



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Ana Paula Fernandes Prochnow

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS  
EM BANANA EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS  
MODIFICADO E UHPLC-MS/MS**

Santa Maria, RS

2022

Ana Paula Fernandes Prochnow

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM BANANA  
EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, RS

2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

PROCHNOW , ANA PAULA FERNANDES  
DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM BANANA  
EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS / ANA  
PAULA FERNANDES PROCHNOW .- 2022.  
84 p.; 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Química, RS, 2022

1. Determinação multirresíduos de pesticidas em banana  
2. QuEChERS 3. UHPLC-MS/MS I. Zanella, Prof. Dr. Renato  
II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

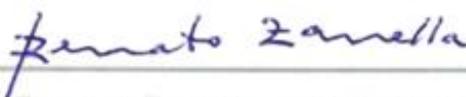
Declaro, ANA PAULA FERNANDES PROCHNOW , para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Ana Paula Fernandes Prochnow

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM BANANA  
EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Química**.

**Aprovada em:**



---

Prof. Dr. Renato Zanella, UFSM (Orientador)



---

Profa. Dra. Magali Kemmerich, UNIPAMPA



---

Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago, URI

Santa Maria, RS

2022

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de realizar o mestrado, e principalmente por ter me dado força para seguir em frente cada vez que pensei em desistir. Por ter acalmado meu coração em vários momentos de angústia, tristeza, medo e nas muitas vezes que desacreditei de mim. Essa conquista é para Ele. Obrigada meu Pai.

Agradeço imensamente também a minha família, a qual desde sempre me apoiou na vida acadêmica. Em especial ao meu marido Julio, que me ajudou a facilitar esse caminho. Aos meus pais que sempre torceram por mim e me incentivaram a buscar cada vez mais o conhecimento. Obrigada pela compreensão do cansaço, ausência, falta de paciência e tempo. Essa conquista também é para vocês, meus maiores presentes da vida. Agradeço aos demais familiares, amigos e minha madrinha Rose, os quais sempre me apoiaram e encorajaram-me a seguir em frente. Amo vocês!

Agradeço a todos os colegas que compartilhei momentos incríveis no LARP. Em especial a Luana, que nunca mediu esforços para me ensinar e ajudar e a Dani, quem sempre foi muito prestativa. Vocês deixaram esse caminho mais leve. Agradeço também a Cleusa pela amizade sincera, ajuda e carinho de sempre. A Julia por se disponibilizar em me auxiliar no equipamento, a Karine e a Karolaine por suas dicas e sugestões. Meu agradecimento mais que especial, único para a minha amiga, colega e companheira de moradia Franciele. Obrigada por dividir esse momento comigo, sei que sem você cada choro, alegria, sofrimento e conquistas não seriam os mesmos. Obrigada a todos, vocês fazem parte dessa conquista.

Agradeço também a incansável orientação do Professor Renato, o qual estava sempre disposto a me ajudar e ensinar. Ao professor Osmar que sempre contribuiu com seus aprendizados e auxiliou nessa trajetória.

À UFSM e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) pelo ensino gratuito e de qualidade, o qual foi de suma importância para a minha formação acadêmica. Agradeço aos funcionários do PPGQ, Ademir e Miguel, sempre prestativos e atenciosos na realização de suas tarefas.

Agradeço ao CNPq por fornecer a bolsa acadêmica a qual foi crucial para a realização desse mestrado.

GRATIDÃO a todos!

