

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL –MG

ISABELA MENDES BALDIM

APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS QuEChERS E MISPE PARA A
DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE RESÍDUOS DE
ORGANOFOSFORADOS EM MORANGO

Alfenas-MG

2012

ISABELA MENDES BALDIM

**APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS QuEChERS E MISPE PARA A
DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE RESÍDUOS DE
ORGANOFOSFORADOS EM MORANGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Desenvolvimento e avaliação microbiológica e físico-química de fármacos, toxicantes e medicamentos.

Orientadora: Profa. Dra. Isarita Martins Sakakibara.

Alfenas-MG

2012

Baldirn, Isabela Mendes.

Aplicação das técnicas QuEChERS e MISPE para a determinação cromatográfica de resíduos de organofosforados em morango / Isabela Mendes Baldirn. - 2012.

65 f. -

Orientador: Isarita Martins Sakakibara

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2012.

Bibliografia.

1. Extração em Fase Sólida. 2. Inseticidas Organofosforados. 3. Cromatografia Gasosa. 4. Fragaria. I. Orientador. II. Título.

CDD: 543

ISABELA MENDES BALDIM

APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS QuEChERS E MISPE PARA A DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE RESÍDUOS DE ORGANOFOSFORADOS EM MORANGO

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Área de concentração: Desenvolvimento e avaliação microbiológica e físico-química de fármacos, toxicantes e medicamentos.

Aprovada em: 16/ 02 / 2012

Prof^a Dr^a Isarita Martins Sakakibara
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: _____

Prof^a Dr^a Elizabeth de S. Nascimento
Instituição: Universidade de São Paulo (USP)

Assinatura: _____

Prof^a Dr^a Luciana Azevedo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: _____

***A meus pais, maiores exemplos de
dignidade e humildade.***

AGRADECIMENTOS

Dois anos de crescimento, de muita dedicação, de muitos experimentos, de realizações, de dificuldades e superações. Dois anos de boas descobertas e muita expectativa. Por TUDO o que me foi permitido passar e por CADA um que passou por este caminho junto a mim, minha sincera GRATIDÃO.

A Deus, o mentor de todas as minhas conquistas, por escrever tantos milagres em mim, por ser meu companheiro fiel em todos os momentos, por me acalmar, dar força e paciência nos momentos adversos e por me ter apresentado a pessoas tão importantes e especiais...

A Zaia e Paulo, Dayse e Paulinho, por todo amor de serem meus pais e irmãos, pela confiança e pela crença em meus projetos; pelo cuidado, pelo apoio e pelas orações.

Ao Thiago, os olhos verdes que refletem o meu olhar, por ter aparecido no momento certo e, assim, ser tão presente em minha vida, acreditando igualmente em meu crescimento. A toda a família Rozon, pelo acolhimento e carinho.

À Professora Isarita, modelo de docente e pesquisadora, por confiar em mim, mesmo sem nada conhecer de mim. Obrigada pela paciência, dedicação e exemplo de realização.

Ao Professor Eduardo, por ser essencial na execução deste trabalho. Obrigada pelo direcionamento e por sempre estar pronto a ajudar a todos.

À Professora Vanessa e ao Professor Álvaro pelas ricas informações e disponibilidade em ajudar!

À Paty, pela prontidão e pela companhia, tornando mais agradável a convivência de todos no laboratório.

Aos membros da banca, titulares e suplentes, pelas correções que tanto engrandeceram este trabalho.

Ao Flávio pelo suporte na revisão do artigo.

À Márcia e Andressa, pela disposição, paciência e pelos momentos de descontração.

À secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo cuidado e pela atenção a cada discente.

A CAPES, CNPq e Fapemig pelo fomento às pesquisas.

À Mari e ao João, mais que voluntários tão eficientes, amigos! À Laura, Alyne, Lailah e Ricardo, ajuda certa nos momentos certos! Ao Antônio Felipe e ao Gabriel, por compartilharem as vastas experiências de laboratório! Aos demais alunos do LATF, CADA UM com sua singular importância, por terem totalizado a vivência desta etapa.

Aos amigos do PPG Química: João, Fábio, Ariadne e Ciça pelas “prosas”, pela disposição em ensinar e aprender.

À Dani, Nice e Paulo pela simpatia e solicitude em tornarem possível uma etapa importante deste trabalho.

Aos amados amigos da PUCA (Pastoral Universitária Católica de Alfenas), em especial à “galera da Pós”, por continuarem sendo meu alicerce na Fé.

Gratidão a CADA UM!

“O que os olhos não viram, os ouvidos não ouviram e o coração do homem não percebeu, foi isso que Deus preparou para aqueles que o amam.” (1 Cor 2, 9)

RESUMO

Os praguicidas, especialmente os organofosforados, têm uma grande importância no combate e na prevenção de pragas, alcançando, desse modo, um grande benefício para a produção e a garantia de alimento suficiente para a população. No entanto esse benefício pode ser revertido em prejuízo para a integridade humana e ambiental, devido à permanência de seus resíduos. Assim, a determinação de resíduos de praguicidas desempenha um papel importante para a estimativa da exposição a esses compostos, permitindo avaliar a conformidade da produção com as Boas Práticas Agrícolas, possibilitando decisões regulatórias comerciais visando garantir a segurança alimentar. Face ao exposto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o desempenho de duas técnicas de preparo de amostra de morango: extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) e extração em fase sólida dispersiva (QuEChERS), visando o isolamento e a concentração de resíduos dos organofosforados diazinon, dissulfotom, paration, clorpirifós e malation para análise por cromatografia gasosa com detector fotométrico de chama (CG-DFC). Foi empregada uma coluna *megabore* ZB-35 Phenomenex® (35% fenil 65% dimetil siloxano, 30 m x 0,53 mm; 0,5 µm), hidrogênio como gás de arraste na vazão de 8,0 mL min⁻¹. Pirimifós foi usado como padrão interno (0,25 µg g⁻¹). O método apresentou seletividade, bem como linearidade na faixa de 0,10 a 1,00 µg g⁻¹ (para diazinon, dissulfotom, paration e clorpirifós) e 0,10 a 2,00 µg g⁻¹ (para malation). A precisão intra e inter-ensaio apresentou desvio padrão relativo entre 1,55 a 11,75% (QuEChERS) e entre 1,15 a 14,10% (MISPE) para os níveis baixo, médio e alto, do intervalo linear. A eficiência de extração para as técnicas QuEChERS e MISPE foi de 81,64 a 100,00% e 65,25 a 87,70%, respectivamente. A detectabilidade, em ambos os métodos, foi satisfatória, uma vez que atendeu ao Limite Máximo de Resíduo (LMR) estabelecido para os analitos. Os métodos apresentaram robustez, de acordo com o teste de Youden. A técnica MISPE demonstrou ser de baixo custo e simples execução além de ser bastante resistente, visto que o sorvente sintetizado suporta condições extremas de pH e temperatura e, em apenas um cartucho puderam ser feitas de 50 a 80 extrações, revelando grande potencial na análise de alimentos. A técnica QuEChERS é simples e rápida, em comparação à MISPE, especialmente em relação à etapa de *clean up* que não utiliza cartuchos ou sistemas

de vácuo, o que possibilita que todas as análises sejam feitas em uma só corrida analítica. Os resultados obtidos sugerem que os métodos são úteis para o monitoramento de resíduos de organofosforados em amostras de morango, uma vez que atendem a todos os requisitos para a avaliação de resíduos em alimentos, visando à segurança do consumidor.

Palavras-chave: QuEChERS. MISPE. Resíduos. Organofosforados. Morango. Cromatografia gasosa.

ABSTRACT

Pesticides, especially organophosphates, have a great importance in combating and preventing pests, reaching thus a great benefit to the production and ensuring enough food for the population. However, this can be detrimental to human and environment health due to their residues. Thus, the determination of pesticides residues plays an important role in the estimation of exposure to these compounds, allowing production to assess compliance with Good Agricultural Practices, enabling business regulatory decisions aimed at ensuring food security. So, the overall objective of this study was to evaluate the performance of two sample preparation techniques: molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) and dispersive solid phase extraction (QuEChERS), to the isolation and concentration of organophosphate residues of diazinon, disulfoton, parathion, chlorpyrifos and malathion from strawberry for analysis by gas chromatography with flame photometric detector (GC-DFC). It was used a column megabore Phenomenex[®] ZB-35 (35% phenyl 65% dimethyl siloxane, 30 m x 0.53mm, 0.5 mm), hydrogen as carrier gas at a flow rate of 8.0 ml min⁻¹. Pirimiphos was used as internal standard (0.25 mg g⁻¹). The method presented selectivity and linearity in the range from 0.10 to 1.00 mg g⁻¹ (for diazinon, disulfoton, parathion and chlorpyrifos) and 0.10 to 2.00 mg g⁻¹ (for malathion). The intra and inter-assay precision presented relative standard deviation between 1.55 to 11.75% (QuEChERS) and between 1.15 to 14.10% (MISPE) to low, medium and high levels, the linear range. The efficiency of extraction for the QuEChERS and MISPE techniques was 81.64 to 100.00% and 65.25 to 87.70%, respectively. The detectability in both methods was satisfactory, since it attended the Maximum Residue Limit (MRL) established for the analytes. The methods showed robustness, according to the Youden test. The MISPE technique proved to be inexpensive and simple to implement and is quite tough, since the sorbent synthesized supports extreme conditions of pH and temperature and in just a cartridge could be made 50 to 80 extractions, showing great potential in food analysis. The QuEChERS technique is simple and fast, compared to MISPE, especially in relation to clean up step that does not use cartridges or vacuum systems, which enable all tests are done in a single analytical run. The results obtained suggest that the methods are useful for

organophosphate residues monitoring in strawberry samples, since meet all of the requirements for the evaluation of residues in food, aiming consumers' safety.

Keywords: QuEChERS. MISPE. Residues. Organophosphates. Strawberry. Gas Chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química geral dos compostos organofosforados	16
Figura 2 - Estruturas químicas dos principais grupos de compostos organofosforados	17
Figura 3 - Número de publicações científicas sobre a técnica QuEChERS usada na determinação de praguicidas	24
Figura 4 - Representação esquemática do processo de formação do MIP	27
Figura 5 - Número de publicações científicas envolvendo as várias aplicações de MIP	29
Figura 6 - Número de publicações científicas envolvendo a aplicação de MIP para análise de alimentos.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas dos organofosforados em estudo	18
Tabela 2- Técnicas de preparo de amostras e detecção para a análise de organofosforados em diferentes matrizes	22

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	PRAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS	16
2.2	REGULAMENTAÇÃO	19
2.3	MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PRAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS	21
2.3.1	QuEchERS	23
2.3.2	Polímeros de Impressão Molecular	26
3	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	31
4	RESULTADOS	33
	ARTIGO.....	34
5	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1 INTRODUÇÃO

A política da globalização mundial tem afetado intensamente o cenário da produção de alimentos. A necessidade dos países em se manterem ou se tornarem competitivos nesse mercado tem exigido que os mesmos invistam na melhoria para a evolução das tecnologias de produção. Todavia, os artifícios lançados para se atingir tais objetivos têm despertado grande atenção da opinião pública frente aos acontecimentos envolvendo a contaminação de alimentos, como foi o caso de benzeno em água e sucos de frutas, nitrofuranos em carne de frango, cloranfenicol em mel, entre outros (PASCHOAL et al., 2008).

Uma das classes de substâncias químicas mais utilizadas em produtos do gênero alimentício são os praguicidas, definidos pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) como sendo: *quaisquer substâncias ou misturas de substâncias destinadas a prevenir, destruir ou controlar pragas, incluindo vetores de doenças humanas ou animais, espécies não desejadas de plantas ou animais causando danos à produção, processamento, armazenamento, transporte ou comercialização de alimentos, “commodities” agrícolas, madeira, alimentos para animais, produtos destinados ao uso em animais para controle de insetos, aracnídeos e outras pragas. O termo inclui substâncias usadas como regulador de crescimento para plantas, desfolhantes, desseccantes, agentes de desbaste de frutos ou para prevenir a queda prematura de frutos. Podem ser, também, aplicados antes ou após a colheita impedindo a deterioração durante a estocagem ou transporte* (FAO, 2002).

O maior mercado de praguicidas é o da Europa, representando 32%, seguido pela Ásia e pela América do Norte, com 23% e 22%. A América Latina fica em último lugar nessas contas, com 19%. Por representar 84% do comércio de destas substâncias na região, o Brasil aparece como maior consumidor isolado. O consumo brasileiro perfaz o total de US\$ 7 bilhões (EMBRAPA, 2010).

Esse fato, associado à ausência de avaliações mais sistemáticas da presença de resíduos tóxicos em produtos alimentícios foi o impulso para a criação do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) em 2001,

com o objetivo de prevenir agravos à saúde da população pela exposição aos praguicidas através dos alimentos, implantando assim, em nível Nacional, um serviço para monitorar continuamente os níveis de resíduos dessas substâncias nos alimentos que chegam à mesa do consumidor e adotar medidas de controle. Este programa é uma ação do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, coordenado pela Anvisa em conjunto com os órgãos de Vigilância Sanitária de 25 Estados participantes e o Distrito Federal, que realizam os procedimentos de coleta dos alimentos nos supermercados para análise nos laboratórios (ANVISA, 2010).

O morango (*Fragaria* sp.) é uma planta herbácea, rasteira e perene da família *Rosaceae*, propagada por via vegetativa, através de estolhos. Em geral, a cultura para produção de frutos é renovada anualmente. A parte comestível é um pseudo-fruto, originário do receptáculo floral que se torna carnoso e succulento. O morango como alimento possui 2,3% de fibras, 92,8% de água e 39 calorias em 100 gramas de frutos. As principais vitaminas constituintes são: tiamina (B₁), riboflavina (B₂), ácido pantotênico (B₅) e ácido ascórbico (C). Outros elementos presentes são os minerais, como potássio, sódio, cálcio, ferro e fósforo (CAMARGO FILHO; CAMARGO, 2009).

Os frutos do morango são mundialmente apreciados, sendo a espécie de maior expressão econômica entre as pequenas frutas vermelhas. Seu consumo está diretamente ligado ao aroma agradável e à cor intensa. Possui alto teor de antocianinas, flavonóide responsável pela cor vermelha e pela atividade antioxidante dos frutos. O cultivo do morangueiro é bastante desenvolvido em vários países do mundo, especialmente nos de clima temperado. No contexto nacional, os estados maiores produtores de morango são Minas Gerais (32,3%), São Paulo (31,4%) e Rio Grande do Sul (16,5%) (BORDIGNON JUNIOR et al., 2009; OTTO et al., 2009).

