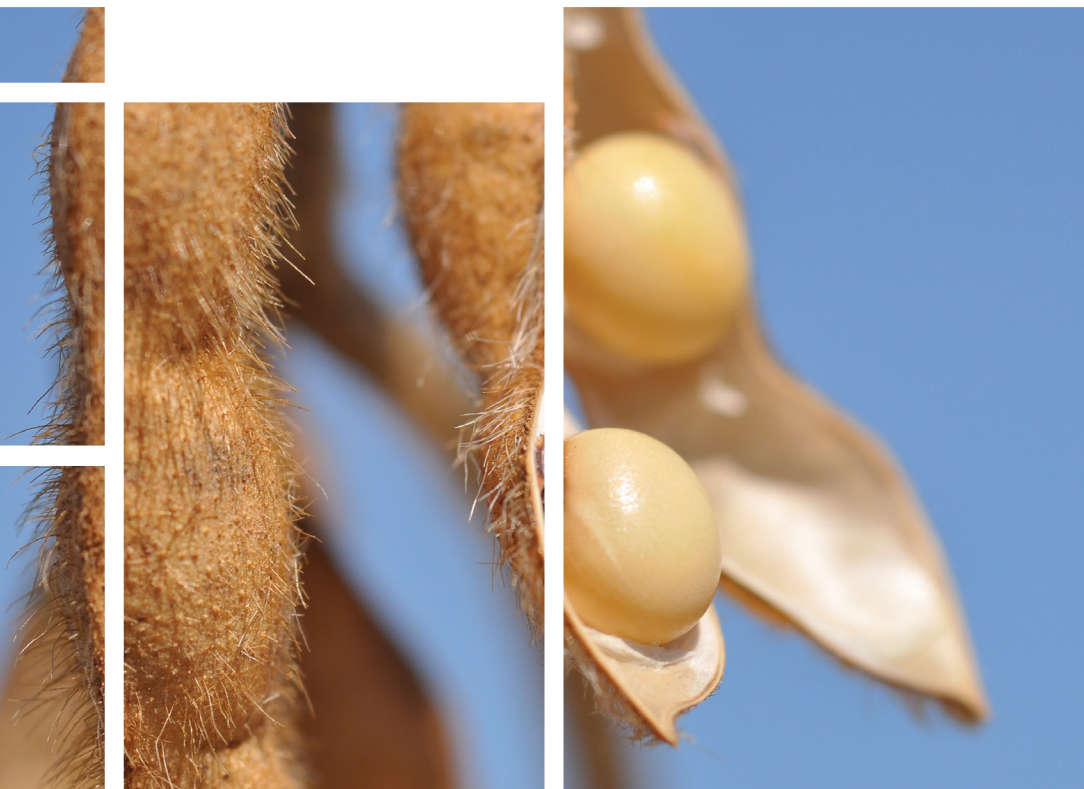


Validação de um método para determinação de resíduos de fungicidas em grãos de soja



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio Ambiente
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
73**

Validação de um método para determinação
de resíduos de fungicidas em grãos de soja

*Sonia Cláudia do Nascimento de Queiroz
Debora Renata Cassoli de Souza Dutra
Antonio Luiz Cerdeira
Lourival Costa Paraíba*

**Embrapa Meio Ambiente
Jagariúna, SP
2017**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio Ambiente
Rodovia SP-340, Km 127,5, Tanquinho Velho
Caixa Postal 69, CEP: 13820-000, Jaguariúna, SP
Fone: +55 (19) 3311-2610
Fax: +55 (19) 3311-2640
www.embrapa.br/meio-ambiente/
SAC: www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Meio Ambiente

Presidente
Ana Paula Contador Packer

Secretária-Executiva
Cristina Tiemi Shoyama

Membros
*Rodrigo Mendes, Joel Leandro de Queiroga,
Marco Antonio Ferreira Gomes, Maria Cristina
Tordin, Nilce Chaves Gattaz, Ricardo Antonio
Almeida Pazianotto, Vera Lucia Ferracini, Victor
Paulo Marques Simão*

Revisão de texto
Nilce Chaves Gattaz

Normalização bibliográfica
Victor Paulo Marques Simão

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Silvana Teixeira / Gabriel Pupo Nogueira

Foto da capa
Fabiano Bastos / Embrapa

1ª edição eletrônica (2017)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Meio Ambiente

Validação de um método para determinação de resíduos de fungicidas
em grãos de soja / por Sonia Claudia do nascimento de Queiroz ... [et al.].
– Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2017.