## RESUMO

### DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM BANANA EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS

**AUTORA:** Ana Paula Fernandes Prochnow

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Renato Zanella

Nos últimos anos foi possível observar que o uso de agrotóxicos em diversas culturas aumentou de forma alarmante e, na maioria das vezes, vem somado a uma prática inadequada de uso, bem como descartes indevidos. A banana, uma das frutas mais produzidas e consumidas no mundo, não é exceção, tornando a fruta um alvo para a presença desses resíduos. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um método de preparo de amostra rápido e eficiente para a determinação de resíduos de agrotóxicos em banana empregando cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS). Inicialmente foram testadas as três variações do método QuEChERS para extração/partição dos analitos. Após a escolha do método QuEChERS citrato foram testados vários sorventes para limpeza do extrato por extração em fase sólida dispersiva. O sorvente Oasis HLB<sup>®</sup> apresentou a maior eficiência de resultados, a quantidade estabelecida do sorvente e sulfato de magnésio para a etapa de limpeza foi escolhida através de experimento de comparação de proporção entre os dois. O método proposto foi validado para a determinação de 82 agrotóxicos para a matriz banana, os quais apresentaram recuperações de 70 a 118%, RSD  $\leq$ 20% e limites de quantificação do método entre 5 e 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . A técnica de UHPLC-MS/MS proporcionou alta seletividade e sensibilidade, e o preparo de amostra empregando QuEChERS modificado é rápido e eficiente. O método foi aplicado com sucesso para a análise de amostras de banana e quatro pesticidas foram encontrados, incluindo agrotóxicos não permitidos no Brasil para banana.

Palavras chave: banana, agrotóxicos, QuEChERS, UHPLC-MS/MS

## **ABSTRACT**

### **MULTIRESIDE DETERMINATION OF PESTICIDES IN BANANA USING MODIFIED QuEChERS METHOD AND UHPLC-MS/MS**

**AUTHOR: Ana Paula Fernandes Prochnow**

**ADVISOR: Prof. Dr. Renato Zanella**

In recent years, it has been possible to observe that the use of pesticides in various cultures has increased alarmingly and, in most cases, is added to an inappropriate practice of use, as well as improper disposal. Banana, one of the most produced and consumed fruits in the world, is no exception, making the fruit a target for the presence of these residues. Therefore, the present work aimed to develop a fast and efficient sample preparation method for the determination of pesticide residues in bananas using ultra-high performance liquid chromatography coupled to serial mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Initially, the three variations of the QuEChERS method for extracting/partitioning the analytes were tested. After choosing the QuEChERS citrate method, several sorbents were tested to clean the extract by extraction in a dispersive solid phase. The Oasis HLB<sup>®</sup> sorbent presented the highest efficiency of results, the established amount of the sorbent and magnesium sulfate for the cleaning step was chosen through a test of proportion comparison between the two. The proposed method was validated for the determination of 82 pesticides for the banana matrix, which showed recoveries of 70 to 118%, RSD  $\leq$ 20% and method limits of quantification between 5 and 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . The UHPLC-MS/MS technique provided high selectivity and sensitivity, and sample preparation using modified QuEChERS is fast and efficient. The method was successfully applied to the analysis of banana samples and four pesticides were found, including pesticides not allowed in Brazil for bananas.

