

IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE ORGANOFOSFORADOS EM LEITE POR CROMATOGRAFIA A GÁS COM DETECTOR FOTOMÉTRICO DE CHAMA

Lucia Helena Pinto Bastos*, Adherlene Vieira Gouvêa, Fabíola Málaga, Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso, Silvana do Couto Jacob e Armi Wanderley da Nóbrega

Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, 21045-900 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Recebido em 23/9/11; aceito em 14/2/12; publicado na web em 30/4/12

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR ANALYSIS OF ORGANOPHOSPHATE RESIDUES IN MILK USING GAS CHROMATOGRAPHY WITH FLAME PHOTOMETRIC DETECTION. This paper regards the implementation of the QuEChERS method for the analysis by GC-FPD of 53 different pesticides from the organophosphate class, in whole UHT and pasteurized milk. Selectivity, linearity, repeatability, recovery and limits of detection and quantification were evaluated. Of all pesticide recoveries, 51 were considered satisfactory since the values ranged from 70 to 120% with RSD < 20%. The quantification limits ranged from 0.005 to 0.4 mg kg⁻¹. The QuEChERS method was suitable for determination of 52 pesticides, presenting several advantages – quick, cheap, easy, effective, rugged and safe - with regard to other traditional methodologies.

Keywords: pesticides; milk; QuEChERS.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores países em relação à utilização de agrotóxicos. Em 2009, cerca de 720.000 t de produtos comerciais formulados foram vendidos, correspondendo a 330.000 t de ingredientes ativos.¹ O estudo da classe dos organofosforados tem grande importância, devido ao seu uso intensivo e sua alta toxicidade.²

Os agrotóxicos são usados como a principal estratégia no combate e prevenção de pragas agrícolas e no aumento da produção de alimentos. Contudo, resíduos e traços desses princípios ativos e de seus produtos de degradação podem ficar nos alimentos e precisam ser monitorados para avaliação da ingestão do agente químico residual.³

O leite tem grande consumo nacional e pode conter resíduos de agrotóxicos provenientes de diferentes fontes, como contaminação de pastos, rações e cereais; contaminação do meio ambiente; uso de domissanitários nos currais e estabelecimentos de produção leiteira e, emprego de produtos veterinários no gado leiteiro.⁴

Neste trabalho foi avaliada a implementação de método analítico para determinação na matriz leite de resíduos de 49 agrotóxicos e 4 produtos de degradação da classe dos organofosforados. Dentre os organofosforados avaliados, 75% são permitidos para utilização na agricultura de cereais e hortifrutigranjeiros, aproximadamente 15% estão presentes em medicamentos veterinários e cerca de 20% possuem o seu uso permitido como domissanitário.⁵

Apesar de 15% dos organofosforados estudados não possuem uso permitido no Brasil, foram incluídos na validação do método por necessidades nacionais de avaliação das boas práticas agrícolas. Os agrotóxicos clorfenfós, clorpirifós, diazinona, diclorvós, etiona e fenitrotiona são utilizados em medicamentos veterinários para o combate a ectoparasitas e, exceto o diclorvós, são também utilizados em hortifrutigranjeiros, cereais e domissanitários, representando quatro possíveis meios de deixarem seus resíduos no leite.^{4,6}

A complexidade da composição dos alimentos acarreta dificuldades para a quantificação dos agrotóxicos, sendo necessária uma etapa de limpeza do extrato (*clean up*) para reduzir as interferências após

a extração com solvente. Estas dificuldades foram minimizadas após o desenvolvimento de métodos multirresíduos, que possibilitaram a análise de um grande número de substâncias com altos percentuais de recuperação (exatidão) dos analitos e a remoção dos possíveis interferentes da amostra; apresentaram boa precisão e robustez e reduziram o trabalho técnico e o uso de solventes.^{7,8}

Tendo em vista que a legislação brasileira permite o uso de mais de 200 ingredientes ativos, na agricultura e como domissanitários, a utilização de métodos multirresíduos é importante para agilizar o trabalho analítico e, assim, responder às demandas de saúde pública.³

Foi introduzido um novo método⁹ de preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos, que recebeu o nome fantasia de QuEChERS. Esse método busca refletir as suas maiores vantagens (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*), isto é, rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. As etapas envolvidas no método são extração com acetonitrila seguida de partição, promovida pela adição de sais (sulfato de magnésio-MgSO₄), cloreto de sódio (NaCl) e/ou acetato de sódio (Na(C₂H₃O₂)) e limpeza da amostra com sorventes, como C₁₈, alumina, PSA (*primary secondary amine*) e carbono grafitado (para uso em amostras com clorofila).

A utilização do solvente acetonitrila permite a extração de uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades e, quando acidificada, favorece a extração de substâncias que apresentam problemas de estabilidade em meio básico. O uso da acetonitrila, contudo, não é adequado para análises em cromatografia a gás no modo *splitless*, devido a sua grande expansão de volume durante a vaporização, o que pode vir a interferir nos detectores seletivos e favorecer a degradação de alguns agrotóxicos.¹⁰ Em função disto, neste estudo, após o processo de extração com acetonitrila, na etapa final o extrato orgânico foi seco e o solvente substituído por acetato de etila, mais adequado à cromatografia a gás com detecção por fotometria de chama (CG-DFC).