19 p. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Meio Ambiente, ISSN 1516-4675; 73).

1. Fungicida. 2. Resíduo químico. 3. Soja. 4. Análise química. 5. Cromatografia gasosa.
6. Espectroscopia de massas. I. Queiroz, Sonia Claudia do Nascimento. II. Título. II. Série.

CDD 543.085 8

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	12
Conclusões.....	17
Agradecimento	17
Referências	17

Validação de um método para determinação de resíduos de fungicidas em grãos de soja

Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz¹

Debora Renata Cassoli de Souza Dutra²

Antonio Luiz Cerdeira³

Lourival Costa Paraiba⁴

Resumo – O cultivo de soja utiliza diversos tipos de fungicidas para controlar fungos fitopatogênicos, que, dependendo das características físico-químicas das moléculas, podem se acumular nos grãos e causar riscos à saúde humana. Desse modo, para verificar a presença de resíduos destas substâncias nesta matriz alimentar há necessidade de desenvolver e validar métodos analíticos que sejam sensíveis e confiáveis. Assim, o objetivo deste trabalho foi adaptar e validar um método para a determinação dos fungicidas não-iônicos ciproconazol, epoxiconazol, piraclostrobina e azoxistrobina em grãos de soja, para ser aplicado na validação de um modelo matemático cinético de bioconcentração, a fim de prever o acúmulo desses agrotóxicos nesse alimento. O método analítico baseou-se na abordagem QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) - acetato para o preparo de amostra e para a quantificação e confirmação da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS/MS). Os parâmetros de validação avaliados foram: linearidade $\geq 0,99$, exatidão (em termos % de recuperação) de 70-120 % e precisão ≤ 20 % (em termos de repetitividade na forma de coeficiente de variação-CV%), limites de quantificação (LQ) iguais a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para ciproconazol, $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para epoxiconazol e azoxistrobina, e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para piraclostrobina. Portanto, o método foi adequado para o uso pretendido.

Termos para indexação: fungicida, resíduo químico, soja, análise química, cromatografia gasosa, espectroscopia de massas.

¹ química, doutora em Química Analítica, pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP

² química, doutora em Química, analista da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

³ engenheiro-agrônomo, doutor em Bioquímica, pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

⁴ matemático, doutor em Matemática Aplicada, pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

Validation of a method for determination of fungicide residues in soy grains

Abstract – Phytopathogenic diseases in soybean are controlled with several types of fungicides, which, depending on the physico-chemical characteristics of the molecules, they can accumulate in grains and cause risks to human health. Thus, to verify the presence of residues of these substances there is a need to develop and validate analytical methods that are sensitive and reliable. The objective of this study was to adapt and validate a method for the determination of non-ionic fungicides such as cyproconazole, epoxiconazole, pyraclostrobin and azoxystrobin in soybeans, to be used to validate a model of kinetic bioconcentration in order to predict the accumulation of the pesticides in this food. The analytical method was based on QuEChERS approach (English Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)-acetate for sample preparation, quantification and confirmation with gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS/MS). The validation parameters evaluated were: linearity ≥ 0.99 , accuracy (in terms of % recovery) of 70-120% and precision $< 20\%$ (in terms of repeatability as coefficient of variation), quantification limits (QL) equal to $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ for cyproconazole, $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ for epoxiconazole and azoxystrobin and $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ for pyraclostrobin. Thus, the method was suitable for the intended use.

Index terms: fungicide, chemical residue, soybean, chemical analysis, gas chromatography, mass spectroscopy.

Introdução

O Brasil ocupa um lugar de destaque mundial na produção de grãos de soja (*Glycine max* L.). Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab, 2017), safra 2016/2017, o Brasil é o segundo produtor mundial de grãos de soja e junto com Estados Unidos e Argentina são responsáveis por 81,12% da produção mundial. Durante o plantio, agrotóxicos são utilizados no cultivo e também na pós-colheita para proteger as plantas de doenças e garantir tanto a qualidade quanto a produtividade da safra. Com o uso intensivo, resíduos destas substâncias podem permanecer na planta e no ambiente. Estudos envolvendo a quantificação de resíduos de agrotóxicos são de extrema importância devido à toxicidade destes resíduos aos organismos vivos.