A possibilidade da presença de resíduos de praguicidas nos alimentos representa um potencial risco à saúde do consumidor, de modo que métodos analíticos que monitorem a presença de compostos tóxicos em alimentos se tornam cada vez mais imprescindíveis. Limites máximos de resíduos (LMR) específicos para cada analito alvo são estabelecidos por Agências Reguladoras, os quais devem ser levados em consideração no estabelecimento de um protocolo para validação do método analítico a ser empregado na determinação desses resíduos nos alimentos (PASCHOAL et al., 2008).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS

As propriedades dos praguicidas organofosforados foram descobertas em 1937 por Gerhard Schrader que, em 1941, desenvolveu o inseticida sistêmico OMPA – octametil pirofosforamida que foi chamado de Scharadan. Depois deste, um grande número de inseticidas ésteres organofosforados também foram descobertos, incluindo o primeiro com práticas inseticidas chamado de Bladan, que continha tetraetilpirofosfato, ou TEEP, preparado na Alemanha em 1944 para ser usado como substituto da nicotina para matar pulgões. Seus usos originais foram observados durante a I Guerra Mundial, onde indivíduos eram asfixiados com o gás mostarda, e como consequência tinham a medula óssea e o tecido linfático danificado. Em contraposição, a ciclofosfamida, é outro composto organofosforado largamente usado como agente antineoplásico, embora requeira ativação metabólica levando à modificação biomolecular para exercer sua ação (SANTOS et al., 2007).

Os praguicidas organofosforados são a classe de maior interesse comercial e toxicológico, são ésteres ou tióis derivados de ácidos fosfóricos, fosfônico, fosfínico ou fosforamídico e usualmente têm a estrutura geral descrita na Figura 1. Usualmente, R₁ e R₂ são grupos arilas ou alquilas que são ligados diretamente ao átomo de fósforo, formando fosfinatos, ou através de um átomo de oxigênio ou de enxofre, formando fosfatos e fosfortioatos. Em outros casos, R₁ está diretamente ligado ao átomo de fósforo e R₂ está ligado por um átomo de oxigênio ou de enxofre, formando fosfonatos ou tiofosfonatos (SANTOS et al., 2007).

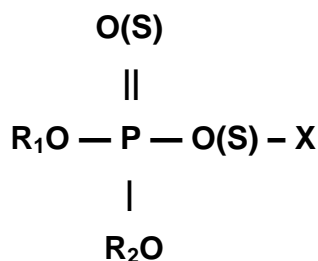


Figura 1. Estrutura química geral dos compostos organofosforados

Fonte: MARONI et al. (2000).

Dependendo da configuração dos átomos de O ou S, seis grupos diferentes deste composto podem ser sintetizados (FIGURA 2).

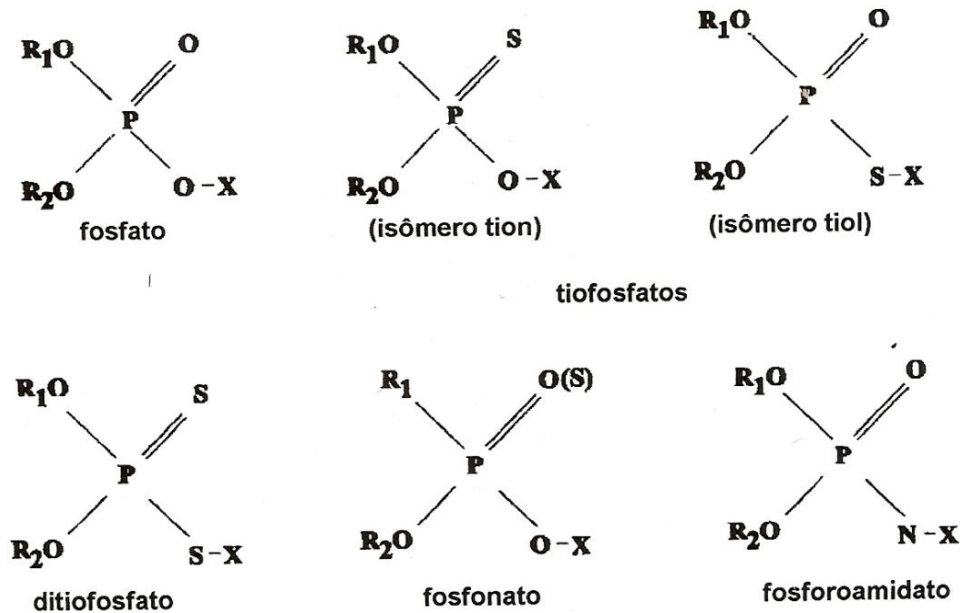


Figura 2. Estruturas químicas dos principais grupos de compostos organofosforados.

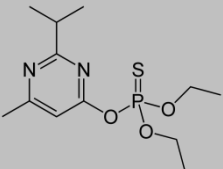
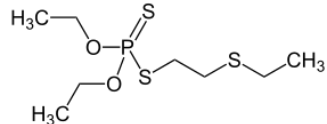
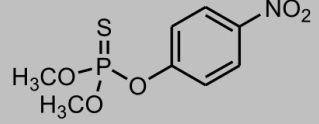
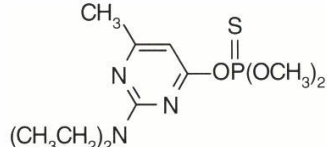
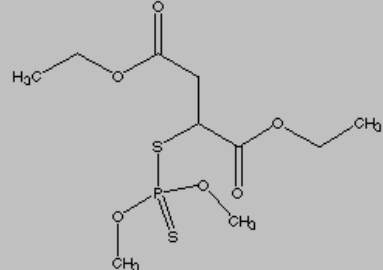
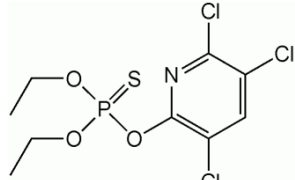
Fonte: MARONI et al. (2000).

Os praguicidas organofosforados exercem sua ação principalmente pela inibição enzimática. O principal sítio de ação destes compostos é o sistema nervoso na junção neuromuscular, interagindo com a acetilcolinesterase, cuja função é catalisar a hidrólise da acetilcolina (ACh) em ácido acético e colina interrompendo a transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses dos neurônios colinérgicos dos sistemas nervosos central e periférico. A interação entre a acetilcolinesterase e seu inibidor organofosforado parece envolver somente o sítio esterásico, formando um complexo bastante estável, relacionada com a estrutura química do inibidor. A inibição da acetilcolinesterase é irreversível; desta forma, a acetilcolina é impedida de reagir com o sítio esterásico, ocorrendo um acúmulo da mesma onde é normalmente liberada, resultando, toda a sintomatologia da intoxicação por acetilcolina ocasionada por compostos organofosforado (SILVER, 1974).

A interação entre a acetilcolinesterase e seu inibidor organofosforado parece envolver somente o sítio esterásico, formando um complexo bastante estável, relacionada com a estrutura química do inibidor. A inibição da acetilcolinesterase é

irreversível; desta forma, a acetilcolina é impedida de reagir com o sítio esterásico, ocorrendo um acúmulo da mesma onde é normalmente liberada, resultando, toda a sintomatologia da intoxicação por acetilcolina ocasionada por compostos organofosforado (LOTTI, 1992). As propriedades físico-químicas dos organofosforados utilizados neste estudo estão sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos organofosforados em estudo (continua)

<i>ANALITO</i>	<i>Massa Molar (g mol⁻¹)</i>	<i>Solubilidade em água (mg L⁻¹)</i>	<i>Log P</i>	<i>pKa</i>	<i>Estrutura Química</i>
Diazinona	304,35	60	3,69	2,6	
Dissulfotom	274,40	25	3,95	-	
Parationa	263,21	55	3,00	-	
Pirimifós	305,33	11	3,9	4,3	
Malationa	330,36	148	2,72	-	
Clorpirifós	322,53	2,74	4,00	-	

Fonte: PPDB (2011).

2.2 REGULAMENTAÇÃO

O Ministério da Saúde (MS) por meio da Anvisa é o responsável, dentre outras competências, pela avaliação e classificação toxicológica dos praguicidas e, junto com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no âmbito de suas respectivas áreas de competência, pelo monitoramento dos resíduos dos mesmos em produtos de origem vegetal. A Anvisa aplica o Limite Máximo de Resíduos (LMR) e o intervalo de segurança de cada ingrediente ativo para determinada cultura agrícola (ANVISA, 2010).

O LMR é a concentração máxima (expressa em mg kg^{-1}) de resíduo de praguicida, ou afim, que se permita ou se reconheça legalmente como admissível no alimento. É recomendado pelo “Codex Alimentarius” para ser aplicado no comércio internacional. A determinação deste parâmetro refere-se a valores provenientes de experimentos de campo, exigidos para cada cultura alimentar, e levam em consideração a Ingestão Diária Aceitável (IDA), que é a quantidade máxima que, ingerida diariamente durante toda a vida, não oferece risco apreciável à saúde, à luz dos conhecimentos atuais. É expressa em μg ou mg do praguicida por kg de peso corpóreo ($\mu\text{g kg}^{-1}$ p.c. ou mg kg^{-1} p.c.) (CODEX ALIMENTARIUS, 2012_a).

No ano de 2001, foi iniciado o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), com o objetivo de avaliar continuamente os níveis de resíduos de praguicidas nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor, fortalecendo a capacidade do governo em atender a segurança alimentar, evitando possíveis agravos à saúde da população. Este programa é uma ação do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, coordenado pela Anvisa em conjunto com os órgãos de vigilância sanitária de 25 Estados participantes e o Distrito Federal, que realizam os procedimentos de coleta dos alimentos nos supermercados para análise nos laboratórios (ANVISA, 2010).

Em 2010, o PARA monitorou dezoito alimentos, baseado nos dados de consumo obtidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), na disponibilidade destes nos supermercados e no intensivo uso de praguicidas nestas culturas: abacaxi, alface, arroz, batata, beterraba, cebola, cenoura, couve, feijão, laranja, maçã, mamão, manga, morango, pepino, pimentão, repolho e tomate. O

método analítico empregado pelos laboratórios do Programa é o de Multirresíduos, o mais difundido e reconhecido método para monitoramento de resíduos de praguicidas em alimentos (ANVISA, 2010).

No âmbito internacional, foi criada em 1963 pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a Comissão do “Codex Alimentarius” com o objetivo de desenvolver normas, códigos e padrões de qualidade alimentar a nível internacional a fim de proteger a saúde dos consumidores e assegurar práticas comerciais justas e equitativas no comércio de alimentos (CODEX ALIMENTARIUS, 2012_b).

Para desenvolver seus trabalhos, o “Codex Alimentarius” depende de pareceres científicos independentes efetuados por órgãos especialistas coordenados pela FAO/OMS. Esta seção forma a base científica para o trabalho do “Codex” e é composta, basicamente, por três comitês: Comitê Especialista em Aditivos alimentares (JECFA), o Comité sobre Resíduos de Praguicidas (JMPR) e pelo Comité de Avaliação de Risco Microbiológico (JEMRA). É devido a sua base científica que os textos do “Codex” são consideradas pela Organização Mundial do Comércio (OMC) como a referência internacional para padrões de segurança alimentar (CODEX ALIMENTARIUS, 2012_c).

Atualmente, conta com mais de 165 países-membros, que enviam delegações aos seus subcomitês, cuja principal tarefa é a produção normativa. Na década de 70, o Brasil tornou-se membro deste Programa e, em 1980, com a criação do Comitê do “Codex Alimentarius” do Brasil (CCAB), através das Resoluções 01/80 e 07/88 do CONMETRO (Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), conseguiu uma articulação mais representativa do setor alimentício (INMETRO, 2012).

Os laboratórios que realizam as análises em alimentos precisam ter capacidade técnica comprovada para tal compromisso, a qual é garantida pelas normas de credenciamento estabelecidas por órgãos responsáveis, que no Brasil são representados pela Anvisa e pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), através de seus guias para procedimentos de controle de qualidade e validação de métodos analíticos. Há ainda a NBR ISO/IEC 17025-2005 que estabelece os requisitos mínimos para a acreditação de laboratórios de calibração ou ensaio. Órgãos internacionais, como União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), Organização Internacional para

Padronização (ISO), Conferência Internacional em Harmonização (ICH) e a Direção-Geral da Comissão Europeia para Saúde e Proteção dos consumidores (DG-SANCO/ 10232/2006), também estabelecem procedimentos de validação como critério fundamental no credenciamento de laboratórios (PASCHOAL et al., 2008).

2.3 MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PRAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS

O cenário atual mundial da produção de alimentos revela o grande interesse da sociedade quanto à inocuidade do produto final a ser consumido. Neste ponto, os métodos analíticos desempenham um papel fundamental no estabelecimento de protocolos analíticos compreendendo desde preparo da amostra até identificação e quantificação das espécies de interesse. A etapa de preparo da amostra, visando uma posterior análise cromatográfica, normalmente contempla etapas de extração e/ou pré-concentração. Entretanto, devido à complexidade de algumas matrizes e aos baixos níveis dos constituintes de interesse, em alguns casos, o preparo da amostra pode não eliminar a presença das espécies interferentes, ocasionando um menor desempenho da técnica de separação (TARLEY et al., 2005).

A análise de traços de contaminantes orgânicos em matrizes complexas requer um pré-tratamento da amostra. A extração em fase sólida (SPE) é rotineiramente usada para extração de compostos a partir de matrizes líquidas ou sólidas e os sorventes normalmente empregados neste processo retêm os analitos por interações não seletivas hidrofóbicas (polímeros, sorventes carbonáceos e sílica ligada a cadeia alquílica) ou polares (sílica, alumina). Apesar de suas características atrativas, estes sorventes levam a uma co-extração de compostos interferentes (PICHON, 2007).

Após revisão de literatura foi possível observar que a maioria dos métodos para determinação multirresidual de organofosforados em diferentes matrizes envolvem a cromatografia em fase gasosa (GC) equipada com detectores seletivos para elementos ou grupo de elementos, tais como detector por captura de elétrons (ECD), detector fotométrico de chama (FPD) ou detector de nitrogênio-fósforo (NPD). A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

ganha destaque por sua elevada sensibilidade e poder de confirmação (BOTISI et al., 2007; MASTOVSKA et al., 2010). A Tabela 2 apresenta um levantamento das condições analíticas para a realização de tal análise.