A utilização do sal secante sulfato de magnésio tem como objetivo a remoção de água e o favorecimento da recuperação dos agrotóxicos polares. Em contrapartida, a hidratação do sulfato de magnésio gera uma reação exotérmica que aquece a amostra a temperaturas de 40 a 45 °C na etapa de extração/partição, favorecendo a recuperação dos agrotóxicos apolares.¹¹

*e-mail: lucia.bastos@incqs.fiocruz.br

O método QuEChERS introduziu uma nova denominação ao procedimento de limpeza da amostra, chamada de extração em fase sólida dispersiva (D-SPE) no qual, diferentemente do procedimento de limpeza tradicional (SPE) que utiliza cartuchos ou colunas, os sorventes são adicionados diretamente ao extrato orgânico e permitem que a limpeza da amostra e a redução da água residual sejam realizadas concomitantemente.⁹ O método mostrou-se adequado também para amostras com baixos teores de gordura (< 2% de gordura) com o leite¹² Ultra-alta temperatura (UAT).

O objetivo do trabalho foi a implementação de método de extração dispersiva QuEChERS em leite integral UAT em embalagem Tetra Pak e pasteurizado em embalagem plástica, para determinação de resíduos de agrotóxicos da classe dos organofosforados. Foram avaliados 49 agrotóxicos da classe dos organofosforados e 4 produtos de degradação, totalizando 53 substâncias.

PARTE EXPERIMENTAL

Amostras branco do leite (matriz)

Duas amostras de leite integral provenientes do estado de Minas Gerais – uma em embalagem Tetra Pak (UAT) e outra em embalagem plástica (leite pasteurizado tipo A) – foram analisadas na etapa de implementação do método. Como nos respectivos rótulos constava a informação de que ambas eram de procedência orgânica, foi feita uma análise prévia para confirmar a ausência dos agrotóxicos em estudo.

Padrões e reagentes

A maioria dos padrões de agrotóxicos certificados, da classe dos organofosforados, possuía grau de pureza superior a 95% (Dr. Ehrenstorfer – Augsburg, Alemanha), exceto os agrotóxicos tiometona (48%), profenofós (92%), mevinfós (91%), etoprofós (93%), terbufós (93%), etrinfos (60%), fosfamidona (92,5%), formotiona (92%), fenamifós (92,5%) e triazofós (78%).

Foram utilizados acetonitrila, iso-octano e acetato de etila, solventes orgânicos de alta pureza e grau cromatográfico (Merck e Tedia); MgSO₄ PA (Merck); sorvente Bondesil-PSA 40 µm (Varian); C₁₈ 35-75 µm (Alltech); Al₂O₃, 90, neutro70-230 # ASTM (Merck), previamente muflado a 550 °C por 3 h e Na(C₂H₃O₂) anidro (Spectrum), seco a 220 °C por 3 h antes do uso.

Soluções estoque

Foram preparadas 53 soluções estoque (SE) dos agrotóxicos e/ou derivados a serem avaliados em solvente acetato de etila na concentração nominal de 100 µg mL⁻¹.

Soluções intermediárias

A partir das SE, foram preparadas duas soluções distintas (S1 e S2) intermediárias de trabalho. A escolha dos agrotóxicos de cada solução foi feita em função do tempo de retenção de cada substância, de modo que não houvesse duas com o mesmo tempo de retenção em min (t_R min), possibilitando, dessa forma, uma separação inequívoca de todos os organofosforados avaliados. Quando na determinação analítica em uma amostra desconhecida ocorrer a presença de agrotóxicos com o mesmo t_R min, a identidade do analito deverá ser confirmada pelo emprego de, pelo menos, um dos seguintes procedimentos:¹³ outra coluna com fase estacionária de polaridade diferente; outro detector ou espectrometria de massas com identificação pela biblioteca de espectros dos agrotóxicos.

A S1 foi composta dos seguintes agrotóxicos e de produtos de degradação, ordenados em ordem crescente de t_R min entre parênteses: nalede (3,694), metamidofós (4,322), acefato (7,287), demetom-S-metilico (10,228), ometoato (11,482), tiometona (12,403), diazinona (13,291), dissulfotom (14,770), isazofós (17,123), clorpirifós-metil (19,805), parationa-metilica (21,560), pirimifós-metilico (22,053), paraoxon etílico (22,440), fenitrotiona (24,385), parationa-etílica (24,945), bromofós-metilico (29,762), bromofós-etílico (29,762), protiofós (33,690), profenofós (37,002), dissulfotom-S-sulfurona (40,815), etiona (40,950), metidationa (44,849), carbofenotona (48,435), fosalona (66,500), pirazofós (69,337) e azinfós-Etílico (72,718). O paraoxon-etílico e a dissulfotom-S-sulfurona são produtos de degradação da parationa-etílica e dissulfotom, respectivamente.

A S2 foi composta dos seguintes agrotóxicos e de dois produtos de degradação, também ordenados em ordem crescente de t_R min: diclorvós (3,699), mevinfós (5,710), etoprofós (9,105), forato (11,315), terbufós (12,411), tebufpirinfós (12,571), monocrotofós (14,589), etrinfos (15,241), dimetoato (16,403), paraoxon-metilico (20,634), fosfamidona (21,813), formotiona (22,180), malaaxon (23,509), clorpirifós (24,646), malationa (25,545), pirimifós-etílico (27,276), fentiona (27,803), clorfenvinfós (30,705), tetraclorvinfós (35,711), iodofenfós (37,429), fenamifós (38,004), vamidotona (41,968), sulprofós (47,676), triazofós (55,106), piridafentona (63,645), fosmete (66,536), azinfós-metilico (71,084). O paraoxon-metilico e o malaaxon são produtos de degradação da parationa-metilica e malationa, respectivamente.