Uma das classes de agrotóxicos mais utilizadas em soja é de fungicidas e segundo o banco de informação sobre os agrotóxicos e afins registrado no Ministério da Agricultura - AGROFIT (Brasil, 2018) são permitidos o uso de 30 fungicidas na cultura da soja. Sabe-se que dependendo das características físico-químicas destas moléculas pode haver acúmulo nos grãos, comprometendo a segurança no consumo deste alimento. A absorção dos princípios ativos pela planta é o primeiro passo para este acúmulo, os quais podem entrar via raiz ou via foliar (Queiroz et al., 2003).

As metodologias utilizadas para quantificar resíduos de agrotóxicos envolvem as etapas de extração, limpeza para remoção dos interferentes (*clean-up*) e concentração dos analitos de interesse. Após a obtenção dos extratos utilizam-se, geralmente, técnicas cromatográficas para quantificar e confirmar a presença dos analitos. Análises de compostos voláteis e estáveis termicamente são realizadas por cromatografia gasosa, enquanto que análises de compostos polares e que não volatilizam, por cromatografia líquida.

Análises multi-resíduos de agrotóxicos em alimentos baseadas no QuEChERS (do inglês - Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe) para preparo de amostras foram publicadas, primeiramente, por Anastassiades et al. (2003). Nesta abordagem original, na primeira etapa é realizada uma extração com uso do solvente acetonitrila, partição com o uso de sais (ex. sulfato de magnésio, MgSO₄ e cloreto de sódio, NaCl) e uma etapa de *clean-*

up com o uso de extração em fase sólida dispersiva (Dispersive Solid Phase Extraction, D-SPE). A extração com acetonitrila permite menor presença de compostos lipofílicos, geralmente co-extraídos, provenientes da amostra.

Após a primeira publicação sobre esta metodologia, nela ocorreram várias modificações, tais como QuEChERS tamponado, citrato e acetato (Lehotay et al., 2010). Ainda segundo Lehotay et al. (2010), a versão acetato da abordagem QuEChERS mostrou vantagens quando comparada com outros estudos testados, pois melhorou as porcentagens de recuperação (70-120 %), principalmente para compostos dependentes do pH, independentemente da matriz utilizada (Prestes et al., 2011).

Na literatura são encontradas metodologias para determinação de resíduos de pesticidas em matriz de soja, como o uso de extração com acetona: diclorometano: éter de petróleo – método mini-Luke modificado (Pizzutti et al., 2007), sem etapa de *clean-up*. No entanto, essa metodologia utiliza maiores quantidades de solvente quando comparada com o QuEChERS. Em trabalho um pouco mais recente, os mesmos autores (Pizzutti et al., 2009) compararam a metodologia de extração mini-Luke modificada com a metodologia de extração que utiliza acetonitrila com 1 % de ácido acético, sulfato de magnésio e acetato de sódio. Ambos os métodos utilizados não tiveram a etapa de *clean-up* e, segundo os autores, foram rápidos, eficientes e robustos, podendo ser aplicados em análises de rotina.

As técnicas que envolvem cromatografia acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS e GC-MS/MS) utilizadas para a detecção, confirmação e quantificação dos resíduos dos agrotóxicos têm sido as de escolha pelos especialistas em química analítica, uma vez que estes tipos de analisadores são sensíveis e seletivos, e ideais para análises em níveis de $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ou ng Kg^{-1} . Para comprovar a confiabilidade de uma metodologia analítica, esta deve ser validada conforme guias e/ou documentos orientadores nacionais e/ou internacionais, tais como o DOQ-CGCRE-008 (Inmetro, 2016) e o guia SANTE/11945 (European Commission, 2015), que estabelecem os parâmetros a serem avaliados, bem como os critérios de aceite. Segundo o documento SANTE/11945 (European Commission, 2015), adotado pela Comunidade Europeia, a soja representa o grupo de commodities com alto conteúdo de gordura e baixo teor de água. Isso exige que nos procedimentos

de limpeza de extrato (*clean-up*) os interferentes, principalmente gordura, sejam removidos totalmente ou em grande parte para evitar ou diminuir o chamado efeito matriz. Assim, o objetivo deste trabalho foi adaptar e validar um método de análise para a determinação dos resíduos dos fungicidas não-iônicos: ciproconazol, epoxiconazol, piraclostrobina e azoxistrobina em grãos de soja, para ser utilizado na análise de amostras oriundas de cultivo realizados em casa-de-vegetação, onde os resultados serão utilizados em um modelo matemático cinético de bioconcentração, a fim de prever o acúmulo de agrotóxicos em alimentos.