Mais recentemente estudos que empregam a cromatografia líquida têm sido desenvolvidos em virtude do emprego de praguicidas mais polares, menos voláteis e termicamente instáveis (MASTOVSKA et al., 2010). Botisi et al. (2007), propôs a determinação multirresidual de 28 praguicidas de diferentes classes químicas (organofosforados, carbamatos, estrubirulinas, neonicotinóides, amidas, pirimidinas, benzimidazóis, triazóis e imidazóis) em frutas e vegetais, obtendo linearidade na faixa de 0,5 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($r \geq 0,99$) e limite de detecção de 0,1 a 1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 2- Técnicas de preparo de amostras e detecção para a análise de organofosforados em diferentes matrizes

(continua)

<i>Referência</i>	<i>Equipamento de detecção</i>	<i>Amostra</i>	<i>Técnica de preparo de amostra</i>	<i>Intervalo de concentrações estudado</i>	<i>% Recuperação</i>
LAMBROPOULOU, D.A., ALBANIS, T.A., 2002	- GC-MS	Morango e cereja	HS-SPME	50-500 $\mu\text{g kg}^{-1}$	74-91%
ZAMBONIN, C.G. et al., 2004	- GC-MS	Vinho e Suco de fruta	SPME ¹	10-500 ng mL^{-1}	67-100% (vinho) 5-98% (suco)
FARAJZADEH, M.A.; HATAMI, M. 2004	- GC-FID ²	Água	SPME	25-5000 ng L^{-1}	42-63%
ZHU, X. et al., 2005	- GC-NPD ³	Solo e água	MISPE ⁴	-	79,3–93,5% (Solo) 77,5–99,1% (Água)
FYTIANOS, K. et al. /, 2006	- GC-NPD	21 tipos de frutas	HS ⁶ -SPME (fibras de poliacrilato e PDMS)	1,2 - 700 ng mL^{-1}	0,3-3,1%
KUMARI, B. et al., 2006	- GC-NPD	Uva, goiaba	LLE ⁷ (acetato de etila e <i>Clean-up</i> : coluna cromatográfica com eluição por acetona:hexano)	-	90-104%
BOTISTI, H.; ECONOMOU, A; TSIPI, D., 2007	- LC-MS/MS ⁸	Frutas e vegetais	Extração com acetato de etila+10g NaSO ₄ anidro	0,5-100 $\mu\text{g L}^{-1}$	65-94%

Tabela 2- Técnicas de preparo de amostras e detecção para a análise de organofosforados em diferentes matrizes

Referência	Equipamento de detecção	Amostra	Técnica de preparo de amostra	Intervalo de concentrações estudado	(conclusão)
					% Recuperação
BOLAÑOS et al., 2007	- GC-MS/MS	Morango	QuEChERS ⁹	10–200 µg kg ⁻¹	76-110%
FENOLL, J., 2007	- GC-NPD	Pimenta e tomate	LLE (acetona / acetate de etila / ciclohexano)	50-1500 µg L ⁻¹	70,1-128%
KHALILI-ZANJANI, M. R. et al., 2008	- GC-FPD ¹⁰	Água	LPME ¹¹	0,1-100 µg L ⁻¹	97-104%
KIRCHNER, M. et al., 2008	-GC-MS	Maçã	QuEChERS	1-500 µg kg ⁻¹	-
KMELLÁR, B. et al., 2008	- LC-MS/MS	Tomate, pera e laranja	QuEChERS	5-500 µg kg ⁻¹	65-110%
CHAI, M. K.; TAN, G. H., 2009	- GC-ECD ¹²	Frutas e vegetais	HS-SPME	0,01-10000 µg L ⁻¹	71-98%
ALIZADEH, T. et al., 2009	- SWV ¹³	Água	MISPE	0,2-467,4 µg L ⁻¹	96-106%
BARROS, L.A. et al., 2010	- HPLC-DAD ¹⁴	Tomate	MISPE	0,13-2,0 µg g ⁻¹	96%
RODRIGUES, S. A. et al., 2011	- LC-MS/MS	Cebola	QuEChERS	-	65-116%

¹Solid phase micro extraction; ²Flame ionization detector; ³Nitrogen phosphorus detector; ⁴Molecularly imprinted solid-phase extraction; ⁵Head space; ⁷Liquid-liquid extraction; ⁸Tandem mass spectrometry; ⁹Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe; ¹⁰Flame photometric detector; ¹¹Liquid phase micro extraction ¹²Electron capture detector; ¹³Square wave voltammetry; ¹⁴Diode-array detector.

2.3.1. QuEChERS

As análises multirresiduais para a determinação de praguicidas são empregadas com sucesso há muitos anos, mas os procedimentos usados eram longos e trabalhosos, com grande consumo de amostra e solventes. Como uma etapa significativa em direção à redução do tempo no processamento das amostras

para análise, Anastassiades et al. (2003) com o objetivo de superar limitações práticas dos métodos de extração disponíveis, introduziram um novo procedimento de preparo de amostras para extração de resíduos de praguicidas denominado QuEChERS, acrônimo para suas principais características: *Quick* –rápido, *Easy* – fácil, *Cheap* –barato, *Effective* –eficaz, *Rugged* –robusto e *Safe* –seguro. A pronúncia adequada deve ser “catchers”. Considerada como extração em fase sólida dispersiva (d-SPE), essa técnica explora as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna. Durante o seu desenvolvimento, grande ênfase foi dada para a obtenção de um procedimento dinâmico, que pudesse ser aplicado em qualquer laboratório, devido à simplificação das etapas (PRESTES et al., 2009).

A partir de 2003, observou-se um aumento exponencial no número de trabalhos sobre esta técnica, denotando sua importância na determinação de resíduos de praguicidas em diversas matrizes (FIGURA 3).

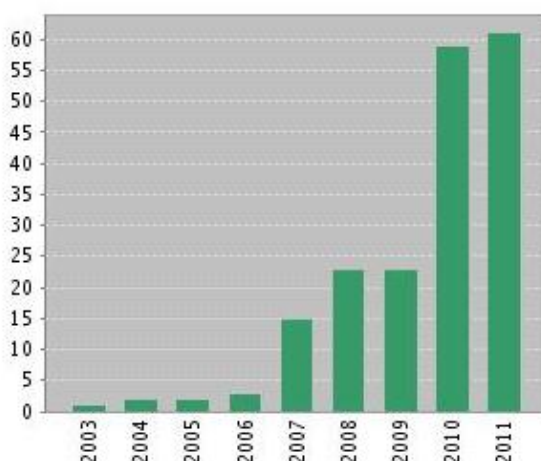


Figura 3: Número de publicações científicas sobre a técnica QuEChERS usada na determinação de praguicidas.

Fonte: *Web of Science*. Dia da pesquisa: 17-10-2011. Palavras-chave: *quechers* and pesticide**

Segundo dados da literatura, essa técnica possui muitas vantagens sobre as demais técnicas tradicionais de preparo de amostra dentre elas, as listadas abaixo:

- altos percentuais de recuperação (>85%) para um grande número de compostos de diferentes polaridades;
- precisão, o que é assegurado pela utilização de padrão interno;
- permite o preparo de 10 a 20 amostras em até 40 minutos;

- preconiza o uso de um pequeno volume de solvente, além de não utilizar solventes clorados, assegurando assim menor exposição pelo analista;
- não requer a utilização de muitos materiais e equipamentos, bem como espaço físico durante a execução do método (PRESTES et al., 2009).

Esta técnica é baseada na extração dos analitos da matriz com acetonitrila seguida de agitação e centrifugação. A água é separada da fase orgânica pela adição de sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio, que também promovem o efeito *salting out*, o que melhora a recuperação para muitos analitos. O extrato, então, passa para a etapa de *clean-up* usando d-SPE com amina primária-secundária (PSA), adsorvente eficiente para remoção de interferentes polares. O extrato preparado dessa forma é então analisado por cromatografia (WILKOWSKA e BIZIUK, 2011).

Os resultados são excelentes para a grande maioria dos praguicidas, à exceção daqueles que são “pH-dependentes” e, por isso, exibem problemas de estabilidade. Para minimizar esta adversidade, foram empreendidas modificações na técnica QuEChERS original. O ácido acético (1%) é adicionado à acetonitrila e o cloreto de sódio foi substituído pelo acetato de sódio, promovendo um tamponamento do extrato (pH entre 4 e 5), resguardando os analitos sensíveis a valores maiores de pH e aumentando, de certa forma, a recuperação dos praguicidas mais ácidos (LEHOTAY, MASTOVKA e YUN, 2005).

Nos Estados Unidos, essa versão tamponada da técnica QuEChERS foi adotada em 2007 como método oficial da “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC) para a determinação de resíduos de praguicidas em alimentos (AOAC, 2007).

A principal desvantagem dessa técnica é a relação amostra/ extrato final, a qual é de 1 g por 1 mL. Este valor é menor quando comparado com aqueles obtidos por outros métodos, os quais utilizam uma etapa de concentração, apresentando relação amostra/ extrato final de 2 a 5 g por mL. Portanto, se a matriz não é uma fonte de ruídos nas análises isto pode conduzir, no método QuEChERS, a valores de limites de quantificação (LQ) mais elevados para o mesmo volume de injeção (PRESTES et al., 2009).

Nos estudos de Schenck et al. (2009) foi desenvolvido um método para determinação de organofosforados em alimentos frescos a níveis abaixo de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (ppb) baseado em modificações do método QuEChERS. A extração dos analitos foi realizada com acetonitrila, efeito *salting-out* com sulfato de magnésio (MgSO_4) e cloreto de sódio (NaCl) e *clean-up* do extrato com extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) usando amina primária-secundária (PSA), carbono grafitizado e MgSO_4 . Quatro tipos de alimentos (uva, laranja, tomate e espinafre) foram fortificados com 102 diferentes praguicidas nas concentrações de 1, 10 e 100 ppb. As recuperações obtidas foram da ordem de 63-125%, sendo que para a maioria dos analitos os resultados foram superiores a 80%.

Bolaños et al. (2007) desenvolveram e validaram um método para extração simultânea de 151 praguicidas em morangos baseada no método QuEChERS e detecção por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS/MS), obtendo linearidade na faixa de 10 a $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($R^2 \geq 0,98$) e limite de quantificação de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. As recuperações se encontraram na faixa de 76 a 110%.

2.3.2 POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR

Com intuito de aumentar a seletividade da extração, novos materiais estão sendo inseridos em várias pesquisas, envolvendo o mecanismo de reconhecimento molecular e baseando-se na alta afinidade da interação antígeno-anticorpo. Na prática, os anticorpos são covalentemente ligados a um sorvente apropriado (geralmente a sílica porosa) originando os imunosorventes, posteriormente colocados em cartuchos de extração em fase sólida ou em colunas cromatográficas. Apesar das características marcantes dos imunosorventes como material seletivo, existem algumas desvantagens relacionadas aos anticorpos: custo elevado, necessidade de purificação, dificuldade de obtenção e instabilidade (TARLEY et al., 2005). Estes são atualmente conhecidos como MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) e também designados como materiais biomiméticos ou imunosorventes (IS) (PICHON, 2007).

De acordo com He et al. (2007), MIP têm atraído muita atenção devido às suas importantes vantagens, tais como a habilidade de reconhecimento pré determinado, estabilidade, relativa facilidade e baixo custo no preparo e aplicação potencial para uma ampla faixa de moléculas alvo. MIP são materiais poliméricos rígidos, dotados de sítios específicos de ligação. No processo mais comum de preparação (Figura 4), monômeros funcionais formam um complexo com a molécula molde (*template*). Em seguida, estes monômeros são unidos ao redor do molde na presença de um reagente de ligação cruzada (RLC), um iniciador radicalar e um solvente apropriado. Após, ocorre remoção da molécula molde da rede polimérica através de reações químicas usando um solvente adequado, deixando os sítios de impressão na estrutura do polímero, os quais são complementares ao “template” em tamanho, forma e posição dos grupos funcionais, o que permite o reconhecimento seletivo.

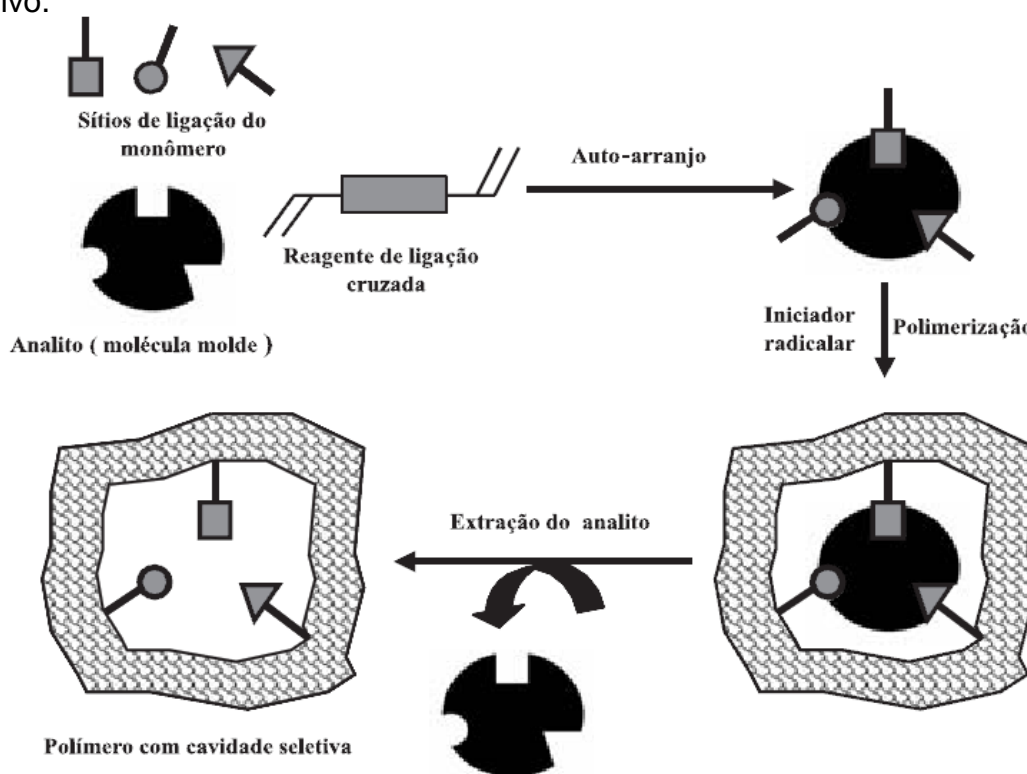


Figura 4. Representação esquemática do processo de formação do MIP

Fonte: TARLEY et al. (2005).

Três abordagens foram descritas na síntese dos MIP: covalente, não-covalente e semi-covalente. Polímeros preparados por ligação covalente possuem sítios mais seletivos, dada a uniformidade gerada nos mesmos. Porém, quando esta

estratégia é adotada, a necessidade do uso de monômeros e analitos que estabeleçam ligações covalentes restringe a aplicabilidade dos MIP para poucos analitos. Adicionalmente, estudos têm mostrado que tais polímeros apresentam uma cinética lenta de retenção dos analitos na cavidade do polímero. Por outro lado, polímeros preparados a partir de ligações não-covalentes frequentemente apresentam diâmetros de partículas e sítios seletivos menos uniformes. Porém, apesar destas desvantagens, esta abordagem de preparo é mais utilizada, dada a maior flexibilidade de aplicação dos MIP para diferentes analitos (TARLEY et al., 2005). Uma opção intermediária é a abordagem semi-covalente. Neste caso o modelo é covalentemente ligado ao monômero funcional, mas a religação é baseada em interações não-covalentes (TURIEL e MARTÍN-ESTEBAN, 2010).