As Figuras 1 e 2 apresentam os cromatogramas das S1 e S2 dos agrotóxicos estudados na matriz leite.

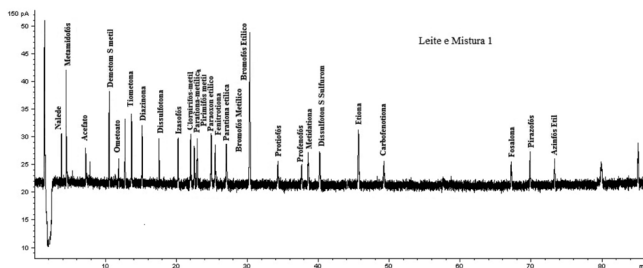


Figura 1. Cromatograma com os organofosforados estudados na S1 em matriz leite na concentração nominal de 0,01 µg mL⁻¹

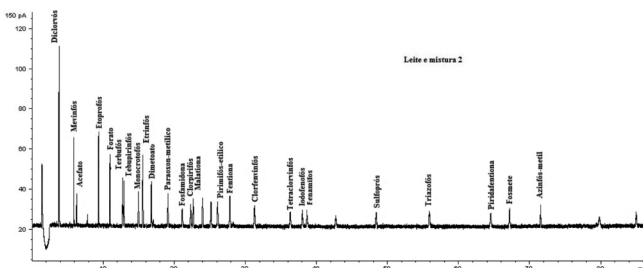


Figura 2. Cromatograma com os organofosforados estudados na S2 em matriz leite na concentração nominal de 0,01 µg mL⁻¹

As S1 e S2 foram utilizadas para preparo das curvas analíticas em acetato de etila, no extrato de leite orgânico branco e na fortificação do leite branco no estudo da taxa de recuperação.

Soluções intermediárias utilizadas na qualidade assegurada

Para garantir o controle individual do processo analítico e a validade dos resultados, foram utilizadas duas soluções intermediárias (QA1 e QA2): clorpirifós-metil, na concentração nominal de 0,3 µg mL⁻¹ em solvente acetato de etila (QA1), foi escolhido por

representar adequadamente as características físicas e químicas da classe dos organofosforados¹⁴

Os resultados analíticos da amostra são considerados válidos se a recuperação do clorpirifós-metil estiver entre 70 e 120%. Caso contrário, deve-se verificar todo o procedimento realizado e, se necessário, repetir o processo de extração e limpeza da amostra.¹³

Para o controle do equipamento, a parationa-metflica, na concentração nominal de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em acetato de etila (QA2), foi inserida no início de cada sequência de injeção, com o objetivo de monitorar o sistema cromatográfico no momento da análise das amostras.

O critério de avaliação adotado foi o CV de 10% para a área obtida no QA2. Contudo, um novo CV poderá ser determinado com base em uma série histórica de sucessivas avaliações.

Condições cromatográficas

Equipamento: cromatógrafo a gás HP 7890 (Agilent), equipado com detector por fotometria de chama (CG-DFC) em modo fósforo (P); sistema de injeção automático e estação de trabalho - *ChemStation*. Temperaturas do injetor e detector de 230 e 250 °C, respectivamente. Coluna 50% fenil-metil siloxano (DB-17MS) com 30 m de comprimento; 0,25 mm de d.i. e 0,25 μm de espessura de filme. Programação de temperatura do forno de 100 °C (0 min), 25 °C/min a 170 °C (1 min), 1 °C/min a 180 °C (1 min), 1 °C/min até 230 °C (0 min), 5 °C/min até 260 °C (5 min), 20 °C/min até 280 °C (10 min). Fluxo de gás carreador (hélio) = $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, fluxo da purga do septo = $3,0 \text{ mL min}^{-1}$, fluxo total = $61,5 \text{ mL min}^{-1}$, fluxo do gás *make-up* (nitrogênio) = 60 mL min^{-1} , modo de injeção *splitless* = 1,0 min, volume injetado = $1,0 \mu\text{L}$.

O tempo total de corrida foi de 80 min e a integração foi feita pelo parâmetro da área dos picos.

Procedimento analítico multirresíduos

O método multirresíduos utilizado foi baseado em metodologia⁹ desenvolvida em 2003, denominada QuEChERS.

Extração dos agrotóxicos

Cerca de 15 g da amostra, após homogeneização por 5 min em liquidificador de copo de vidro, foram pesadas e colocadas em frasco de 50 mL para uso em centrífuga. Em seguida, foi adicionado 1 mL do QA1 (clorpirifós-metil) e homogeneizado. Após 25 min, foi iniciada a extração, com a adição de 15 mL de acetonitrila (1% ácido acético) e agitação em vortex. Foram realizadas duas etapas de limpeza da amostra com extração em fase sólida dispersiva (SPE-D): na primeira, foram adicionados MgSO_4 + 1,5 g $\text{Na}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)$ e na segunda, foram estudadas várias combinações de sorventes, listados abaixo. O diagrama das duas etapas de extração dispersiva encontra-se apresentado na Figura 3.

Critérios utilizados na avaliação do método

O primeiro critério a ser avaliado foi o da seletividade, após este se avaliou a melhor combinação de sorventes em fase estacionária para a segunda etapa da SPE-D, o efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação.