Keywords: banana, pesticides, QuEChERS, UHPLC-MS/MS

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Planta e penca da fruta banana .....	16
Figura 2: Toxicidade dos agrotóxicos.....	20
Figura 3: Variações do método QuEChERS. ....	30
Figura 4: Fluxograma do experimento 3.....	42
Figura 5: Cromatograma com os 91 analitos na solvente na concentração de 10 µg L <sup>-1</sup> .....	48
Figura 6: Número de compostos recuperados, com recuperações entre 70 e 120% pelas três versões do QuEChERS .....	51
Figura 7: Coloração dos extratos limpos com diferentes sorventes .....	53
Figura 8: Sorventes mais eficientes na limpeza do extrato .....	53
Figura 9: Comparação de recuperação com diferentes sorventes.....	54
Figura 10: Estrutura do sorvente Oasis HLB® .....	55
Figura 11: Recuperação dos compostos no planejamento fatorial.....	56
Figura 12: Fluxograma do método QuEChERS citrato otimizado .....	59
Figura 13: Quantidade de compostos recuperados empregando o método proposto em quatro níveis de fortificação .....	60
Figura 14: Cromatogramas representativos obtidos no modo SRM por UHPLC-MS/MS para o composto (a) atrazina (10 µg kg <sup>-1</sup> ), (b) extrato branco da matriz e (c) branco reagente. ....	61
Figura 15: Resumo dos resultados do efeito matriz nos compostos validados .....	63
Figura 16: Cromatograma para o composto difenoconazol na amostra A7 sobreposto ao cromatograma de fortificação no nível do LOQ (5 µg kg <sup>-1</sup> ) .....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição centesimal da banana .....	17
Tabela 2: Produção de banana dos estados brasileiros no ano de 2020.....	17
Tabela 3: Classe de ação dos agrotóxicos.....	19
Tabela 4: Agrotóxicos permitidos para a cultura da banana .....	22
Tabela 5: Diferentes métodos de preparo de amostra para determinação de resíduos de agrotóxicos em banana e outras frutas e vegetais. ....	27
Tabela 6: Agrotóxicos analisados .....	36
Tabela 7: Gradiente de fase móvel, utilizado para determinação de agrotóxicos em banana no UHPLC-MS/MS .....	38
Tabela 8: Procedimento dos três métodos QuEChERS.....	40
Tabela 9: Proporção entre o sulfato de magnésio e sorvente .....	43
Tabela 10: Identificação das amostras obtidas em diferentes municípios do RS.....	46
Tabela 11: Agrotóxicos analisados por UHPLC-MS/MS utilizando o modo de ionização ESI+, no modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ), íons precursores e produtos.....	49
Tabela 12: Resultados obtidos na etapa de validação do método QuEChERS para os parâmetros de validação, .....	65
Tabela 13: Resultado, em $\mu\text{g kg}^{-1}$ , das amostras de bananas analisadas utilizando o método QuEChERS citrato otimizado e UHPLC/MS-MS e os valores de LMR, em $\mu\text{g kg}^{-1}$ , para banana. ....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização à pressão atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> )
C18	Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano
CI	Ionização Química, do inglês <i>Chemical Ionization</i>
d-SPE	Extração em fase sólida, do inglês <i>dispersive solid phase extraction</i>
EI	Ionização por elétrons, do inglês <i>Electron Ionization</i>
EMR	<i>Lipid Enhanced MatrixRemoval</i>
ESI	Ionização por Eletronebulização, do inglês <i>Electrospray Ionization</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EU	União Europeia, do inglês <i>European Union</i>
EUA	Estados Unidos da América
FM	Fase móvel
GC	Cromatografia gasosa, do inglês <i>Gas Chromatography</i>
GCB	Carbono grafitizado, do inglês <i>Graphitized Carbon Black</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performace Liquid Chromatography</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LARP	Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês <i>Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry</i>
LMR	Limite Máximo de Resíduo
LOD	Limite de detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>
LODi	Limite de detecção de instrumento, do inglês <i>Limit of Detection of the Instrument</i>
LODm	Limite de Detecção do método, do inglês <i>Limit of Detection of the Method</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>Limit of Quantification</i>
LOQi	Limite de Quantificação do Instrumento, do inglês <i>Limit of Quantification of the Instrument</i>
LOQm	Limite de Quantificação do método, do inglês <i>Limit of Quantification of the Method</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

M.M.	Massa Molecular
m/z	Razão massa/carga
MeCN	Acetonitrila
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas, do inglês <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PC	Padrão de controle
PI	Padrão Interno
PSA	Amina primária secundária, do inglês <i>Primary Secondary Amine</i>
PTFE	Politetrafluoretileno
QuEChERS	Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês <i>Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe</i>
r <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
rpm	Rotação por minuto
RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês, <i>Relative Standard Deviation</i>
RSDpi	Desvio Padrão Relativo pra Precisão Intermediária
RSDr	Desvio Padrão Relativo por Repetitividade
S/R	Sinal/Ruído
SANTE	Guia de Saúde e Proteção do Consumidor, do francês <i>Santé et Protection des Consommateurs</i>
SIM	Monitoramento de Íon selecionado, do inglês <i>Selected Ion Monitoring</i>
SPE	Extração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>
SRM	Monitoramento de Reação Seleccionada, do inglês <i>Selected Reaction Monitoring</i>
TPP	Trifenilfosfato, do inglês <i>triphenylphosphate</i>
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UHPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série, do inglês <i>ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i>
v/v	Volume por volume