Os monômeros funcionais são responsáveis pela interação das ligações químicas nos sítios impressos. Para processos baseados nos mecanismos não-covalentes, geralmente eles são usados em excesso (relação 4:1) em relação à quantidade de *template* para favorecer a formação do complexo entre monômero funcional e molécula molde. O reagente de ligação cruzada é importante para controlar a morfologia da matriz polimérica (gel, pó micro ou macroporoso), estabilizar o sítio de ligação impresso e para fornecer estabilidade mecânica à matriz do polímero. O iniciador radicalar, o qual sofre uma quebra homolítica em sua estrutura, por radiação UV ou aquecimento, gera radicais que iniciam o mecanismo da reação de polimerização. Já, o solvente tem como função principal solubilizar todos os reagentes do processo de síntese, não interferindo na interação molde-monômero funcional (CORMACK & ELORZA, 2004). Estes materiais são geralmente preparados usando ácido meta-acrílico (MAA) como monômero funcional, etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) como reagente de ligação cruzada, 2,2'-azo-bis-iso-butyronitrila como iniciador radicalar e solventes porogênicos moderadamente polares e apróticos, tais como tolueno, clorofórmio, diclorometano e acetonitrila (PICHON, 2007).

O método mais comum de preparo dos MIP é a polimerização em "bulk" onde, após a reação, o polímero obtido é triturado, resultando em pequenas partículas com impressão molecular, usualmente na escala de micrômetros (TARLEY et al., 2005).

O primeiro trabalho com emprego de MIP em química analítica é datado de 1972, onde Wulff e Sarhan descreveram a síntese do polímero com sítios seletivos para separação enantiomérica de racematos de açúcares. Desde então, os referidos

materiais vêm sendo amplamente empregados em preparo de amostras atuando em processos de extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME), em técnicas de separação, tais como, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), eletroforese capilar (CE), eletrocromatografia capilar (CEC) e cromatografia em camada delgada (TLC) visando, principalmente, a separação de espécies enantioméricas. Também, há um amplo campo de pesquisa dos MIP em associação com técnicas eletroanalíticas enfocando o desenvolvimento de sensores seletivos (TARLEY et al., 2005). A Figura 5 ilustra as crescentes publicações envolvendo os MIP em suas diversas aplicações.

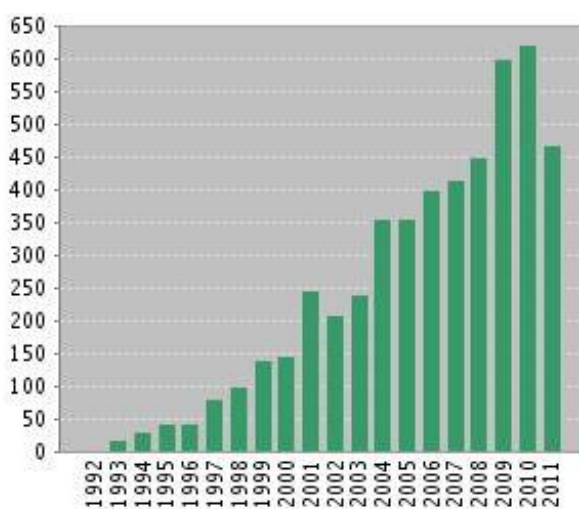


Figura 5. Número de publicações científicas envolvendo as várias aplicações de MIP.

Fonte: *Web of Science*. Dia da pesquisa: 17-10-2011. Palavras-chave: *molecular* and imprint* and polymer**

Embora, atualmente, a aplicação dos MIP referente a alimentos e bebidas represente uma fração menor das publicações, esta vem aumentando mais em comparação às outras aplicações (FIGURA 6). Até o momento, as análises de praguicidas, antibióticos e micotoxinas têm sido as mais amplamente estudadas (TURIEL e MARTÍN-ESTEBAN, 2010).

Para a extração e posterior determinação de paration em amostras de água, Alizadeh et al. (2009) sintetizaram um polímero de impressão molecular, usando ácido meta-acrílico, etilenoglicol dimetacrilato, 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila, clorofórmio e paration como *template*. A etapa de extração foi baseada na MISPE (Extração em fase sólida molecularmente impressa) e a mensuração deste organofosforado se deu por voltametria de onda quadrada.

Nos estudos de Zhu et al. (2005), foi sintetizado um MIP usando monocrotófos como *template*, diclorometano como solvente porogênico e os demais reagentes citados para a pesquisa anterior. Após a polimerização, a técnica de MISPE foi usada para a pré-concentração seletiva de mevinfós, fosfamidon, ometoato e monocrotófos em amostras de solo e água antes da análise cromatográfica (cromatografia gasosa/detector de nitrogênio fósforo). Os resultados obtidos foram comparados com duas técnicas comumente usadas para o preparo de amostras: extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida em cartuchos de fase reversa (ENVI-18). Ao final do processo, estas tiveram uma menor recuperação para os quatro organofosforados analisados (65,8–85,2% e 51,5–82,4%, respectivamente), comparando com a técnica de MISPE, que obteve uma recuperação de 79,3–93,5%. Isto mostra as vantagens que a técnica de impressão molecular apresenta frente às técnicas tradicionais de preparo de amostra.

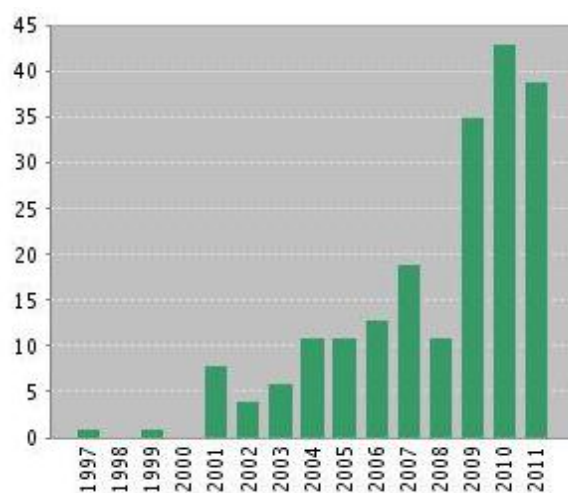


Figura 6. Número de publicações científicas envolvendo a aplicação de MIP para análise de alimentos.

Fonte: *Web of Science*. Dia da pesquisa: 17-10-2011. Palavras-chave: *molecular* and imprint* and polymer* and food**

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A determinação de resíduos de praguicidas desempenha um papel importante para a estimativa da exposição humana e do meio ambiente a esses compostos, permitindo avaliar a conformidade da produção agrícola com as Boas Práticas Agrícolas, possibilitando decisões regulatórias comerciais visando garantir a segurança alimentar.

Foi escolhida a cultura do morango, por esta apresentar destaque na produção e comércio regionais e, com princípios ativos para o estudo, os organofosforados diazinon, dissulfotom, paration, clorpirifós e malation, com base nos relatórios do Programa de Análise de Resíduos em Alimentos (PARA) – ANVISA e, também, nos praguicidas de uso comum aos quais já se haviam relatado exposição em Alfenas e região.

Atualmente, ações governamentais e também do setor privado, estabelecem uma maior importância para a análise de resíduos dessas substâncias, sendo que há uma pressão crescente para o aperfeiçoamento do desempenho analítico, exigindo aumento da eficiência e diminuição do custo e do tempo das análises. Devido às concentrações dos analitos serem geralmente muito baixas e dos mesmos apresentarem propriedades químicas distintas, bem como a complexidade das matrizes, a etapa de preparo de amostra é de fundamental importância em um método analítico desenvolvido para tal finalidade.

Face ao exposto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o desempenho de duas técnicas de preparo de amostra de morango: extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) e extração em fase sólida dispersiva (QuEChERS), visando o isolamento e a concentração de resíduos de organofosforados, para análise por cromatografia gasosa com detector fotométrico de chama.

Para alcançar este objetivo, as seguintes etapas foram seguidas:

- a) Síntese de um MIP, usando dissulfotom como *template*;
- b) Otimização das condições experimentais para a extração simultânea de organofosforados pelas técnicas de MISPE e QuEChERS;

- c) Validação dos métodos constituídos de MISPE e QuEChERS / GC-FPD em relação aos parâmetros: linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, seletividade, recuperação, exatidão e robustez;
- d) Aplicação dos métodos em amostras de morango, sobre as quais fora aplicado o praguicida malation para a avaliação do desempenho das duas técnicas de preparo de amostras.

4 RESULTADOS

Conforme descrito nas normas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, artigo 22, a critério do orientador e do discente, a dissertação poderá ser apresentada sob a forma de 01 (um) volume contendo: uma revisão de literatura, 1 artigo científico (número mínimo), tendo o mestrando como primeiro autor, representativo dos resultados obtidos no desenvolvimento da pesquisa proposta no programa.

No presente trabalho, os resultados estão apresentados a seguir na forma de artigo submetido para publicação na Revista “Food Chemistry”.

APPLICATION OF THE QuEChERS AND MISPE TECHNIQUES TO THE CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF ORGANOPHOSPHATE RESIDUES IN STRAWBERRIES

BALDIM, Isabela Mendes; SOUZA, Marília Cristina de Oliveira; SOUZA, João Carlos Jacinto da Cunha; FIGUEIREDO, Eduardo Costa; MARTINS*, Isarita

* Laboratory of Toxicants and Drug Analysis - LATF, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas - Unifal-MG, Gabriel Monteiro da Silva St. 700, 37130-000 Alfenas, MG, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 35 3299 1342; Fax: +55 35 3299 1067
E-mail address: isarita@unifal-mg.edu.br

APPLICATION OF THE QuEChERS AND MISPE TECHNIQUES TO THE CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF ORGANOPHOSPHATE RESIDUES IN STRAWBERRIES

Abstract

This study describe an analytical method employing gas chromatography (GC) using flame photometric detection (FPD) that has been developed for the simultaneous determination of organophosphate pesticides (diazinon, disulfoton, parathion, chlorpyrifos and malathion) in strawberry samples. For this purpose, the performance of two sample preparation techniques, molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) and dispersive solid phase extraction (QuEChERS), were evaluated. MISPE and QuEChERS were linear in the ranges from 0.10 to 1.00 $\mu\text{g g}^{-1}$, for diazinon, disulfoton, parathion and chlorpyrifos, and 0.10 to 2.00 $\mu\text{g g}^{-1}$ for malathion. Recovery studies yielded average recoveries in the range of 81.64 to 100.00% when the QuEChERS technique was employed. When MISPE was used for sample extraction, the obtained recoveries were in the range of 65.25 to 87.70%. These results showed the potential of each technique for organophosphate residue monitoring in strawberry samples.

Keywords: QuEChERS; MISPE; organophosphate residues; strawberry; GC-FPD.

1 Introduction

Pesticides, especially organophosphates (OPs) (cholinesterase inhibitors), have played a very important role in the development of agriculture and were irreplaceable until now. Although pesticides have been used for a wide variety of applications and played a significant part in the continuous boosting of agricultural production, their hazards to human health have increasingly become the focus of worldwide attention (Kolberg, Prestes, Adaime & Zanella, 2011). Therefore, many countries have established legal directives and monitoring programs to control pesticides used on agricultural crops and to determine whether their residues are compliant with the statutory maximum residue levels (MRLs) (Walorczyk, 2007).

The regulatory and private contract laboratories use many methods for the multiresidue determination of pesticides in agricultural products and animal-derived foods. In addition to being fast, useful methods must also thoroughly extract several dozen or even hundreds of varieties of analytes from complex matrices, achieve high quality results, have excellent robustness for routine use, meet low detection limits and be affordable, simple and safe to perform (Pang, Cao, Zhang, Fan, Liu & Li, 2006; Koesukwiwat, Lehotay, Miao, Leepipatpiboon, 2010).

Over the past few years, many analytical methods have been published for the determination of organophosphate residues in several matrices especially using gas chromatography with detectors selective for elements or group of elements, such as an electron capture detector (ECD) (Chai & Tan, 2009), flame photometric detector (FPD) (Khalili-Zanjani, Yamini, Yazdanfar & Shariat, 2008), nitrogen-phosphorus detector (NPD) (Kumari, Madan & Kathpal, 2006), mass spectrometry (GC-MS) (Kirchner, Huskova, Matisova & Mocak, 2008) or tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) (Bolaños, Moreno, Shtereva, Frenich & Vidal, 2007) and also techniques involving high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (Kmellár et al., 2008).

A significant step forward in reducing the sample processing time was described in 2003: the QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) technique was developed by Anastassiades for pesticides analysis and either omits or replaces many complicated analytical steps commonly employed in

traditional methods with easier ones (Kolberg et al., 2011). The simplicity and developmental ease of this procedure make it very attractive to analytical chemists. Lehotay, Maštovska & Lightfield (2005) modified the original, un-buffered QuEChERS method (Anastassiades, Lehotay, Štajnbaher & Schenck, 2003) using acetate buffering conditions to avoid degrading certain pesticides under basic conditions. Therefore, this method was adopted as the AOAC International Official Method 2007.01 for pesticides analysis (Lehotay, 2007). Many publications have involved the QuEChERS technique for the analysis of pesticides in several matrices using different detection modes. Kolberg et al. (2010) developed a method for determining 24 pesticides in dry samples (wheat, white flour and bran) using GC-MS. Steiniger, Lu, Bulter, Phillips & Fintschenko (2010) studied the determination of 22 pesticides belonging to several classes of regulated chemical pesticides in tea using GC-MS/MS. Hunter, Riederer & Ryan (2010) proposed the determination of OPs and pyrethroid pesticides in different types of foods (i.e., carrots, sweet potatoes and chicken) by GC-ECD. Romero-González, Frenich & Vidal (2008) developed a method for the simultaneous determination of 90 pesticides in fruit juices by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). González-Curbelo, Hernandez-Borges, Ravelo-Perez & Rodriguez-Delgado (2010) developed a method for the simultaneous determination of eight pesticides (seven organophosphates and one thiadiazine) in bananas using the QuEChERS technique with detection by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection (GC-NPD).

Another solid phase recently employed is a molecularly imprinted polymer (MIP), which is a synthetic polymeric material with highly specific recognition properties for a target molecule called the template. These materials have specific binding sites that present complementary sizes, shapes and functional groups to the template and involve an interaction mechanism based on molecular recognition. The specific interactions between the template and the functional groups in the polymeric network are attributed to these binding sites, which mimic those of biological entities, such as antibodies and enzymes (Puoci, Curcio, Cirillo, Iemma, Spizzirri & Picci, 2008; Bravo, Garcinuño, Fernández & Durand, 2009). The synthesis of MIPs involves first complexing a solution of the template with the functional monomers through either non-covalent or covalent interactions followed by polymerising these monomers around the template in the presence of a cross linker and initiator (Pichon

& Chapuis-Hugon, 2008; Jing et al., 2009). Once polymerisation has occurred, the template molecule is extracted, and binding sites with a shape, size and functionality complementary to the target analyte remain. The resulting imprinted polymers are stable, robust and resistant to a wide range of pHs, solvents and temperatures (Turiel & Martín-Esteban, 2010).