Seletividade

As amostras branco matriz de leite foram submetidas ao método de extração de organofosforados e a seletividade foi confirmada pela ausência de picos nos tempos de retenção das substâncias estudadas presentes nas S1 e S2.¹⁴

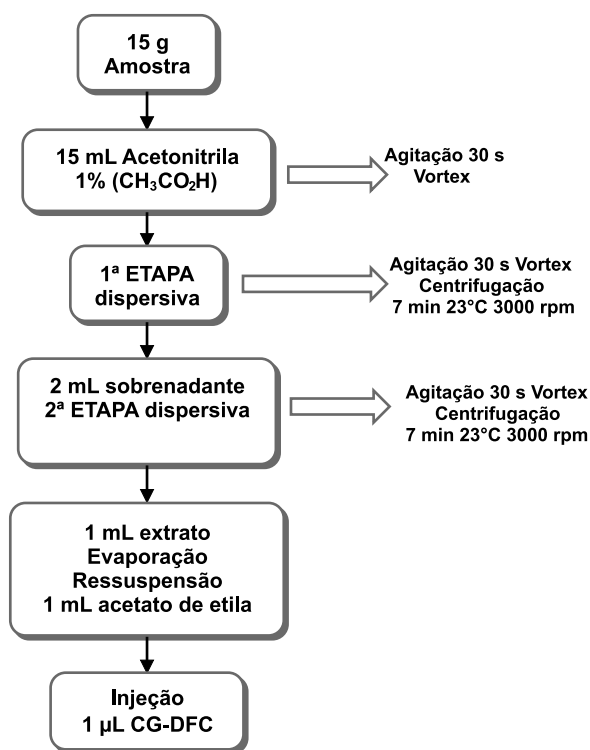


Figura 3. Diagrama do método QuEChERS empregado na validação de resíduos de organofosforados na matriz leite

Avaliação da melhor combinação de sorventes para extração em fase sólida dispersiva (SPE-D)

As amostras branco foram fortificadas, respectivamente, com concentrações que variaram de 0,050 a 0,100 mg kg^{-1} das S1 e S2, de acordo com os organofosforados estudados. Após 25 min da fortificação, que permitiu a interação entre o agrotóxico e a matriz, iniciou-se o processo de extração. Foram utilizadas seis diferentes combinações de sorventes para avaliação da melhor taxa de recuperação dos organofosforados adicionados na S1 e S2: A) 50 mg PSA + 150 mg MgSO_4 ; B) 50 mg C_{18} + 150 mg MgSO_4 ; C) 50 mg alumina + 150 mg MgSO_4 ; D) 50 mg PSA + 50 mg C_{18} + 150 mg MgSO_4 ; E) 50 mg PSA + 50 mg alumina + 150 mg MgSO_4 e F) 50 mg PSA + 50 mg C_{18} + 50 mg alumina + 150 mg MgSO_4 .

Em seguida, as recuperações dos 53 analitos presentes na S1 e S2 foram avaliadas e comparadas com a concentração real das amostras fortificadas (leite com S1 ou S2).

Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz branco do leite

A natureza da matriz (“efeito matriz”) - solventes orgânicos¹⁵ ou extrato da amostra - que contém os analitos pode aumentar ou diminuir a resposta do detector.

Para se avaliar este efeito, seguiu-se o procedimento¹⁶ que identificou a resposta cromatográfica de cada organofosforado em solvente e na matriz tomate. Utilizou-se a matriz leite integral UAT e foram analisadas as soluções S1 e S2 em cinco diferentes níveis, correspondentes às concentrações nominais de 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 e 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Estudo da linearidade da faixa de trabalho

Para o estudo da linearidade da faixa de trabalho, 1 mL do extrato

orgânico do branco de leite, colocado em frascos de vidro de 3 mL, foi seco sob a atmosfera de N_2 . Em seguida, adicionou-se 1 mL dos extratos orgânicos S1 e S2, respectivamente, nas concentrações correspondentes aos pontos da curva analítica (0,01 a 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

O volume de 1 μL de cada concentração foi injetado em triplicata no sistema CG-DFC e, para os cálculos estatísticos, utilizou-se o valor médio dos resultados obtidos.

A linearidade da faixa de trabalho foi verificada através da leitura da curva analítica, utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO).¹⁶

Limites de detecção e de quantificação do instrumento e do método

Os limites de detecção e quantificação do instrumento (LDI e LQI) e do método (LDM e LQM) foram estabelecidos com base no método da relação sinal/ruído (S/R), no qual se aceita a estimativa de 3:1 para o LD e de 10:1 para o LQ, ou seja, o ruído produzido pela resposta da injeção de concentrações conhecidas dos analitos de interesse deve ser três vezes maior do que o ruído produzido pelo sistema cromatográfico da linha de base para o LD e dez vezes para o LQ.¹⁶ Esta relação (S/R) foi calculada pela *ChemStation* do cromatógrafo HP-7890.

Para estabelecer esta relação para os valores dos LDI e LQI utilizou-se uma concentração conhecida com aproximadamente 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de todos os agrotóxicos em matriz (extrato branco da polpa de leite em acetato de etila), analisados em três replicatas genuínas ($n = 3$).

Para o cálculo de LDM e LQM, seis replicatas genuínas da amostra branco de leite foram fortificadas com a concentração de aproximadamente 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e analisadas pelo método de ensaio. Os resultados obtidos foram utilizados para estabelecer a relação (S/R). Em seguida, calcularam-se as médias, os desvios padrão dos resultados e os valores dos limites LDI, LQI, LDM e LQM.