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1 Objetivo geral e específicos.....	15
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
2.1 Banana .....	16
2.1.1 Produção de banana no Brasil.....	17
2.2 Agrotóxicos.....	18
2.2.1 Classificação.....	19
2.2.2 Agrotóxicos liberados para a cultura da banana.....	21
2.3 DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS .....	23
2.3.1 Técnicas Cromatográficas para determinação de agrotóxicos .....	23
2.3.2 Preparo de amostras para determinação multirresíduo de agrotóxicos.....	26
2.3.3 Método QuEChERS.....	28
2.4 Validação .....	31
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
3.1 Instrumentação .....	33
3.2 Materiais, Reagentes e Solventes .....	34
3.3 Processamento da amostra .....	35
3.4 Utilização do Padrão Interno (PI) e Padrão de Controle (PC) .....	35
3.5 Preparo das soluções analíticas .....	35
3.6 Sistema UHPLC-MS/MS para a determinação de agrotóxicos em banana....	38
3.6.1 Escolha da fase móvel.....	38
3.6.2 Condições utilizadas no sistema UHPLC-MS/MS.....	39
3.7.1 Avaliação do Método QuEChERS para o Preparo de Amostra Visando a Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Banana .....	39
3.7.2 Modificações na etapa de limpeza no método QuEChERS.....	41
3.7.3 Determinação da massa dos sorventes de limpeza .....	42
3.8 Validação do Método QuEChERS para a Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Banana.....	43
3.8.1 Curva analítica e faixa de trabalho .....	43
3.8.2 Seletividade e linearidade.....	44
3.8.3 LOQ e LOD.....	44

3.8.4 Exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária) .....	44
3.8.5 Efeito matriz.....	45
3.9 Aplicação do Método em Amostras Reais .....	46
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>47</b>
4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM BANANA.....	47
4.2 PREPARO DE AMOSTRA .....	51
4.2.1 Avaliação dos ensaios de extração realizados para a determinação de resíduos de agrotóxicos em banana.....	51
4.2.2 Avaliação de sorventes utilizados na etapa de limpeza do extrato .....	52
4.2.3 Avaliação das proporções dos sorventes de <i>clean-up</i> .....	56
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO OTIMIZADO.....	58
4.3.1 Seletividade .....	60
4.3.2 Linearidade .....	622
4.3.3 Efeito Matriz.....	62
4.3.4 Exatidão e precisão .....	644
4.3.5 Limite de quantificação e detecção.....	644
4.4 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS .....	68
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>6 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS .....</b>	<b>71</b>
<b>7 PROPOSTAS PARA FUTUROS TRABALHOS .....</b>	<b>72</b>
<b>Referências.....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO A: ESTRUTURA DOS COMPOSTOS UTILIZADOS NO TRABALHO.....</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Hoje em dia tornou-se recorrente a utilização de compostos orgânicos, químicos e biológicos, em cultivo de alimentos visando o aumento da produção de alimentos para a população, que podem ser comprometidas por ataques de pragas. Portanto, é necessário realizar um controle dessa aplicação, manejo, descarte de embalagens e seus resíduos nos alimentos, para minimizar riscos à vida humana e dos animais. (PRESTES *et al.*, 2009).

Ao fazer uso desses compostos são necessários vários cuidados para minimizar contaminações em bacias hidrográficas, solo, animais e riscos à saúde humana. A ingestão de alimentos com resíduos de agrotóxicos ou o contato direto com as substâncias pode causar diversos problemas de saúde como disfunções neurológicas e reprodutivas, comprometer o sistema nervoso, cardiovascular e respiratório, reações alérgicas e até mesmo favorecer o desenvolvimento de alguns cânceres (ZANELLA *et al.*, 2015).