Although the application of molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) to food analysis currently represents a small fraction of published papers, its use has increased more rapidly than other MISPE areas; therefore, a high activity in this field is expected in the near future (Turiel & Martín-Esteban, 2010). Until recently, the applications of this technique for the analysis of mycotoxins, antibiotics and especially pesticides have been the most widely studied according to studies by Barros, Martins & Rath (2010) (determination of fenitrothion in tomato samples); Turiel, Tadeo, Cormack & Martín-Esteban (2005) (determination of the thiabendazole in orange, lemon, grape and strawberry samples); Turiel, Martín-Esteban, Fernández, Pérez-Conde & Cámara (2001) (determination of triazines in corn); and Tamayo, Casillas & Martín-Esteban (2003) (determination of fenuron in wheat, barley and carrot samples).

Therefore, as the quality control of strawberries is focused on their physical qualities and the determination of chemical residues (Shin, Ryu, Jung-A, Liu, Nock & Watkins, 2008), the aim of this work was to evaluate the performance of two sample preparation techniques based on molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) and dispersive solid phase extraction (QuEChERS), for the chromatographic determination of organophosphates in this popular fruit (*Fragaria x ananassa* Duch.).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and solutions

Diazinon (O,O-diethyl O-2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl phosphorothioate), disulfoton (O,O-diethyl S-2-ethylthioethyl phosphorodithioate),

parathion (O,O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate), chlorpyrifos (O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate), and malathion (diethyl (dimethoxyphosphinothioylthio) succinate) as well as pirimiphos (O-2-diethylamino-6-methylpyrimidin-4-yl O,O-dimethyl phosphorothioate) as the internal standard (IS) were used as the pesticide analytical standards and purchased from Chem Service (West Chester, USA) at greater than 98.2% purity. Individual stock solutions (1 g L^{-1}) of each compound were prepared by dissolving each compound in ethyl acetate and placing it in an amber vial kept at -4°C . The multicomponent working solutions were prepared by combining the appropriate quantities of the stock solutions and diluting with methanol.

Acetonitrile and ethyl acetate, both HPLC-grade, as well as anhydrous magnesium sulphate were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Methanol, hexane (HPLC-grade) and nitric acid were purchased from Dinamica (Diadema, Brazil). Toluene (pesticide grade) was purchased from Grupo Quimica (Penha, Brazil). Acetic acid was purchased from Furlab (Campinas, Brazil). Phosphoric acid was purchased from Merck (Munich, Germany). Boric acid and sodium acetate were purchased from Labsynth (Diadema, Brazil). Sodium chloride was purchased from Impex (Diadema, Brazil). The primary secondary amine (PSA)-bonded silica was purchased from Varian (São Paulo, Brazil).

Methacrylic acid (MAA), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN), which were the functional monomer, cross-linking reagent and initiator, respectively, were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and employed for the MIP synthesis.

The deionised water used was obtained from a Millipore[®] water purification system (São Paulo, Brazil).

2.2. Apparatus

The GC system consisted of a CS-GC1000[®], equipped with a FPD from Ciola & Gregori Ltda. (São Paulo, Brazil) using IQ₃ Software for data acquisition. Chromatographic analysis was performed on a ZB-35 Phenomenex megabore column (35% phenyl and 65% dimethylsiloxane, 30 m × 0.53 mm i.d.; 0.5 μm film

thickness). Hydrogen was used as the carrier gas. One microliter was manually injected using the splitless mode at an injector temperature of 270°C. The oven temperature was programmed to start at 150°C and ramp at 10°C/min to 175°C, at 0.5°C/min to 180°C, at 20°C/min to 280°C and finally to maintain this temperature for 1 minute. The detector temperature was 240°C, and the total run time was 18.5 min.

2.3. Sample preparation

The strawberry samples were crushed in a mixer for 2 min at high speed and stored in a freezer until the time of the analysis. Organic samples were purchased from local traders and fortified with the multicomponent working standard for the validation studies.

2.3.1 Modified QuEChERS method

Ten grams of the homogenised samples were weighed in a 50 mL centrifuge tube, and both the analytes and IS solution were added. Subsequently, 10 mL of acetonitrile containing 1% acetic acid was added, and the sample was vigorously shaken for 1 min. Then, a buffer-salt mixture consisting of 4 g of anhydrous MgSO_4 and 1 g of sodium acetate was added to induce phase separation and the salting out effect. The mixture was vigorously shaken for 1 min and centrifuged for 6 min at 600 \times g. A clean-up dispersive SPE step was then performed by adding 7 mL of the supernatant to a 10 mL centrifuge tube containing 175 mg of PSA and 1 g of anhydrous MgSO_4 . The tube was closed and immediately shaken using a vortex mixer for 1 min. Next, centrifugation was conducted for 3 min at 1010 \times g, and 5 mL of the supernatant was evaporated to dryness under a nitrogen atmosphere at 40°C. The residue was reconstituted in 100 μL of hexane before injecting 1 μL into the gas-chromatographic system.

2.3.2 Molecularly Imprinted Polymer

2.3.2.1 Polymer preparation

The MIP was prepared via bulk polymerisation according to the non-covalent approach described by Barros *et al.* (2010) with some modifications. Disulfoton (0.5 mmol), MAA (2 mmol), EGDMA (8 mmol) and AIBN (1.2 mmol) as the template, functional monomer, cross-linker and free radical initiator, respectively, were dissolved in toluene (3 mL) in a 75 mL, thick-walled, glass tube. This mixture was homogenised, sonicated, and purged with nitrogen for 10 min. The glass tube was sealed with parafilm under a nitrogen atmosphere, and the polymerisation was conducted in a thermostated water bath at 65°C for 24 h. The monolithic polymer obtained was crushed, ground, and sieved (using a 250-mesh sieve), and 100 mg of the material was packed in a polypropylene cartridge and washed with 12 portions of 5 mL of methanol:nitric acid (9:1 v/v) and 10 mL of methanol to remove the template from the MIP. Finally, the polymer was dried at 45°C and stored at room temperature. A non-imprinted polymer (NIP) was prepared under identical conditions with the exception that there was no template present during the polymerisation process.

2.3.2.2 Adsorption experiments

Assays were performed to obtain the maximum adsorption capacity (MAC) of disulfoton per gram of the MIP and NIP and were conducted at room temperature as described in the “*MISPE procedure for strawberry samples*” section. Disulfoton solutions were prepared (concentrations from 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 100.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in Britton-Robinson buffer at a pH of 9.0 for loading the polymers previously packaged in polypropylene cartridges (10 mg). The amount of analyte adsorbed onto the MIP and NIP (Q_e) was determined from the difference between the initial and equilibrium concentrations (C_e).

Two adsorption isotherm models, Langmuir and Freundlich, were evaluated to describe the adsorbate species distribution in the sorbent. In accordance with the Langmuir isotherm, as more molecules are adsorbed on the adsorbent surface, they are uniformly distributed and form a monolayer covering the entire surface.

The linearised Langmuir equation is represented by $C_e/Q_e = C_e/M + 1/(KM)$, where Q_e is the amount of disulfoton adsorbed at equilibrium (mg g^{-1}), C_e is the equilibrium concentration (mg mL^{-1}), M is the Langmuir constant (which provides for the theoretical adsorption into the monolayer), and K is a constant related to the adsorption energy (Amuda, Giwa & Bello, 2007).

The Freundlich model is already based on the logarithmic distribution of active sites. This model is characteristic of adsorbents where multilayer adsorption occurs (Kalavathy, Karthikeyan, Rajgopal & Miranda, 2005). The adsorption capacity Q_e is given by $\log(Q_e) = \log(K) + \beta \log(C_e)$ or $Q_e = K.C_e^{1/n}$, where K is the Freundlich constant (mg g^{-1}) and $1/n$ is the slope. The Freundlich constant (K) is related to the adsorption capacity, while n is related to the adsorption intensity. Values of n in the range $1 < n < 10$ indicate favourable adsorption (Chagas, 1999).

2.3.2.3 MISPE procedure for strawberry samples

A total of 5 g of homogenised samples was weighed into a 50 mL centrifuge tube and spiked with both the analytes and IS. A 5 mL aliquot of acetonitrile was also added, and the sample was vigorously shaken for 1 min. Subsequently, 2 g of sodium chloride was added. The mixture was vigorously shaken for 1 minute with a vortex and centrifuged ($600 \times g$) for 6 min. The organic phase was separated from the aqueous phase, and the solvent was evaporated to dryness under a gentle nitrogen flow at 40°C . The residue was dissolved in 3 mL of a Britton–Robinson (BR) buffer solution with a pH of 9, and the resultant solution was applied to the previously conditioned MISPE cartridge (100 mg). For this purpose, the MISPE was successively conditioned with 2 mL of methanol and 2 mL of BR buffer at a pH of 9.0. After extraction, the analytes were eluted with 3 mL of methanol. The obtained

extracts were concentrated to dryness at 40°C under a nitrogen flow, and the residue was dissolved in 100 µL of hexane prior to injection into the GC system.

2.4 Validation study

The developed method was validated in accordance with both ICH (2005) and SANCO (2006) recommendations. The linearity and linear range were established using calibration graphs obtained via the sextuplicate analysis of organophosphates at six concentration levels, 0.10, 0.25, 0.40, 0.50, 0.80 and 1.00 µg g⁻¹ (for diazinon, disulfoton, parathion and chlorpyrifos) and 0.10, 0.50, 0.80, 1.00, 1.50 and 2.00 µg g⁻¹ (for malathion), in the strawberry matrix. Pirimiphos was used as the IS at a concentration of 0.25 µg g⁻¹. The selectivity was evaluated by comparing the chromatograms obtained from the spiked blank strawberry samples to those from blank samples to determine the possible presence of interferences that could compromise the organophosphate determination.

Both the intra- and interassay precision, accuracy, and recovery data were determined at low, medium, and high concentrations (0.25, 0.50, 1.00 µg g⁻¹, for diazinon, disulfoton, parathion and chlorpyrifos and 0.50, 1.00, 2.00 µg g⁻¹, for malathion). The intra-assay precision was accomplished by assessing six replicates at each concentration on the same day. The interassay precision was measured over three consecutive days (n=6), and the results were expressed as the per cent relative standard deviation. The accuracy of the method was determined as the per cent recovery.

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were obtained from the analytical curves and calculated from the following expressions: $LOD = 3\sigma/s$ and $LOQ = 10\sigma/s$, where σ is the standard deviation of the response and s is the slope of the analytical curve.

The ruggedness was evaluated using the Youden approach, which is based on a fractional factorial design. Therefore, for the QuEChERS technique, the mobile phase flow, injector temperature, detector temperature, salt amount, shaking time, first and second centrifugation times were evaluated. For the MISPE technique, the

conditions evaluated were the mobile phase flow, injector temperature, detector temperature, salt amount, centrifugation time, buffer loading pH and elution volume.

3. Results and discussion

3.1 Development of QuEChERS technique

As evidenced in the literature (Anastassiades et al., 2003; Rodrigues, Caldas, Furlong, Primel & Zanella, 2011), there are many different permutations to the QuEChERS technique. Some of these variations serve a useful purpose and improve the results or practical efficiency for a given analyte or matrix, whereas others differ only in personal preferences (Lehotay et al., 2010).

In this study, two versions of the QuEChERS technique were compared: the original unbuffered technique (Anastassiades et al., 2003) and the acetate-buffered technique. The strawberry blank samples were spiked with a working standard solution with a concentration of $0.50 \mu\text{g g}^{-1}$ for diazinon, disulfoton, parathion and chlorpyrifos and $1.00 \mu\text{g g}^{-1}$ for malathion. The samples were then subjected to the extraction procedure previously optimised according to the “*Modified QuEChERS method*” section. For the original technique, NaCl rather than sodium acetate was used. The analyte recovery was evaluated to check the techniques' effectiveness.

The recovery values for the analytes by the buffered and unbuffered extraction techniques varied from 88 to 92% and 94 to 107%, respectively. The difference in these values can be explained by the addition of NaCl favouring analyte extraction, which promotes the co-extraction of matrix components and enriches the signal (Anastassiades et al., 2003).

As both techniques generated acceptable recovery values (70 to 120%), the acetate-buffered technique, defined as the AOAC Official Method, was chosen.

Lehotay et al. (2010) conducted a comparison study of the recoveries using 3 different QuEChERS techniques for a diverse range of pesticides (including pH-dependent pesticides, such as chlorothalonil and pymetrozine) in a variety of commodities (apple-blueberry sauce, peas and limes). In all cases, the AOAC

version (acetate-buffered) yielded higher recoveries for the pH-dependent pesticides than the European Committee for Standardisation-CEN (citrate-buffering) version. There was no notable difference between the results from the different methods for all other pesticides. This study achieves results of equally high quality as the Lehotay work for many common pesticides applied to local agriculture without a pH dependence.

The QuEChERS technique does not involve a solvent evaporation step to further concentrate the analytes in the final extract prior to analysis. Instead, the method relies on a large volume injection (LVI) during the GC analysis. However, LVI is more complicated and expensive than a simple splitless injection and can be problematic for the analysis of certain volatile and sensitive analytes. For some pesticides, the use of acetonitrile, which is not ideal for splitless injection in GC due to its large expansion volume during vaporisation due to interfering with the detector selectivity, as the final extract solvent in the QuEChERS technique is of some concern (Lehotay et al., 2005). Therefore, this study used an evaporation step to concentrate the extract prior to GC analysis to obtain adequate recovery levels and detectability for the analytes.

3.2 MISPE

3.2.1 Polymer preparation

The polymer was synthesised in accordance with Barros et al. (2010) via the non-covalent approach using disulfoton as the template, MAA as the functional monomer, EGDMA as the cross-linker and toluene as the porogenic solvent. Non-covalent molecular imprinting is based on the formation of relatively weak non-covalent interactions (i.e., hydrogen bonding and ionic interactions) between the template molecule and selected monomers before polymerisation. This approach is by far the most common for MIP preparation primarily because of its experimental simplicity and the commercial availability of monomers able to interact with almost

any kind of template (Tamayo & Martín-Esteban, 2005). The complementary intermolecular reactions between the template and functional monomers are an essential factor of the subsequent affinity and selectivity of the imprinted polymers (Pichon & Chapuis-Hugon, 2008). Therefore, in accordance with Barros's study, MAA was chosen because of the possibility of hydrogen bonding between the monomer and template. The synthesis was conducted in a solvent with a low polarity and low dielectric constant to reduce the formation of interferences during complexation between the template and monomer.

Structural analysis of the synthesised polymers by scanning electron microscopy, in accordance with Figure 1, demonstrates appreciable morphological differences. The most notable difference is that the MIP surface features are more regular than those of the NIP.

The irregularity of the non-imprinted polymer structure can be explained by the lack of specific sites in the polymer matrix. The existence of these sites in the imprinted polymer explains both its homogeneity and higher analytes adsorption capability (Yao, Li & Qin, 2008).