Para confirmação dos resultados dos analitos foram preparadas seis replicatas da amostra branco do leite nas concentrações obtidas dos LQM, calculados de cada analito analisado de acordo com o método de ensaio. No caso dos analitos cujos valores S/R não foram iguais ou superiores a 3:1, as concentrações individuais foram aumentadas, o que permitiu a obtenção de valores mais próximos do LDM e LQM.

Recuperação e repetitividade

O mesmo procedimento utilizado para cálculo do LDM e do LQM foi usado para o cálculo da taxa de recuperação e repetitividade dos 53 analitos e os critérios de aceitação foram os indicados pelo *Codex Alimentarius*¹⁷ e SANCO¹³: para a faixa de concentração deste estudo ($>0,01$ e $\leq 0,1$ mg kg^{-1}), o intervalo de recuperação deve ser de 70 a 120% e os coeficientes de variação (CV) devem ser inferiores a 20%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seletividade

As duas amostras branco de leite utilizadas como matriz foram adequadas para a avaliação do método, por não terem apresentado t_r min iguais aos dos agrotóxicos em estudo.

Avaliação da melhor combinação de sorventes para utilização na segunda fase dispersiva

Dentre as seis combinações de sorventes testadas, apenas as com 50 mg PSA + 50 mg alumina + 150 mg MgSO_4 e com 50 mg PSA + 50 mg C_{18} + 50 mg alumina + 150 mg MgSO_4 demonstraram

maior uniformidade nas recuperações para o conjunto de agrotóxicos avaliados nas misturas S1 e S2, considerando a faixa estipulada pelo SANCO¹³ (70 a 120%). A combinação 50 mg PSA + 50 mg alumina + 150 mg MgSO_4 foi escolhida, para ser utilizada na segunda fase dispersiva, por apresentar um desempenho melhor para os organofosforados acefato e clorfenvinfós (99 e 81%, respectivamente), quando comparada à com 50 mg PSA + 50 mg C_{18} + 50 mg alumina + 150 mg MgSO_4 (65 e 63%), e por utilizar uma fase dispersiva a menos (C_{18}).

Em trabalho anterior,¹² o método Quechers em leite (tipo de leite não especificado) foi avaliado por CG-MS para diferentes agrotóxicos, dentre esses o acefato. Foi obtida uma recuperação para o agrotóxico estudado de 107% ($n = 3$), na concentração de 0,05 mg kg^{-1} , utilizando a fase dispersiva 50 mg PSA + 50 mg C_{18} + 150 mg MgSO_4 . Neste estudo somente foi avaliada essa combinação, não tendo sido também avaliado o agrotóxico clorfenvinfós.

Para os agrotóxicos estudados (S1 e S2), as concentrações utilizadas para fortificar a matriz e os resultados das recuperações obtidas com as seis diferentes combinações de sorventes estão descritas na Tabela 2S, material suplementar, na qual é possível verificar as melhores taxas de recuperação (70 a 120%) em um maior número de agrotóxicos avaliados. O agrotóxico diclorvós - também denominado DDVP - não apresentou recuperação adequada com nenhuma das combinações estudadas, o que pode estar relacionado a vários fatores, como a integridade do material de referência utilizado ou à extração da molécula.

Trabalho de monitoramento realizado na Espanha² mostrou a presença de resíduos de diclorvós em 5,78% das amostras avaliadas de leite cru.

Como o DDVP está presente em 39 medicamentos veterinários antiparasitários e é também um produto de degradação de 21 produtos cujo ingrediente ativo é o triclorfom (não avaliado neste método), ambos utilizados no gado leiteiro, conforme registros no MAPA,¹⁸ novos estudos deverão ser feitos para adequar um método para análise deste organofosforado.

Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz branco do leite

Em 30% de todos os agrotóxicos analisados - acefato, azinfós-etílico, demetom-S-metilico, dimetoato, fenamifós, formotiona fosfamidona, fosmete, malaixon, metamidofós, ometoato, paraoxon-metilico, profenofós, monocrotofós, piridafentona, tetraclorvinfós, triazofós e vamidotona - o efeito matriz foi significativo nos cinco níveis testados.

Em 12% - azinfós-metilico, etoprofós, nalede, protiofós, fentona, pirimifós-etílico, terbufós - não foi demonstrado efeito matriz em nenhum dos níveis avaliados (0,01; 0,02; 0,03; 0,04 e 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Nos 58% restantes, correspondentes a 28 agrotóxicos, o efeito matriz foi observado em pelo menos um nível. O detalhamento da presença do efeito matriz em diferentes níveis encontra-se representado na Tabela 1S, material suplementar.

Tendo em vista que o efeito matriz branco do leite foi significativo para a maioria dos organofosforados testados, utilizou-se curva com matriz para determinar a linearidade e faixa de trabalho.

Estudo da linearidade e faixa de trabalho

A correlação da curva analítica, representada pelo modelo matemático entre os valores numéricos de x e de y , é indicada pelo coeficiente de Pearson - 'r'. O quadrado deste coeficiente é chamado de coeficiente de determinação ou simplesmente R^2 . Os valores aceitos foram $R^2 \geq 0,95$ e $r \geq 0,98$.