A seleção destes agrotóxicos baseou-se em que estes são utilizados no controle de uma das doenças que mais afetam a cultura de soja, a ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrizi*. O fator de bioconcentração (BCF) a ser calculado indica o grau de afinidade de uma substância a organismos vivos. Geralmente, este coeficiente é calculado pelo quociente entre a concentração da substância no organismo e a concentração da substância no meio. O BCF de uma substância no alimento (folhas, frutos, grãos, tubérculos, e outros) permite estimar a ingestão diária da substância pelo consumo diário do alimento. Desta forma, o conhecimento prévio do BCF de uma substância em um alimento pode contribuir para o manejo adequado de substâncias utilizadas para produzirem alimentos seguros para o consumo humano. As estruturas químicas dos fungicidas são mostradas na figura 1.

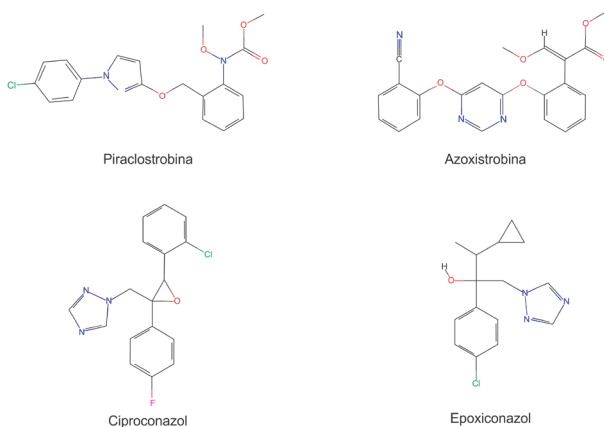


Figura 1 – Estruturas químicas dos fungicidas estudados. Fonte: Adaptado de PUBCHEM (2017).

Materiais e Métodos

Amostras

As amostras de vagem de soja foram obtidas do plantio em vasos pelo setor de Campos experimentais da Embrapa Meio Ambiente em Jaguariúna – São Paulo, Brasil. As amostras recebidas na Central de Resíduos e Contaminantes (CRC) da Embrapa Meio Ambiente foram mantidas a -20°C . Os grãos de soja foram retirados da vagem, manualmente, ainda congelados, e foram triturados utilizando um processador industrial modelo Blixer 3 Robot Coupe.

Soluções dos padrões

Os padrões dos agrotóxicos utilizados ciproconazol, piraclostrobina, epoxiconazol foram da marca Fluka (Germany) e azoxistrobina da marca Chem Service (USA), todos com pureza $>99\%$. As soluções estoques ($1000\ \mu\text{g mL}^{-1}$) e intermediárias ($10\ \mu\text{g mL}^{-1}$) foram preparadas em metanol grau HPLC. A partir dessa solução, foram preparadas diluições para a construção das curvas analíticas no solvente acetato de etila da Scharlau (Sentmenat, Spain).

Reagentes e equipamentos

Ácido acético glacial (grau reagente) foi adquirido da J.T. Baker (México), para o preparo de 1% de ácido acético em acetonitrila adquirida da Tedia (Fairfield, OH, USA) e a água ultrapura foi obtida no sistema Milli-Q Advanced system da Millipore (USA) com $18,2\ \text{M}\Omega\ \text{cm}$ de resistividade. Os materiais utilizados na extração QuEChERS foram acetato de sódio anidro adquirido (pó) da Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO) e sulfato de magnésio anidro MgSO_4 da Sigma-Aldrich (Japão). Na etapa do *clean-up* foi utilizado Bondesil-PSA $40\ \mu\text{m}$ da Agilent (USA) e DSC-18 SPE da Sigma-Aldrich (Bellefonte, PA, USA). Uma centrífuga da Thermo Scientific modelo Multifuge 3L-R foi utilizada além de itens necessários durante a validação, tais como: balança analítica e semi-analítica, vials, filtros, vidrarias, entre outros.