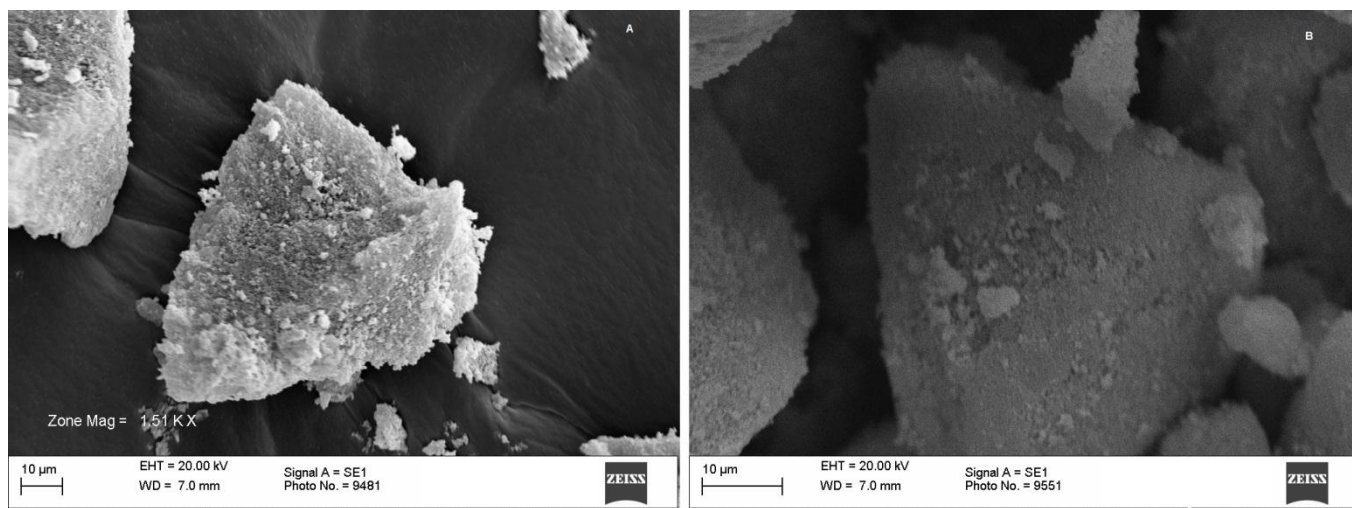


Figure 1. NIP (A) and MIP (B)

3.2.2 Extraction conditions optimization

The MISPE technique, like traditional SPE, requires the following steps: conditioning, loading, washing and elution. Each step must be evaluated as demonstrated below, in accordance with Figure 2.

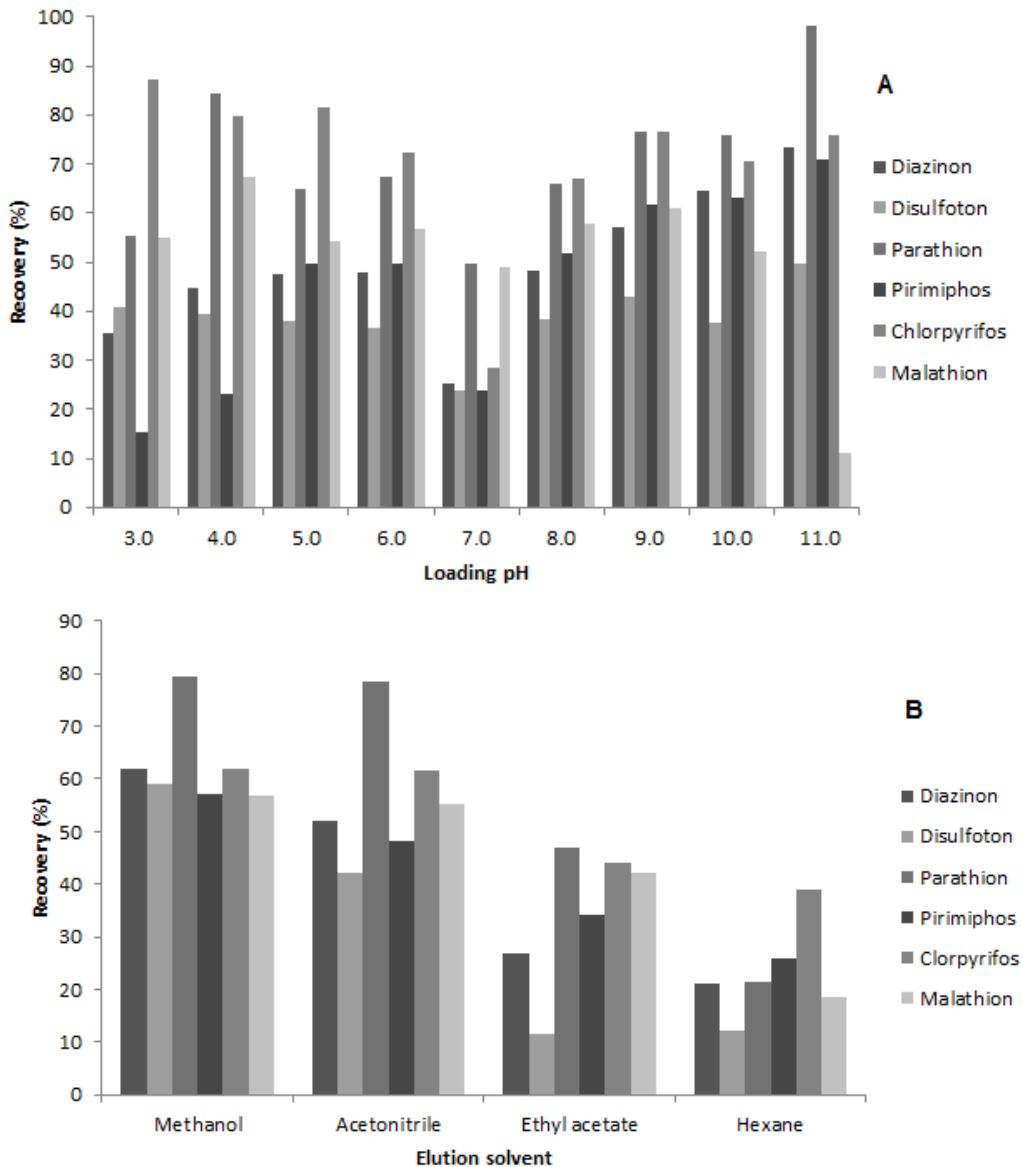


Figure 2. Extraction condition optimisation. pH effect on the sample loading (A) and solvent elution influence (B).

The loading step conditions need to be carefully planned to promote the rebinding of the template in the specific sites. To evaluate the influence of pH on the loading stage, a residue from a strawberry sample pre-treatment was reconstituted in 3 mL of the Britton-Robinson buffer at pH values from 3.0 to 11.0, and the extraction proceeded as described in the “*MISPE procedure for strawberry samples*” section. The per cent recoveries of the analytes after extraction are shown in Figure 2a.

As OPs are molecules that, in most cases, do not suffer ionisation, the effects observed during this experiment were from the salting-out effect being promoted by the ions of the buffer solution at the different pH values. It was observed that the neutral results were lower relative to the other pH values (23 to 49%).

The low malathion recovery at pH 11.0 can be explained by its accelerated breakdown at high pH values (PPDB, 2011). Because it yielded more homogeneous recovery values, a pH of 9.0 was adopted for the subsequent analyses.

Methanol, acetonitrile, ethyl acetate and hexane were appraised as eluents, and the best recoveries (56 to 79%) were obtained using methanol, as shown in Figure 2b.

In accordance with Zhu, Yang, Sua, Cai & Gao (2005), it is well known that the molecular recognition principle of most MIPs is based on hydrogen binding between the target analyte and the polymer functional groups. This hydrogen bonding is significantly weakened by the elution solvent because of the methanol interference.

Conditioning is required to activate the solid phase, which prepares the binding sites for the analyte and removes the remaining molecules from previous extractions. Therefore, methanol and a Britton-Robinson buffer with a pH of 9.0 were chosen as the conditioning solvents.

Finally, it was not necessary to use a washing step, as chromatographic separation and resolution were observed when the eluates were analysed without this step.

3.2.3 Batch adsorption experiments

The advantage of MIP characterisation by the affinity distribution method is that the heterogeneity of these materials is taken into account and a more accurate

description of their binding properties can be obtained. This has the practical benefit of allowing for a more accurate comparison and optimisation of the MIPs (Umpleby II, Baxter, Rampey, Rushton, Chen & Shimizu, 2004).

Figure 3 shows the adsorption equilibrium isotherm of disulfoton for an MIP and NIP as well as the Langmuir and Freundlich adsorption models of disulfoton per gram of MIP.

Figure 3a shows the amount of disulfoton adsorbed by the MIP and NIP at equilibrium (Q_e) by measuring the amount in solution (C_e). As can be observed, the MIP possessed the highest adsorption capability. This affinity was probably because of the molecular recognition-based interactions between the active sites and disulfoton whereas only non-specific interactions occurred between NIP and disulfoton (Yao et al., 2008).

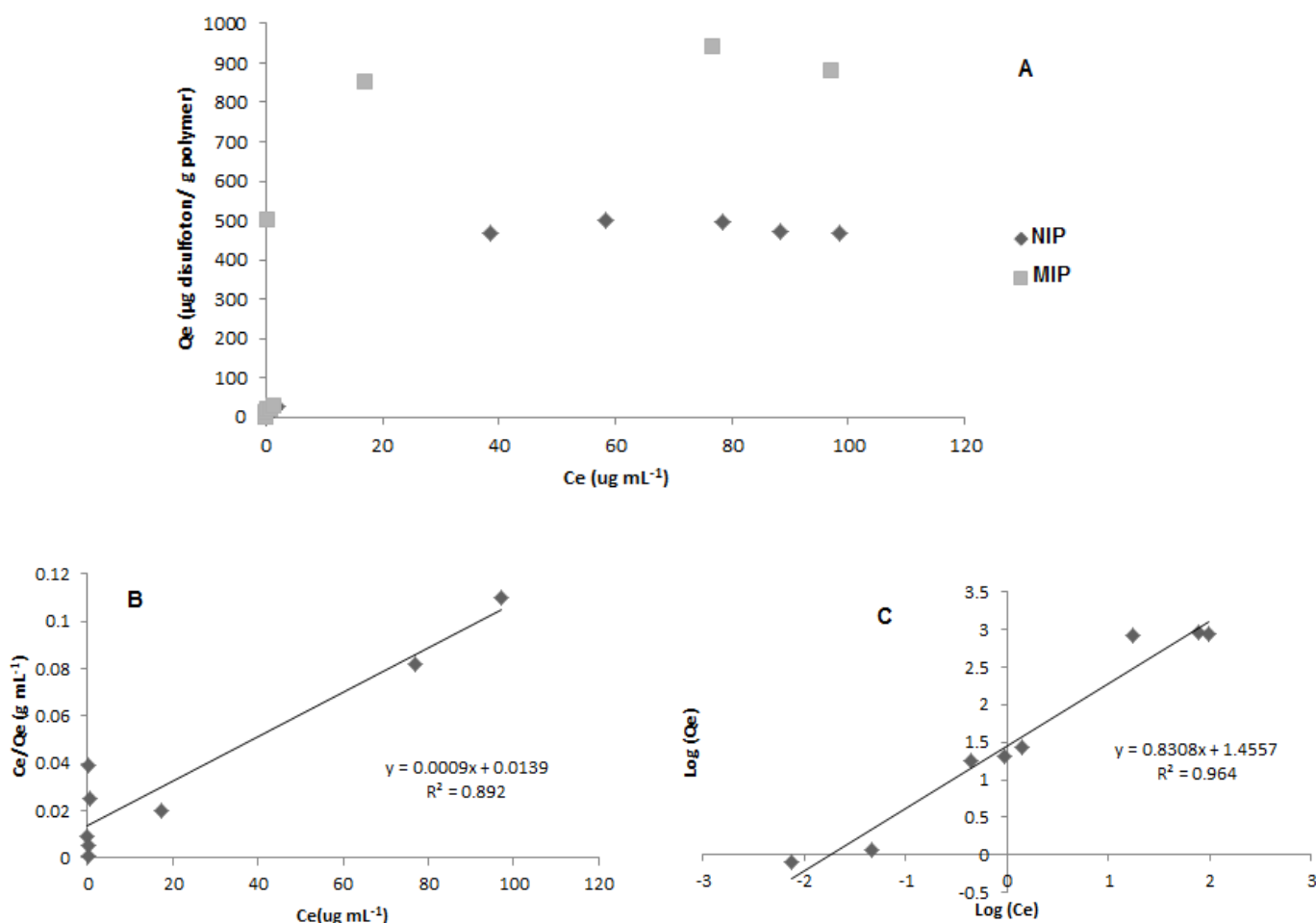


Figure 3. Adsorption equilibrium isotherm of disulfoton for MIP and NIP (A). Langmuir (B) and Freundlich (C) isotherms of the disulfoton adsorption per gram of MIP.

To determine the maximum amount of disulfoton adsorbed per unit surface area of the MIP, the Langmuir and Freundlich isotherm models were appraised in accordance with Figure 3b and Figure 3c.

As shown by the coefficients of determination, the Freundlich model better represented the adsorptive behaviour of the molecules towards the MIP ($R^2 > 0.96$). Through the analysis of this model, it is possible to conclude that the adsorption studied was favourable because the $1/n$ parameter had a value of less than 1 and multilayer absorption occurred.

According to Umpleby II et al. (2004), the Freundlich model is generally applicable to most imprinted polymers formed via a non-covalent approach.

The maximum adsorption capacity calculation was performed by taking the inverse of the slope for the linear equation from the Langmuir model ($1/0.0009$). Therefore, the value was 1.11 mg g^{-1} .

3.3 Validation study

The MISPE- and QuEChERS-based methods were linear over the ranges from 0.10 to $1.00 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ (for diazinon, disulfoton, parathion and chlorpyrifos) and 0.10 to $2.00 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ (for malathion) in the strawberry matrix. These ranges were satisfactory because they were able to quantify the maximum residue limit (MRL) (1.0 mg Kg^{-1} for malathion and 0.5 mg Kg^{-1} for the other analytes) (Brazil, 2011).