Em 40 dos 53 organofosforados avaliados foi possível observar que a regressão foi significativa e não demonstrou desvio da linearidade na faixa avaliada (0,01 a 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Tabela 1. Limites de detecção (LDM) e de quantificação do método (LQM), calculados a partir da razão sinal/ruído, para os agrotóxicos referentes a S1

Agrotóxico	Conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Relação sinal/ruído	Áreas	Desvio padrão áreas	Limites do método ($\mu\text{g g}^{-1}$) (mg kg ⁻¹)	
					LDM	LQM
Acefato	0,015	3,8	36,44	11	0,014	0,051
Azinfós-etílico	0,014	3,3	44,49	4	0,004	0,012
Bromofós-etílico	0,052	11,4	189,43	10	0,008	0,030
Bromofós-metilico	0,014	3,2	46,98	3	0,003	0,010
Carbofenotiona	0,070	9,9	210,07	1	0,010	0,033
Clorpirifós-metil	0,012	3,9	51,07	2	0,001	0,005
Demetom-S-metil	0,011	6,8	50,68	2	0,001	0,005
Diazinona	0,014	6,6	62,17	3	0,002	0,003
Dissulfotona	0,011	4,8	50,56	3	0,002	0,006
Dissulfotona-S-sulfurona	0,021	3,5	67,08	3	0,003	0,009
Etiona	0,015	4,1	77,38	1	0,003	0,011
Fenitrotiona	0,011	4,0	58,66	2	0,001	0,004
Fosalona	0,067	12,2	204,32	6	0,006	0,020
Izasofós	0,010	3,7	45,38	2	0,001	0,004
Metidationa	0,017	3,2	59,12	3	0,007	0,010
Metamidofós	0,014	10,9	69,76	3	0,002	0,006
Naledo	0,010	4,9	16,94	1	0,002	0,007
Ometoato	0,075	11,4	105,32	9	0,019	0,069
Paraoxon-etílico	0,012	3,6	49,61	1	0,001	0,004
Parationa-etílica	0,010	3,1	43,92	1	0,001	0,002
Parationa-metilica	0,010	4,2	55,44	2	0,001	0,006
Pirazofós	0,014	3,6	44,25	3	0,003	0,011
Pirimifós-metilico	0,011	3,4	47,77	4	0,002	0,006
Profenofós	0,077	9,3	179,59	10	0,013	0,030
Protiofós	0,066	10,2	190,05	13	0,014	0,048
Tiometona	0,010	5,5	47,16	3	0,020	0,080

Tabela 2. Limites de detecção (LDM) e de quantificação do método (LQM), calculados a partir da razão sinal/ruído, para os agrotóxicos referentes a S2

Agrotóxico	Conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Relação sinal/ruído	Áreas	Desvio padrão áreas	Limites do método ($\mu\text{g g}^{-1}$) (mg kg ⁻¹)	
					LDM	LQM
Azinfós-metilico	0,011	3,0	28,56	2	0,008	0,010
Clorfenvinfós	0,100	13,1	233,13	13	0,016	0,053
Clorpirifós	0,010	3,9	56,27	2	0,001	0,003
Diclorvós	0,015	22,8	74,19	1	0,001	0,002
Dimetoato	0,010	5,0	57,29	3	0,002	0,006
Etoprofós	0,052	10,4	71,91	2	0,001	0,004
Etrinfós	0,011	7,7	84,55	2	0,001	0,003
Fenamifós	0,060	9,4	199,21	13	0,012	0,040
Fentiona	0,011	3,6	57,01	3	0,002	0,006
Forato	0,013	8,0	62,92	1	0,001	0,003
Formotiona	0,010	3,4	47,50	2	0,001	0,004
Fosmete	0,071	11,0	189,31	9	0,011	0,037
Fosfamidom	0,072	10,9	157,58	3	0,004	0,013
Iodofenofós	0,663	8,2	162,17	10	0,129	0,430
Malaixon	0,020	3,02	38,13	3	0,005	0,017
Malationa	0,011	3,1	46,74	2	0,002	0,006
Mevinfós	0,012	9,5	41,78	2	0,001	0,005
Terbufós	0,012	6,0	55,69	4	0,002	0,008
Tebupirifós	0,011	5,0	46,26	2	0,002	0,005
Monocrotofós	0,013	3,6	39,77	4	0,004	0,006
Paraoxon-metilico	0,010	3,8	47,39	2	0,002	0,006
Piridafentiona	0,072	9,6	217,95	11	0,011	0,040
Pirimifós-etílico	0,010	3,0	47,25	4	0,003	0,008
Sulprofós	0,069	9,7	208,16	11	0,011	0,039
Tetraclorvinfós	0,068	8,8	172,06	9	0,010	0,072
Triazofós	0,066	10,8	234,27	11	0,009	0,029
Vamidotiona	0,087	4,7	99,19	5	0,013	0,042

Tabela 3. Valores de recuperação (%), desvio padrão e coeficiente de variação (CV, %) calculados para as seis replicatas genuínas (representadas de 1 a 6) na concentração (conc.) variando de 0,01 a 0,10 mg kg⁻¹, para as S1 e S2

