixos valores de limite de detecção e limite de quantificação. Sendo, assim, recomendado para extração desses agrotóxicos em farinha de trigo e farinha de mandioca. O fato de ter encontrado resíduos de agrotóxicos acima do LMR torna-se necessário o estudo de degradação e subprodutos em alimentos armazenados e processados e cada vez mais desenvolver métodos capazes de detectá-los independentemente da matriz.

A continuidade dos estudos de validação das técnicas hífenadas SLE/LPT e DLLME, para determinação dos agrotóxicos pirimifós-metílico, clorpirifós, tebuconazol, bifentrina, permetrina, cipermetrina e esfenvalerato é de suma importância devido ao fator de enriquecimento do método, podendo determinar possíveis resíduos de agrotóxicos em pequenas concentrações para amostras de farinha de mandioca.