The calibration curves (six points) in both a solvent and the matrix were constructed and compared. In accordance with Kméllar et al. (2008), this comparison gave information not only about the linearity and sensitivity but also the matrix effects (signal suppression or enhancement). Therefore, different matrix effects could be observed depending on the per cent decrease or increase in the slope. According to the classifications adopted by the Kméllar study, signal suppressions or enhancements between -20% and 0% or 0% and $+20\%$ were considered to be mild effects; values between -50% and -20% or $+20\%$ and $+50\%$ were considered to be medium effects; and those below -50% or above $+50\%$ were considered to be strong effects. The linear correlation coefficients (r) for the slope, detection limit (LD) and

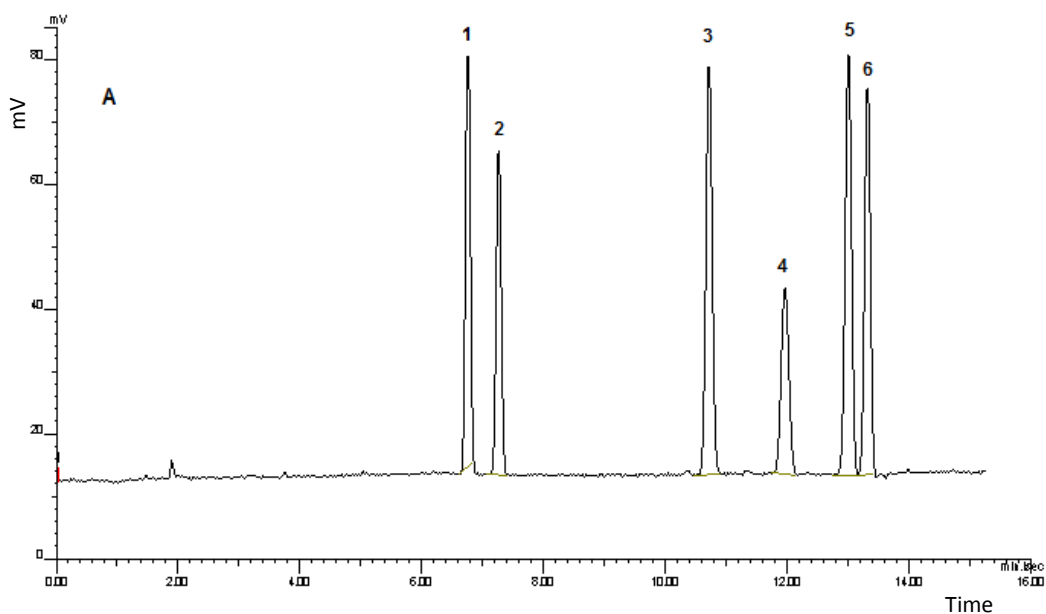
matrix effect expression for each analyte from both methods are summarised in Table 1.

Table 1. Linearity, detection limits and matrix effect.

OP	Solvent		QuEChERS			MISPE			Matrix Effect (%) = (1-(slope matrix/slope solvent))/100	
	Slope	r	Slope	r	LD	Slope	r	LD	QuEChERS	MIP
Diazinon	1.5088	0.997	1.9454	0.993	0.02	1.1101	0.997	0.05	-28.94	26.42
Disulfoton	2.4351	0.999	1.8857	0.990	0.04	1.066	0.999	0.05	22.56	56.20
Parathion	2.0764	0.994	1.5277	0.998	0.04	1.8911	0.999	0.02	26.43	8.92
Chlorpyrifos	1.7439	0.993	1.8826	0.995	0.02	1.5836	0.996	0.02	-7.95	-9.20
Malathion	1.2813	0.997	1.147	0.996	0.05	1.6296	0.994	0.05	10.48	27.20

According to these results, most of the analytes showed a mild or medium matrix effect for both techniques. Therefore, the validation studies should be evaluated using the matrix-matched calibration standards in blank strawberry samples.

The selectivity of these methods was appraised by analysing blank strawberry samples and verifying the elution of interfering compounds near the retention times of the analytes in the chromatograms. Typical chromatograms for a blank and fortified blank strawberry sample (at their MRL levels) are presented in Figure 4.



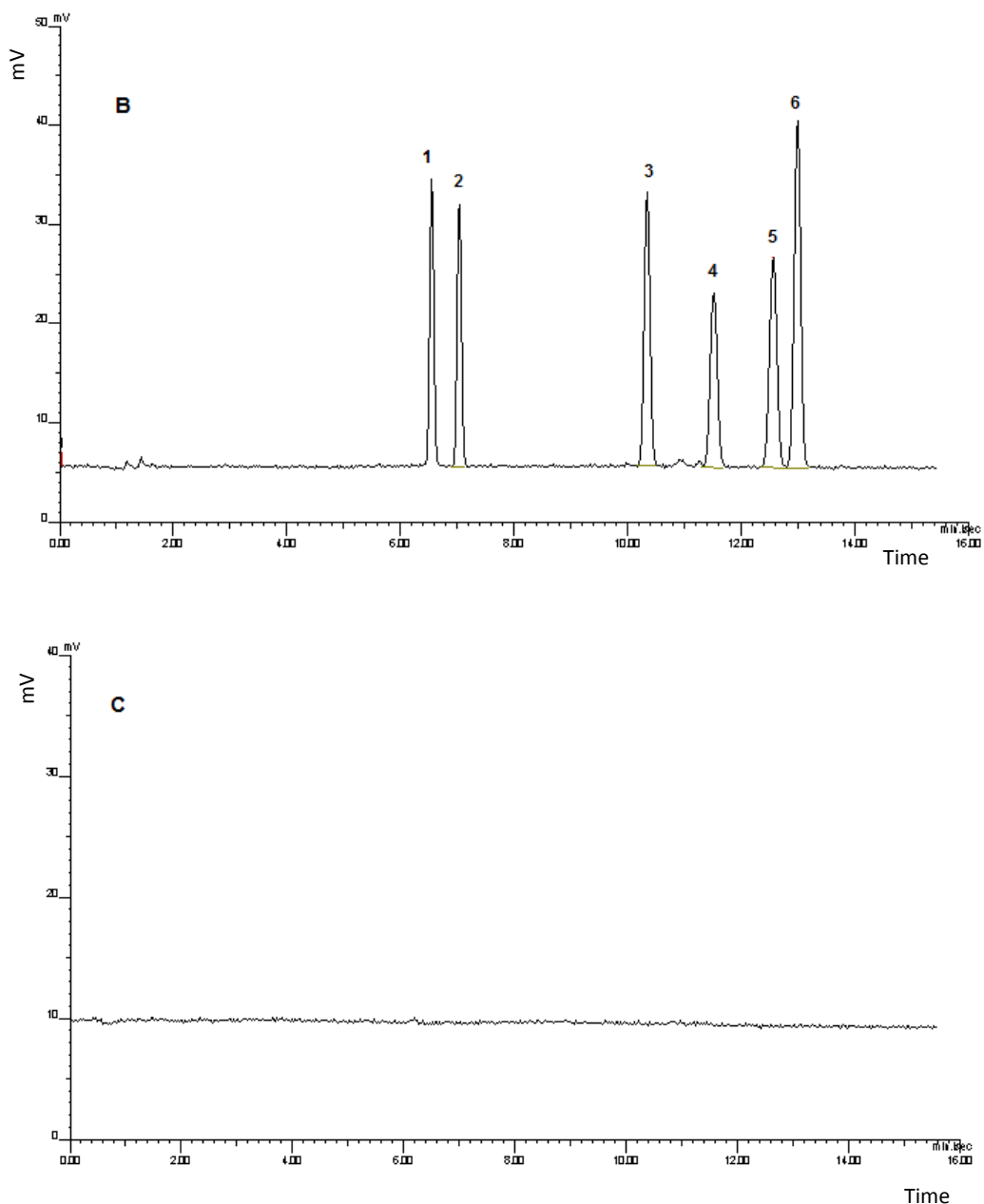


Figure 4. Chromatograms of a fortified blank strawberry after extraction by QuEChERS (A) and MISPE (B) and a blank strawberry sample (C) using the optimised GC-FPD conditions. Diazinon ($0.5 \mu\text{g g}^{-1}$) (1), disulfoton ($0.5 \mu\text{g g}^{-1}$) (2), parathion ($0.5 \mu\text{g g}^{-1}$) (3), pirimiphos ($0.25 \mu\text{g g}^{-1}$) (4), chlorpyrifos ($0.5 \mu\text{g g}^{-1}$) (5) and malathion ($1.0 \mu\text{g g}^{-1}$) (6).

Both the intra- and interassay precision, accuracy and recovery results are summarised in Table 2, and their values are in accordance with the guidelines used for this work. For the MISPE procedure, some analytes possessed recoveries below the acceptable range. Therefore, where the recovery was low but consistent (i.e.,

Table 2. Intra and interassay precision, accuracy and recovery.

OPs	Extraction Procedure							
	QuEChERS				MISPE			
	Intra-assay precision (%RSD)	Interassay precision (%RSD)	Accuracy (% recovery)	Recovery	Intra-assay precision (%RSD)	Interassay precision (%RSD)	Accuracy (% recovery)	Recovery
Diazinon (0.25 µg g ⁻¹)	5.05	10.25	104	87.25	5.10	14.10	108	65.25
Disulfoton (0.25 µg g ⁻¹)	6.65	9.80	112	97.50	8.10	12.95	96	73.00
Parathion (0.25 µg g ⁻¹)	6.90	5.65	112	81.64	7.90	2.75	101	82.30
Chlorpyriphos (0.25 µg g ⁻¹)	5.50	6.60	112	96.25	9.07	7.25	108	78.50
Malathion (0.50 µg g ⁻¹)	3.00	11.75	116	95.40	6.25	7.65	92	67.55
Diazinon (0.50 µg g ⁻¹)	5.55	3.05	92	84.40	5.34	4.05	101	83.55
Disulfoton (0.50 µg g ⁻¹)	9.70	9.70	90	98.45	9.50	9.85	101	80.50
Parathion (0.50 µg g ⁻¹)	1.55	3.60	94	93.78	10.25	1.15	101	74.50
Chlorpyriphos (0.50 µg g ⁻¹)	4.45	2.00	92	100.00	5.20	5.85	94	86.60
Malathion (1.00 µg g ⁻¹)	3.25	6.10	96	92.08	3.35	11.83	98	79.20
Diazinon (1.00 µg g ⁻¹)	5.95	3.15	105	82.20	5.10	3.95	99	87.70
Disulfoton (1.00 µg g ⁻¹)	10.00	8.65	106	85.83	4.70	7.55	101	85.80
Parathion (1.00 µg g ⁻¹)	10.10	4.15	99	99.11	6.20	1.35	101	77.55
Chlorpyriphos (1.00 µg g ⁻¹)	4.80	5.15	103	87.00	4.85	2.15	103	78.75
Malathion (2.00 µg g ⁻¹)	4.10	7.95	99	93.20	2.60	3.95	96	86.95

* RSD: Relative Standard Deviation

demonstrating good precision) and the basis for this exception is well established (e.g., due to pesticide distribution in partition), a mean recovery below 70% may be acceptable (SANCO, 2006).

The ruggedness was evaluated through the Youden approach and indicated that small variations did not affect the methods under the tested conditions because the results did not differ significantly across the evaluated conditions.

To verify the effectiveness of the proposed methods, they were applied to the determination of malathion in real strawberry samples. For this purpose, Malathion 500CE (Dipil[®]) was applied to a strawberry culture, and samples were collected and analysed during the pre-harvest interval of this pesticide (7 days). For both methods, this pesticide was detected in the first 2 days after pesticide application. When using the QuEChERS technique, the results were 1.10 and 0.17 $\mu\text{g g}^{-1}$ for the first and second day, respectively. When MISPE was used as the extraction technique, the results were 1.00 and 0.15 $\mu\text{g g}^{-1}$ for the first and second day, respectively. Therefore, it was possible to prove the effectiveness of both techniques for this purpose.

4 Conclusions

Both techniques demonstrated good analytical performance for the extraction of OPs from strawberry samples. Taking the advantages of each technique into account, the MISPE technique proved to be cheaper and simpler to perform than QuEChERS as it required smaller solvent volumes, very robust because the sorbent synthesised supports extreme pH and temperature conditions, and reusable with a single cartridge performing 50 to 80 extractions. MISPE demonstrated a simplicity and improved adsorption capacity for the analyte over the NIP and is a promising tool for food analysis.

The QuEChERS technique demonstrated potential for the preparation of food samples for pesticide analysis. It has adapted itself perfectly to laboratory conditions and proved to be simple, cheap and effective.

Both techniques proved to be effective for the proposed objective of this study. However, the QuEChERS technique was more advantageous due to being less time

consuming, especially in relation to the clean-up step, which is both simpler and faster when not using a cartridges/vacuum system. This speed enabled the entire experiment to be performed in one analytical run.

In addition, both methods presented good linearity, precision, recovery and accuracy. Therefore, the validated methods are clearly useful for monitoring organophosphate residues in strawberry samples.

Acknowledgement

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Brazil, the Minas Gerais State Research Foundation (Fapemig) (process number CDS-PPM-00055-09), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Capes) and the Federal University of Alfenas (UNIFAL-MG).

References

- Amuda, O. S., Giwa, A. A., Bello, I. (2007). A Removal of heavy metal from industrial wastewater using modified activated coconut shell carbon. *Biochemical Engineering Journal*, 36, 174-181.
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., Schenck, F. J. (2003). 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*, 86, 412-431.
- Barros, L. A. de, Martins, I., Rath, S. (2010). A selective molecularly imprinted polymer-solid phase extraction for the determination of fenitrothion in tomatoes. *Anal Bioanal Chem.* ,397, 1355–136.
- Bolaños, P. P., Moreno, J. L. F., Shtereva, D. D., Frenich, A. G., Vidal, J. L. M. (2007). Development and validation of a multiresidue method for the analysis of 151 pesticide residues in strawberry by gas chromatography coupled to a triple quadrupole mass analyzer. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 21, 2282-2294.
- Bravo, J.C., Garcinuño, R.M., Fernández, P.; Durand, J.S. (2009). Selective solid-phase extraction of ethynylestradiol from river water by molecularly imprinted polymer microcolumns. *Anal Bioanal Chem*, 393, 1763-1768.
- Brazil. (2011). Ministry of Helth: Program of Analysis of Pesticide Residues in Food. Brasilia, DF.
- Chagas, A. P. (1999). *Termodinâmica química*. Campinas, SP, Editora da Unicamp.
- Chai, M. K., Tan, G.H. (2009). Validation of a headspace solid-phase microextraction procedure with gas chromatography-electron capture detection of pesticide residues in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 117, 561–567.
- Gonzalez-Curbelo, M. A., Hernandez-Borges, J., Ravelo-Perez, L. M., Rodriguez-Delgado, M. A. (2011). Insecticides extraction from banana leaves using a modified QuEChERS method. *Food Chemistry*, 125, 1083–1090.

Hunter, R. E., Riederer, A. M., Ryan, P. B. (2010). Method for the Determination of Organophosphorus and Pyrethroid Pesticides in Food via Gas Chromatography with Electron-Capture Detection. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 1396–1402.

ICH (2005). International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1).

Jing, T., Gao, X.D., Wang, P., Wang, Y., Lin, Y.F., Hu, X.Z., Hao, Q.L., Zhou, Y.K., Mei, S.R., (2009). Determination of trace tetracycline antibiotics in foodstuffs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry coupled with selective molecular-imprinted Solid-phase extraction. *Anal. Bioanal. Chem.*, 393: 2009–2018.

Kalavathy, M.H., Karthikeyan, T., Rajgopal, S., Miranda, L. R. (2005). Kinetic and isotherm studies of Cu (II) adsorption onto H₃PO₄-activated rubber wood sawdust. *Journal of Colloid and Interface Science*, 292, 354-62.