Extração dos analitos

O método utilizado para a extração dos analitos da matriz foi adaptado do método de Gouvêa et al. (2014). Assim, foram pesados 2 g de amostra de grão de soja em tubos tipo Falcon. A esta amostra foi adicionado 3 mL de água Milli-Q e aguardou-se 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 10 mL de acetonitrila grau resíduos de pesticidas contendo 1% de ácido acético. Utilizou-se um vortex, agitou-se essa solução por 1 minuto. Foram adicionados 6,0 g de sulfato de magnésio e 1,5 g de acetato de sódio com agitação vigorosa por 1 minuto. O extrato foi levado para centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. Foram recolhidos 7 mL do sobrenadante e adicionados em um tubo tipo Falcon contendo 300 mg de sulfato de magnésio, 300 mg de PSA e 300 mg de C18 (Discovery – 18). Foi realizada nova centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. Retirou-se 3 mL do sobrenadante e transferiu-se para um tubo concentrador e evaporou-se até a secura sob fluxo lento de nitrogênio. O extrato foi ressuspenso com 500 µL de acetato de etila, filtrado em 0,45µm e injetado para quantificação dos resíduos em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo (GC-MS/MS).

Condições cromatográficas

O equipamento de GC-MS/MS utilizado foi o modelo CG 7890A (Agilent), injetor Gerstel KAS 4 PTV, autoamostrador CTC Analytics e detector Waters Quattro Micro MS/MS (Micromass). A coluna utilizada foi DB-5MS J&W Scientific 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm com fluxo do gás de arraste He: 1,0 mL min⁻¹. A temperatura do forno foi 50°C por 1,5 min com gradiente 15°C min⁻¹ até 200°C mantendo-se nessa temperatura por 2 minutos, e 15°C min⁻¹ até 300°C mantendo-se nessa temperatura por 8 minutos. A injeção foi realizada no Programmed *Temperature Vaporizing* (PTV) em modo *solvent vent* com volume de injeção de 3 µL. A programação do injetor foi 50°C de temperatura inicial, mantida por 0,30 min e após a válvula ter sido aberta, a temperatura do injetor foi aumentada até 280°C a uma taxa de 12°C s⁻¹ durante 27 minutos. A fonte utilizada de ionização por elétrons (EI) foi mantida a 200°C e a linha de transferência a 280°C. O gás de colisão utilizado foi o argônio. Os íons foram medidos utilizando-se o modo *multiple reaction monitoring* (MRM) onde

a transição que gerou maior detectabilidade foi aplicada para quantificação, e a de menor detectabilidade foi empregada para confirmação do analito. Os parâmetros de aquisição por GC-MS/MS otimizados para quantificação (transição 1) e confirmação (transição 2) utilizados na validação e análises são mostrados na tabela 1. O *dwell time* por íon foi de 0,1 s.

Tabela 1- Parâmetros de aquisição usados para a análise por GC-MS/MS.

Pesticida	tr (min)	Transição 1	EC*1 (V)	Transição 2	EC*2 (V)
Ciproconazol	17,3	222>125	15	222>82	5
Epoconazol	18,6	192>138	15	192>111	10
Piraclostrobina	21,7	132>77	15	164>132	15
Azoxistrobina	22,5	344>329	15	344>328	25

*EC= Energia de colisão tr = tempo de retenção

Validação do método

A validação do método para a determinação de resíduos de fungicidas em grãos de soja baseou-se no guia SANTE 11945 (European Commission, 2015) e DOQ-CGCRE-008 (Inmetro, 2016), e avaliaram-se os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, efeito matriz, limite de quantificação (LQ), precisão intra-dia ou repetitividade obtida por meio do coeficiente de variação (CV%), e exatidão obtida por meio de estudos de recuperação (%). Para isso, foram fortificadas amostras testemunhas (isentas de agrotóxicos) de grãos de soja em diferentes concentrações. As fortificações foram feitas em quintuplicatas (n=5) para cada um dos níveis de concentração estudados e estão apresentadas na tabela 2.