Agrotóxico	Conc. (mg kg ⁻¹)	1	2	3	4	5	6	Média	Desvio padrão	CV %
Acefato	0,070	108	98	107	94	110	134	109	13	12
Azinfós-etílico	0,070	98	108	110	101	98	102	103	5	5
Bromofós-etílico	0,070	97	96	94	91	91	94	94	2	2
Bromofós-metílico	0,018	98	108	110	101	98	102	103	5	5
Carbofenotiona	0,070	101	99	103	101	99	113	103	5	5
Clorfenvinfós	0,100	107	111	110	101	104	115	108	5	4
Clorpirifós	0,014	90	77	78	86	78	83	82	5	6
Clorpirifós-metílico	0,016	104	101	106	101	106	110	105	3	3
Demeton-S-metílico	0,014	107	97	103	94	93	95	98	5	5
Diazinona	0,019	99	98	97	95	95	97	97	1	2
Diclorvós*	0,019	48	47	47	46	41	46	46	2	5
Diclorvós*	0,097	42	42	46	56	43	59	48	7	14
Dimetoato	0,014	112	103	95	100	97	93	100	6	6
Dissulfotona	0,014	90	91	91	89	90	89	90	1	1
Dissulfoton-S-Sulforom	0,100	104	103	115	109	104	123	110	7	7
Etiona	0,020	95	95	93	86	93	92	92	3	3
Etoprofós	0,018	104	87	94	93	93	89	93	5	6
Etrinfos	0,014	105	94	92	95	94	90	95	5	5
Fenamifós	0,100	106	122	115	105	115	127	115	8	7
Fenitrotona	0,015	104	100	100	100	104	101	102	2	2
Fentiona	0,015	100	84	87	81	91	84	88	6	7
Formotiona	0,013	78	66	79	73	69	66	72	5	7
Forato	0,018	95	85	81	79	78	76	82	6	8
Fosalona	0,010	88	92	86	79	77	79	84	6	7
Fosfamidom	0,060	108	111	111	100	104	111	108	4	4
Iodofenfós	0,070	99	103	97	92	87	94	95	5	5
Izasofós	0,013	112	106	109	103	109	106	108	3	3
Malaaxon	0,020	96	95	88	89	94	99	94	3	9
Malationa	0,015	109	89	91	98	96	83	94	8	9
Metamidofós	0,018	83	80	97	80	85	88	86	6	7
Metidationa	0,080	108	100	114	106	107	122	110	7	6
Mevinfós	0,016	98	83	84	87	81	78	85	6	7
Monocrotofós	0,018	102	98	100	91	87	86	94	6	7
Naleda	0,013	86	81	89	79	69	70	79	7	9
Ometoato	0,070	107	101	104	102	111	132	110	11	10
Paraoxon-etil	0,015	121	108	108	98	110	106	109	7	6
Paraoxon-metil	0,016	94	95	87	90	86	92	91	3	4
Parationa-etílica	0,014	102	85	96	88	85	88	91	6	7
Parationa-metílica	0,013	111	104	103	101	96	108	104	5	5
Pirazofós	0,070	97	100	108	104	104	119	105	7	7
Piridafentiona	0,070	107	118	116	104	111	119	113	6	5
Pirimifós-etílico	0,070	99	104	98	91	98	106	99	5	5
Pirimifós-metílico	0,010	111	99	102	95	97	97	100	5	5
Protiofós	0,060	93	89	98	97	94	104	96	5	5
Profenofós	0,070	92	103	115	108	104	117	107	8	8
Sulprofós	0,070	95	106	99	97	93	99	98	4	4
Terbufós	0,016	98	83	82	84	84	81	85	6	7
Tebupirinfós	0,015	99	78	80	83	80	83	84	7	8
Tetraclorvinfós	0,070	107	113	111	96	104	105	106	5	5
Tiometona	0,013	94	92	100	91	94	95	94	3	3
Triazofós	0,070	109	120	111	99	105	118	110	7	7
Vamidotiona	0,070	111	126	115	111	121	121	118	6	5

*Recuperações fora da faixa do SANCO.

Para os agrotóxicos diclorvós, etrinfos, forato, mevinfós, nalede e terbufós a faixa de ajuste linear somente foi obtida para um intervalo menor (0,02 a 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$), pois esses agrotóxicos não apresentaram uma boa sensibilidade no primeiro ponto da curva (0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Na Tabela 3S, material suplementar, estão representadas as equações da reta de regressão empregada para verificação da significância da regressão, do desvio da linearidade e da avaliação da homogeneidade da variância dos resíduos da regressão da curva analítica da matriz branco do leite, para os 49 agrotóxicos estudados e os 4 produtos de degradação. Na mesma tabela também consta o teste estatístico utilizado para avaliar a variância dos resíduos provenientes do ajuste da curva analítica e está demonstrado que todos os agrotóxicos testados apresentaram comportamento homoscedástico ($C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabelado}}$).

Todos os agrotóxicos avaliados apresentaram o valor de R^2 dentro da faixa aceitável ($R^2 \geq 0,95$ e $r \geq 0,98$).

Limites de detecção e de quantificação do método

Os valores de LDM e LQM, obtidos por S/R, encontram-se nas Tabelas 1 e 2. Os agrotóxicos de S1 (acefato, azinfós-etílico, carbofenotona, dissulfotom-S-sulfurom, fosalona, metidationa, ometoato, pirazofós, profenofós e protiofós) e os de S2 (fosfamidona, malaixon, pirimifós-etílico, clorfenvinfós, tetraclorvinfós, iodofenfós, fenamifós, vamidotona, sulprofós, triazofós, piridafentona, fosmete, sulprofós, triazofós, piridafentona e fosmete) não apresentaram S/R na proporção 3:1 na concentração de 0,01 mg kg^{-1} . Por esta razão, aumentou-se a concentração desses agrotóxicos, de modo a se obter S/R 3:1. As etapas de recuperação e repetitividade foram também avaliadas com esta mesma concentração.