Khalili-Zanjani, M. R.; Yamini, Y.; Yazdanfar, N.; Shariat, S. (2008). Extraction and determination of organophosphorus pesticides in water samples by a new liquid phase microextraction–gas chromatography–flame photometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 606, 202–208.

Kirchner, M., Huskova, R., Matisova, E.; Mocak, J. (2008). Fast gas chromatography for pesticide residues analysis using analyte protectants. *Journal of Chromatography A*, 1186, 271–280.

Kmellar, B., Fodor, P., Pareja, L., Ferrer, C., Martinez-Uroz, M.A., Valverde, A., Fernandez-Alba, A.R. (2008). Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1215, 37–50.

Koesukwiwat, U., Lehotay, S. J., Miao, S., Leepipatpiboon, N. (2010). High throughput analysis of 150 pesticides in fruits and vegetables using QuEChERS and low-pressure gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 6692–6703.

Kolberg, D. I., Prestes, O. D., Adaime, M. B., Zanella, R. (2011). 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*, 125, 1436–1442.

- Kumari, B., Madan, V. K., Kathpal, T. S. (2006). Monitoring of pesticide residues in fruits. *Environmental Monitoring and Assessment*, 123, 407–412.
- Lehotay, S. J. (2007). Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 90, 485-520.
- Lehotay, S. J., Maštovska, K., Lightfield, A. R. (2005). Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of AOAC International*, 88, 615-629.
- Lehotay, S. J., Son, K. A., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., Hoh, E., Leepipatpiboon, N. (2010). Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2548–2560.
- Pang, G. F., Cao, Y. Z., Zhang, J. J., Fan, C. L., Liu, Y. M.; Li, X. M., et al. (2006). Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography cleanup/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1125, 1-30.
- Paschoal, J. A. R.; Rath, S.; Airoidi, F. P. S.; Reyes, F. G. R. (2008). Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*, 31 (5), 1190-1198.
- Pichon, V., Chapuis-Hugon, F. (2008). Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants - A review. *Anal. Chem. Acta*, 622, 48-61.
- Puoci, F., Curcio, M., Cirillo, G., Iemma, F., Spizzirri, U.G., Picci, N. (2008). Molecularly imprinted solid-phase extraction for cholesterol determination in cheese products. *Food Chemistry*, 106, 836-842.
- Rodrigues, S. A.; Caldas, S. S.; Furlong, E. B.; Primel, E. G.; Zanella, R. (2011). Otimização e validação de método empregando QuEChERS modificado e LC-ESI-

- MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola. *Química Nova*, 34 (5), 780-786.
- Romero-González, R., Frenich, A. G., Vidal, J. L. M. (2008). Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, 76, 211–225.
- SANCO (2006). Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document no. SANCO/10232/2006. *Directorate general health and consumer protection* (pp. 1-35), Brussels.
- Shin, Y., Ryu, Jung-A., Liu, R. H., Nock, J. F., Watkins, C. B. (2008). Harvest maturity, storage temperature and relative humidity affect fruit quality, antioxidant contents and activity, and inhibition of cell proliferation of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 201–209.
- Steiniger, D., Lu, G., Butler, J., Phillips, E., Fintschenko, Y. (2010). Determination of Multiresidue Pesticides in Green Tea by Using a Modified QuEChERS Extraction and Ion-Trap Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International*, 93 (4), 1169-1179.
- Tamayo, F. G., Turiel, E., Martín-Esteban, A. (2007). Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. *Journal of Chromatography A*, 1152, 32–40.
- Tamayo, F. G., Martín-Esteban, A. (2005). Selective high performance liquid chromatography imprinted-stationary phases for the screening of phenylurea herbicides in vegetable samples. *Journal of Chromatography A*, 1098, 116–122.
- Tamayo, F.G., Casillas, J.L., Martín-Esteban, A. (2003). Highly selective fenuron-imprinted polymer with a homogeneous binding site distribution prepared by precipitation polymerization and its application to the clean-up of fenuron in plant samples. *Anal. Chim. Acta*, 482, 165-173.
- Turiel, E., Martín-Esteban, A., Fernández, P., Pérez-Conde, C., Cámara, C. (2001). Molecular Recognition in a Propazine-imprinted Polymer and Its Application to the Determination of Triazines in Environmental Samples. *Anal. Chem.* 73, 5133-5141.

Turiel, E., Tadeo, J. L., Cormack, P. A. G., Martín-Esteban, A. (2005). HPLC imprinted-stationary phase prepared by precipitation polymerisation for the determination of thiabendazole in fruit. *The Analyst*. 130, 1601-1607.

Turiel, E.; Martín-Esteban, A. (2010). Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review. *Analytica Chimica Acta*. 668, 87–99.

Umpleby II, R. J., Baxter, S. C., Rampey, A. M., Rushton, G. T., Chen, Y., Shimizu, K. D. (2004). Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography B*, 804, 141–149.

Walorczyk, S. (2007). Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1165, 200–212.

X. Zhu, Yang, J., Sua, Q. Cai, J., Gao, Y. (2005). Selective solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer for the analysis of polar organophosphorus pesticides in water and soil samples. *Journal of Chromatography A*, 1092, 161–169.

Yao, J., Li, X., Qin, W. (2008). Computational design and synthesis of molecular imprinted polymers with high selectivity for removal of aniline from contaminated water. *Analytica Chimica Acta*, 610 (2), 282-288.

5 CONCLUSÕES

Ao que se propôs este estudo, foi possível avaliar o desempenho das técnicas de preparo de amostras e concluir que:

- A técnica de MISPE revelou um grande potencial para análise de alimentos apresentando baixo custo e simplicidade de execução. O polímero sintetizado foi resistente às condições extremas de pH e temperatura, podendo ser reutilizado em vários ciclos de extração (50 a 80 extrações por cartucho). Além disso, apresentou grande capacidade de adsorção dos analitos em comparação com o polímero não impresso.

- A técnica QuEChERS continuou demonstrando potencial para o preparo de amostras de alimento, adaptando-se perfeitamente às condições do laboratório, provando ser simples e rápida em comparação à primeira, especialmente devido à etapa do *clean up* que não utiliza cartuchos ou sistemas de vácuo, possibilitando que todas as análises sejam feitas em uma só corrida analítica.

Os métodos apresentaram linearidade, precisão, robustez, recuperação adequada e exatidão. A detectabilidade para ambos foi satisfatória, uma vez que compreendeu os valores estabelecidos como Limite Máximo de Resíduos (LMR) para os analitos de acordo com o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimento (PARA) – Anvisa.

Ademais, os resultados obtidos permitiram concluir que ambas as metodologias apresentaram bom desempenho analítico na rotina de extração e determinação de resíduos de organofosforados em amostras de morango.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA. Relatório de atividades de 2010.*

Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia>.

Acesso em 14 dez. 2011.

ALIZADEH, T.; GANJALI, M. R.; NOUROZI, P.; ZARE, M. Multivariate optimization of molecularly imprinted polymer solid-phase extraction applied to parathion determination in different water samples. *Analytica Chimica Acta*. 638, 54–161, 2009.

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*. 86, 412-431, 2003.

AOAC; Official Method 2007.01: Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulphate. *AOAC International*, 2007.

BARROS, L. A. de; MARTINS, I.; RATH, S. A selective molecularly imprinted polymer-solid phase extraction for the determination of fenitrothion in tomatoes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 397, 1355–1361, 2010.

BOLAÑOS, P. P.; MORENO, J. L. F.; SHTEREVA, D. D.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M. Development and validation of a multiresidue method for the analysis of 151 pesticide residues in strawberry by gas chromatography coupled to a triple quadrupole mass analyzer. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 21, 2282-2294, 2007.

BORDIGNON, C. L.; FRANCESCOTTO, V.; NIENOW, A. A.; CALVETE, E.; REGINATTO, F. H. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 29 (1), 183-188, 2009.

BOTISI, H., ECONOMOU, A.; TSIPI, D. Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in processed fruits and vegetables

using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 389, 1685–1695, 2007.

CAMARGO FILHO, W. P. de; CAMARGO, F. P. de. Análise da produção de morango dos estados de São Paulo e Minas Gerais e do mercado da CEAGESP. *Informações Econômicas*. São Paulo, 39 (5), 2009.

CHAI, M. K.; TAN, G.H. Validation of a headspace solid-phase microextraction procedure with gas chromatography-electron capture detection of pesticide residues in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 117, 561–567, 2009.

Codex Alimentarius Commission. *Pesticide Residue in Food and Feed. Codex Pesticides Residues in Food Online Database. Glossary*. Disponível em : <<http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/index.html>>. Acesso em 21 jan. 2012_a.

Codex Alimentarius Commission. *About Codex*. Disponível em: < <http://www.codexalimentarius.org/about-codex/en/>>. Acesso em 21 jan. 2012_b.

Codex Alimentarius Commission. *Scientific basis for Codex work*. Disponível em: < <http://www.codexalimentarius.org/scientific-basis-for-codex/en/>>. Acesso em 21 jan. 2012_c.

CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z.; Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization. *Journal of Chromatography B*. 804, 173-182, 2004.

Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (EMBRAPA). *O mercado de agroquímicos*. XV Encontro Nacional sobre Metodologias e Gestão de Laboratórios da Embrapa & II Simpósio sobre Metodologias de Laboratório de Pesquisa agropecuária, 2010. Disponível em: < <http://www.cpact.embrapa.br/eventos/2010>> Acessado em: 21. Jan. 2012.

FARAJZADEH. M. A.; HATAMI, M. Solid-Phase Micro extraction Gas Chromatography for determination of some organophosphorus pesticides. *Chromatographia*, 59, 259-262, 2004.

FENOL, J.; HELLÍN,P.; MARTÍNEZ,C. M.; MIGUEL,M.; FLORES,P. Multiresidue method for analysis of pesticides in pepper and tomato by gas chromatography with nitrogen–phosphorus detection. *Food Chemistry*, 105, 711–719, 2007.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides*. (2002) Disponível em : < <http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPP/Pesticid/Code/Download/code.pdf>> Acessado em: 21 jan.2012.

FYTIANOS, K.; RAIKOS, N., THEODORIDIS, G., VELINOVA, Z., TSOUKALI H. Solid phase microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in fruits. *Chemosphere*. 65, 2090–2095, 2006.

HE, C., LONG, Y., PAN, J., LI, K., LIU, F. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. *Journal of Biochemical Biophysical Methods*. 70, 133–150, 2007.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). *Comitê Codex Alimentarius do Brasil – CCAB*. Disponível em: < <http://www.inmetro.gov.br/qualidade/comites/ccab.asp#lista>>. Acessado em: 21 jan. 2012.

KHALILI-ZANJANI, M. R.; YAMINIA, Y.; YAZDANFAR, N.; SHARIATI, S. Extraction and determination of organophosphorus pesticides in water samples by a new liquid phase microextraction–gas chromatography–flame photometric detection. *Analytica Chimica Acta*. 606, 202-208, 2008.

KIRCHNER, M.; HÚSKOVÁ, R.; MATISOVÁ, E.; MOCÁK, J. Fast gas chromatography for pesticide residues analysis using analyte protectants. *Journal of Chromatography A*. 1186, 271-280, 2008.

KMELLAR, B.; FODOR, P.; PAREJA, L.; FERRER, C.; MARTINEZ-UROZ, M.A., VALVERDE, A.; FERNANDEZ-ALBA, A.R. Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1215, 37–50, 2008.

KUMARI, B.; MADAN, V. K.; KATHPAL, T. S. Monitoring of pesticide residues in fruits. *Environmental Monitoring and Assessment*. 123, 407–412, 2006.

LAMBROPOULOU, D.A.; ALBANIS, T.A. Headspace solid phase microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in strawberry and cherry juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 3359-3365, 2002.

LEHOTAY, S. J.; KOK, A. de; HIEMSTRA, M.; BODEGRAVEN, P., Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. *Journal of AOAC International*. 88 (2), 595-614, 2005.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; YUN, S. J., Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *Journal of AOAC International*, 88(2), 630-638, 2005.

LOTTI, M. *Critical Reviews in Toxicology*. 21, 465, 1992.

MARONI, M.; COLOSIO, C.; FERIOLI, A.; FAIT, A. Organophosphorus pesticides. *Toxicology*, Oxford, 143, 9-37, 2000.

MASTOVSKA, K.; DORWEILER, K.J.; LEHOTAY, S.J.; WEGSCHEID, J.S.; SZPYLKA, K.A., Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChERS method combined with automated direct sample introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(10), 5959-72, 2010.

OTTO, R. F.; MORAKAMI, R. K.; REGHIN, M. Y.; CAÍRES, E. F. Cultivares de morango de dia neutro: produção em função de doses de nitrogênio durante o verão. *Horticultura Brasileira*. Brasília, 27 (2), 2009.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*. 31 (5), 2008.

PICHON, V. Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*. 1152, 41–53, 2007.

PPDB: Pesticide Properties DataBase. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/index.htm>>. Acessado em: 16 abr. 2011.

PRESTES, O.D.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de praguicidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova*. 32, 1620-1634, 2009.

RODRIGUES, S. A.; CALDAS, S. S.; FURLONG, E. B.; PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R. Otimização e validação de método empregando QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola. *Química Nova*, 34 (5), 780-786, 2011.

SANTOS, V. M. R. dos; DONNICI, C. L.; DACOSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Química Nova*, 30 (1), 159-170, 2007.

SCHENCK, F.; WONG, J.; LU, C.; LI, J.; HOLCOMB, J. R.; MITCHELL, L. M. Multiresidue Analysis of 102 Organophosphorus Pesticides in Produce at Parts-per-Billion Levels Using a Modified QuEChERS Method and Gas Chromatography with Pulsed Flame Photometric Detection. *Journal of AOAC International*. 92 (2), 561-573, 2009.

SILVER, A. *The biology of cholinesterase*, Elsevier: Amsterdam, Oxford, 1974.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: Preparo e aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) em técnicas de extração e separação. *Química Nova*. 28, 1076, 2005.

TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A., Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review. *Analytica Chimica Acta*, 668, 87–99, 2010.

WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M., Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS Methodology. *Food Chemistry*. 125, 803–812, 2011.

WULFF, G.; SARHAN, A., The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates. *Angewandte Chemie- International Edition In English*. 11 (4), 341, 1972.

ZAMBONIN, C. G.; QUINTO, M.; VIETRO, N. De; PALMISANO, F. Solid-phase microextraction – gas chromatography mass spectrometry: A fast and simple screening method for the assessment of organophosphorus pesticides residues in wine and fruit juices. *Food Chemistry*. 86, 269–274, 2004.

ZHU, X.; YANG, J.; SU, Q.; CAI, J.; GAO, Y. Selective solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer for the analysis of polar organophosphorus pesticides in water and soil samples. *Journal of Chromatography A*. 1092, 161–169, 2005.