Resultados e Discussão

A soja possui alto conteúdo de gordura e baixo teor de água. Em razão dessas características, os procedimentos de extração podem exigir maior número de etapas de limpeza do extrato para evitar ou diminuir o chamado

efeito matriz. Isso significa que a metodologia de extração dos resíduos de agrotóxicos pode ser diferente para cada grupo de alimentos necessitando de testes preliminares e ajustes para cada um deles. Considerando essa complexidade, adicionou-se à etapa de *clean-up* o sorvente C-18 juntamente com o sorvente PSA (do inglês: Primary secondary amine). Segundo Palenikova et al. (2015) o C-18 é utilizado para remoção de componentes lipídicos sendo necessário o uso para matrizes com alto teor de gordura, tal como a soja, isso devido à sua capacidade de retenção de compostos não polares como gorduras (González Curbelo et al., 2015).

Após estabelecer esses ajustes na metodologia foi realizada a validação do método por meio da avaliação dos seguintes parâmetros:

Seletividade: foi realizada através da comparação visual dos cromatogramas do branco dos reagentes, do padrão em solvente e da amostra testemunha (matriz isenta dos analitos). Não foi observado nenhum interferente nos tempos de retenção dos analitos.

Linearidade e efeito matriz: foram obtidas as curvas no solvente e no extrato da matriz, com, no mínimo, cinco pontos. A linearidade da curva analítica foi estudada, inicialmente, utilizando-se o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) através da equação 1:

$$Y = ax + b \quad (1)$$

onde a e b são constantes, x = concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$ e y = área.

O coeficiente de determinação (r^2) foi igual ou maior do que 0,99 para os quatro fungicidas e a faixa de concentração utilizada foi de 0,005 a 0,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, exceto para piraclostrobina que foi de 0,05 a 0,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O desvio da resposta individual de cada analito em relação à própria curva de calibração, na região relevante, não foi superior a $\pm 20\%$, calculado com o software MassLynx V4.1 SCN714 da Waters. Foi analisado o efeito matriz na resposta do equipamento para cada analito. Observou-se efeito matriz (EM%) significativo, com aumento de sinal para epoxiconazol, ciproconazol, piraclostrobina e azoxistrobina. O cálculo do EM% foi feito pela comparação dos slopes das curvas no extrato da matriz e no solvente conforme descrito no trabalho de Nieto García et al. (2015) e mostrado na equação 2. A tabela 2 mostra os valores dos efeitos matriz para cada um dos agrotóxicos estudados.

$$EM\% = ((S_m/S_s) - 1) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

EM = efeito matriz

S_m = *Slope* da curva na matriz

S_s = *Slope* da curva no solvente

Tabela 2: Efeito matriz (EM%)

Pesticida	EM%
Ciproconazol	91,5
Piraclostrobina	366,5
Epoconazol	74,0
Azoxistrobina	83,1

Todos os fungicidas apresentaram efeito matriz acima de 20% - critério usado na SANTE 11945 (European Commission, 2015 -, quando comparou-se curva no extrato da matriz com a curva no solvente. Devido a isto, trabalhou-se com curva no extrato da matriz durante a validação e análises das amostras.

Limites de detecção (LD) e Quantificação (LQ): o valor de LD foi calculado através da relação sinal/ruído de 3 vezes, com base no documento DOQ-CGCRE 008 (Inmento, 2016) embora o documento SANTE 11945 (European Commission, 2015) não apresente mais esse parâmetro. O valor do LQ foi estabelecido como o menor valor quantificado com exatidão (recuperação) 70-120 % e precisão-repetitividade (coeficiente de variação – CV %) < 20 %. A Tabela 3 mostra os resultados de LD e LQ calculado.

Exatidão (% de recuperação): foram fortificadas amostras de grãos de soja em 5, 10, 50, 100 e 500 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para estabelecer os LQ e para atender os limites máximo de resíduos (LMR) considerando os valores estabelecidos nas monografias da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2017). As recuperações ficaram entre 70-120% para as fortificações de 5, 50 e 500 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para azoxistrobina, 10 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para ciproconazol, 5, 10 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para epoxiconazol e em 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para piraclostrobina. Comparado

com valores da literatura, nos trabalhos de Pizzutti et al. (2007, 2009), a piraclostrobina em soja mostrou valores 69% (< 70%) na recuperação em fortificações de 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. No presente trabalho, o valor encontrado foi de 70% de recuperação, a menor, comparada com os outros fungicidas. A tabela 3 mostra os limites de quantificação LQ com 5 repetições para cada fortificação (n=5).