Valores de LQM na faixa de 0,002 a 0,009 mg kg^{-1} foram obtidos para a maioria dos agrotóxicos avaliados (cerca de 57%) para a faixa de 0,01 a 0,09 mg kg^{-1} (cerca de 44%). O agrotóxico iodofenfós apresentou LQM de 0,430 mg kg^{-1} , valor muito acima do LQM adequado a uma análise de resíduos, fato que deve estar relacionado à baixa seletividade do detector FPD, no modo fósforo (P), ao agrotóxico que possui somente um P em sua molécula. Novas avaliações poderão ser feitas para a substância no mesmo sistema de detecção (FPD) no modo enxofre (S), pois o agrotóxico possui dois S em sua molécula.

O iodofenfós tem uso permitido em produtos domissanitários, não sendo indicado para uso em currais e/ou instalações leiteiras.

Considerando que alguns agrotóxicos (Tabela 1) apresentaram valores de LQM inferiores ao menor ponto da curva analítica, adotou-se o valor de 0,01 mg kg^{-1} como LQM, para todos os analitos avaliados na determinação rotineira desta matriz.

Recuperação e repetitividade

Os resultados da recuperação e da repetitividade das seis replicatas dos agrotóxicos presentes nas S1 e S2 nas concentrações 0,01 e 0,10 mg kg^{-1} encontram-se na Tabela 3. Os valores de recuperação referentes à média das replicatas foram adequados para todos os agrotóxicos avaliados (faixa 70 a 120%), exceto para o diclorvós. Ainda para o diclorvós foi testada a concentração de 0,097 mg kg^{-1} ; nesta concentração os valores de recuperação também não se mostraram adequados.

Com essa avaliação foi possível demonstrar que os LQM obtidos para os organofosforados são adequados, pois os valores dos desvios padrão e os coeficientes de variação obtidos, na recuperação e repetitividade, foram compatíveis com os parâmetros da SANCO.¹³

CONCLUSÃO

O método QuEChERS mostrou-se eficiente para 52 agrotóxicos

e/ou derivados dentre os 53 avaliados nas matrizes leite integral e pasteurizado. Os LQM obtidos mostraram-se capazes de atender às especificações do MAPA¹⁹ no que se refere aos LMRs. Como não foram obtidos resultados satisfatórios para o diclorvós e, tendo em vista ser um agrotóxico muito utilizado em medicina veterinária e que seus resíduos podem contaminar o leite consumido pela população, estudos deverão ser feitos para a implantação de um método analítico adequado à sua análise.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Está disponível em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre. A Tabela 1S apresenta o efeito matriz identificado na matriz leite por organofosforados para os 5 níveis de concentração estudados. A Tabela 2S apresenta resultados de recuperação (%) obtidos no leite em 6 diferentes combinações de sorventes, para os organofosforados estudados. A Tabela 3S apresenta a representação da equação da reta e regressão, coeficientes de determinação para as faixas de trabalho estudadas e avaliação da homogeneidade da variância dos resíduos da regressão da curva analítica no extrato orgânico em leite para os agrotóxicos estudados.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e à Fundação de Estudos e Projetos do Ministério da Ciência e Tecnologia (FINEP).

REFERÊNCIAS

1. Sampaio, I. A.; comunicação pessoal.
2. Melgar, M. J.; Santaefemia, M.; Garcia, A. M. J.; *J. Environ. Sci. Health, Part B* **2010**, *45*, 595.
3. Jardim, A. N. O.; Caldas, E. D.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1898.
4. Kan, A. C.; *R. Bras. Zootec.* **2009**, *38*, 423.
5. Bastos, L. H. P.; Cardoso, M. H. W. M.; Nóbrega, A. W.; Jacob, S. C.; *Cad. Saúde Colet.* **2011**, *19*, 51.
6. <http://www.anvisa.gov.br>, acessada em Abril 2012.
7. Prestes, D. O.; Adaime, M. B.; Zanella, R.; *Scientia Chromatographica* **2011**, *3*, 51.
8. Prestes, D. O.; Friggi, C. A. ; Adaime, M. B.; Zanella, R.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1620.
9. Anastasiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. J.; *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412.
10. Lehotay, S. J.; Mástovská, K.; Ligfield, R.; *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 615.
11. Jeong, I-S.; Kwak, B-M.; Jeong, S-H.; *Food Chem.* **2012**, *133*, 473.
12. Lehotay, S. J.; Mástovská, K.; *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 630.
13. European Community; *Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*, Document N° SANCO/ 2009/10684, Sweden, 2009.
14. United States Department of Agriculture; *Chemical Compounds, PDP Commodity Grouping, Method Validation and Quality Control SOP No PDP- QC. 2010*, Rev 01, Washington, 2010.
15. Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R.; *Pure Appl. Chem.* **2006**, *78*, 145.
16. Cardoso, M. H. W.; Gouvêa, A. V.; Nóbrega, A. W.; Abrantes, S. M. P.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2010**, *30*, 63.
17. Codex Alimentarius Commission; *Pesticide residues in food: methods of analysis and sampling*, 2nd ed., 2000, vol. 2A, part 1, Rome.
18. <http://www.sindan.org.br>, acessada em Abril 2012.
19. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Instrução Normativa n° 24, *Diário Oficial da União*, 11 de agosto de 2011, n° 154.