Precisão: os valores de repetitividade, expressos em termos de coeficiente de variação (CV%) para as faixas de concentração, onde a recuperação foi adequada, ficaram dentro dos limites aceitáveis, com desvios padrão relativos $\leq 20\%$. A metodologia atende aos valores de LMR estabelecidos nas monografias da Anvisa onde, na soja, para ciproconazol e epoxiconazol é 50 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para piraclostrobina 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e para azoxistrobina é 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017).

Tabela 3. Limite de Detecção (LD), Quantificação (LQ) e Limite Máximo de Resíduo (LMR) em $\mu\text{g Kg}^{-1}$, média das recuperações e coeficiente de variação (CV% n=5) do método em grãos de soja.

Analito	LD ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Rec _{LQ} (CV)%	LMR ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Rec _{LMR} (CV)%
Ciproconazol	1,00	10,0	96,0 (8,1)	50,0	104,0 (5,8)
Epoxiconazol	1,00	5,0	120,0 (4,8)	50,0	80,0 (7,3)
Piraclostrobina	2,00	100,0	70,0 (19,6)	100,0	70,0 (19,6)
Azoxistrobina	1,00	5,0	117,0 (1,5)	500,0	77,0 (8,9)

As recuperações listadas na tabela 3 estão dentro dos valores aceitos de 70-120% e com coeficiente de variação $\leq 20\%$. Apenas para a piraclostrobina, o LQ obtido e aprovado na validação foi igual ao LMR, provavelmente devido ao maior efeito matriz para este composto, para os demais os LQ foram menores que o LMR. A Figura 2 mostra os cromatogramas de uma amostra testemunha fortificada no LMR.

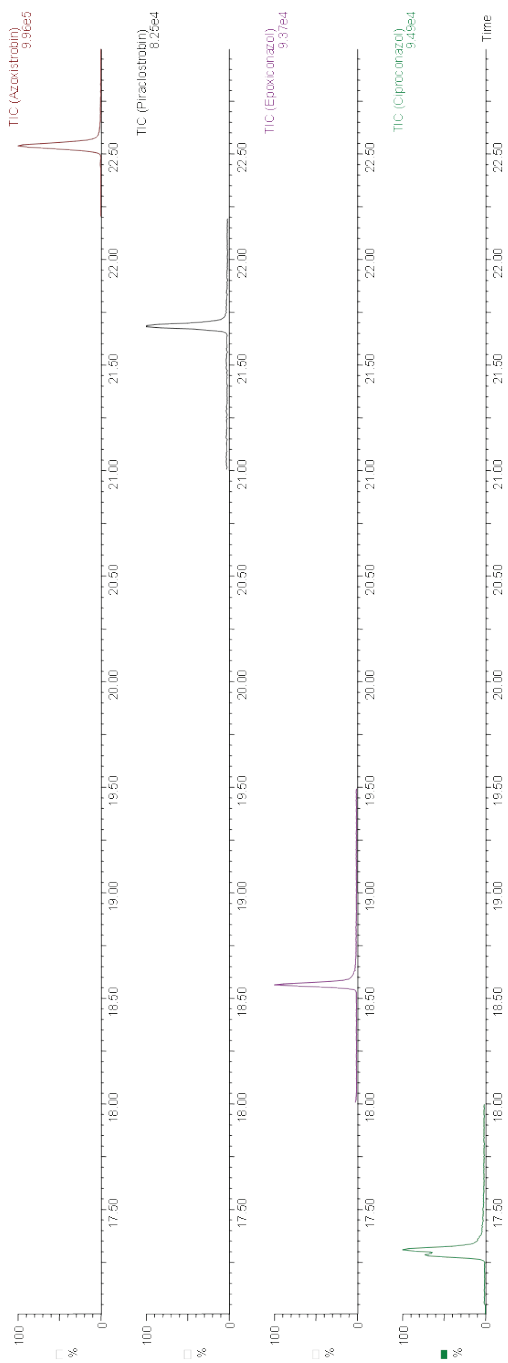


Figura 2. Cromatogramas de íon total (TIC) de amostra de grãos de soja fortificada no limite máximo de resíduos (LMR). A) azoxistrobina ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$); B) ciproconazol ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$), C) piraclostrobina ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$) e D) epoxiconazol ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Conclusões

No trabalho apresentado, o método proposto para determinação de fungicidas em soja mostrou ser simples, rápido e apropriado para esse tipo de matriz. Em virtude da complexidade da amostra, com alto teor de gordura e baixo teor de água, o uso de uma etapa de *clean-up* com o uso de PSA e C-18 proporcionou resultados mais precisos e exatos devido à maior remoção de interferentes lipídicos. O método apresentou parâmetros de linearidade, exatidão e precisão satisfatórios, podendo ser aplicado em análise de amostras reais. Além disso, foi utilizado com sucesso na determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de grãos de soja para fins de validação de um modelo matemático cinético de bioconcentração, que teve o intuito de prever o acúmulo destes agrotóxicos nesta matriz alimentar.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para realização dessa pesquisa proporcionada por meio do processo FAPESP 2014/19359-4.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Regularização de produtos:** agrotóxicos: monografias autorizadas. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>>. Acesso: 25 set. 2017.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROFIT. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 29 jan. 2018.

EUROPEAN COMMISSION. Safety of the Food Chain Pesticides and Biocides. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed**. Brussels, 2015. Disponível em: <http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_SANTE_2015_11945.pdf>. Acesso em: 27 set 2017. (SANTE/11945/2015.).

- CONAB (Brasil). **Perspectiva para a agropecuária:** Safra 2017/2018: produtos de verão: volume 5. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_09_06_09_30_08_perspectivas_da_agropecuaria_bx.pdf>. Acesso: 27 set. 2017.
- GONZÁLEZ CURBELO, M. A.; SOCAS RODRÍGUEZ, B.; HERRERA-HERRERA, A. V.; GONZÁLEZ SÁLAMO, J.; HERNÁNDEZ BORGES, J.; RODRÍGUEZ DELGADO, M. A. Evolution and applications of the QuEChERS method. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 169-185, 2015.
- GOUVÊA, A. V.; CARDOSO, M. H. W. M.; BASTOS, L. H. P.; BARATA SILVA, C.; NÓBREGA, A. W.; JACOB, S. C. Validação de metodologia QuEChERS-acetato para análise de multiresíduo de agrotóxicos em amostras de soja e de extrato solúvel de soja utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 1, p. 40-58, 2014.
- INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos.** Rio de Janeiro, AGO/2016. (DOQ-CGCRE-008 - REVISÃO 05). Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf>. Acesso em: 25 set. 2017.
- LEHOTAY, S. J.; SON, K. A.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U.; FU, W.; MASTOVSKA, K.; HOH, E.; LEEPIPATIBOON, N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2548-2560, 2010.
- NIETO GARCÍA, A. J.; ROMERO GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G. Multi-pesticide residue analysis in nutraceuticals from grape seed extracts by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Food Control**, v. 47, p. 369-380, 2015.
- PALENIKOVA, A.; MARTINEZ DOMINGUEZ, G.; ARREBOLA, F. J.; ROMERO GONZALEZ, R.; HROUZKOVA, S.; FRENICH, A. G. Multi family determination of pesticide residues in soya-based nutraceutical products by GC/MS–MS. **Food Chemistry**, v. 173, p. 796-807, 2015.
- PIZZUTTI, I. R.; KOK, A. de; ZANELLA, R.; ADAIME, M. B.; HIEMSTRA, M.; WICKERT, C.; PRESTES, O. D. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. **Journal of Chromatography A**, v. 1142, n. 2, p. 123-136, 2007.
- PIZZUTTI, I. R.; KOK, A. de; HIEMSTRA, M. B.; WICKERT, C.; PRESTES, O. D. Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 21, p. 4539-4552, 2009.
- PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multiresíduo de agrotóxicos em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 51-64, 2011.
- PUBCHEM. **The PubChem Project.** Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>._ Acesso em: 28 set 2017.
- QUEIROZ, S. C. N.; NOGUEIRA, R. T.; SAITO, M. L. Método para Determinação Multiresíduos de imazaquim, tebuconazole, fluzazifop-p-butil e fluzazifop em vagem de soja. In: CONGRESSO VIRTUAL IBEROAMERICANO SOBRE GESTIÓN DE CALIDAD EN LABORATORIOS, 2., 2003, Valladolid. Resúmenes... Valladolid: ITACYL, 2003.

Embrapa

Meio Ambiente

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**



CGPE número 14416