Uma forma de minimizar esses riscos é através do controle da utilização dos agrotóxicos e seus resíduos nos alimentos. Para isso, estipulam-se quais agrotóxicos podem ser usados para determinada cultura, bem como seus Limites Máximos de Resíduos (LMRs) permitidos no produto final. No Brasil essa tarefa é de responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Para que a fiscalização da observância dos LMRs ocorra, são necessárias análises dos alimentos para a determinação da quantidade de resíduos presentes. Para tanto, é necessário um preparo de amostra adequado para garantir resultados confiáveis e minimizar as dificuldades durante a análise. Na maioria dos casos, os agrotóxicos encontram-se em concentrações muito baixas e em matrizes complexas para serem determinados diretamente no equipamento. Muitas vezes também é necessária uma etapa de limpeza (*clean-up*) do extrato a fim de minimizar o efeito matriz, através da remoção de interferentes que podem sujar o sistema de análise. (CABRERA *et al.*, 2012).

Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos robustos e seguros para determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos, alcançando bons resultados, seletividade e que permita atingir os limites propostos pela legislação. Atendendo a essas e outras finalidades foi proposto o método QuEChERS (acrônimo

do inglês **Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe**) que teve como objetivo inicial promover a extração de agrotóxicos presentes em frutas e vegetais. Segundo seus autores é um método rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Além da escolha do preparo de amostra mais apropriado para a matriz que se está trabalhando é necessário utilizar um equipamento que seja adequado para a determinação dos compostos de interesse. A área da cromatografia vem avançando muito nos últimos anos, tornando-se cada vez mais moderna gerando resultados cada vez mais satisfatórios, sendo o maior destaque a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*) que possui alta seletividade e sensibilidade para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos de forma rápida e segura, mesmo em baixas concentrações (CALDAS *et al.*, 2011; MAY *et al.*, 2017).

### 1.1 Objetivo geral e específicos

O objetivo principal deste trabalho é o desenvolvimento e validação de um método multirresíduo de agrotóxico em banana, sendo o método de preparo de amostra capaz de extrair a maior quantidade de agrotóxicos possível. Os objetivos específicos são:

- a) Testar qual o melhor método para extração e partição;
- b) Avaliar qual o melhor método QuEChERS (original, acetato ou citrato) para análise da matriz em estudo;
- c) Testar qual o melhor *clean-up* para remoção de coextrativos do extrato;

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Banana

Pertencente à família das *Musaceae*, a banana (*Musa spp*) é originária do Sudoeste da Ásia. A evolução da bananicultura teve início a partir de duas espécies: *Musa acuminata Colla* (AA) e a *Musa balbisiana Colla* (BB) onde seu cultivo foi espalhado pelo mundo, predominando em áreas tropicais. (EMBRAPA, 2012).

Esta fruta possui corpo alongado e curvado, com sua polpa de coloração branco-amarelada e textura pastosa com sabor e aroma adocicados. É protegida por uma casca de cor verde que se torna amarela quando está madura. São formadas em cachos no pseudocaule da bananeira, ficando suspensas em formas de pencas com aproximadamente 20 bananas cada (Figura 1). Atualmente existe uma grande variedade de espécies diferentes, que podem ser consumidas *in natura*, receitas, fritas, assadas, congeladas ou como acompanhamento (EMBRAPA, 2004).

Figura 1: Planta e penca da fruta banana



Fonte: Pesquisa de imagens no [www.google.com.br](http://www.google.com.br) , assunto pesquisado: banana.

A banana é um alimento altamente nutritivo, proporcionando muitos benefícios para a saúde, possui baixo custo e fácil acesso para compra, o que a torna uma das frutas mais consumidas no mundo. Possui em sua composição frutose e fibras, é rica em vitaminas (C e B1, B2 e B6) e minerais como potássio, cálcio e ferro. Sua composição (Tabela 1) torna a banana um alimento balanceado e essencial para uma alimentação saudável e equilibrada (MELO, 2012).

Tabela 1: Composição centesimal da banana

<b>Nutriente</b>	<b>Quantidade em 100 g da fruta</b>
Umidade	73,8
Energia	92 kcal
Carboidrato	23,8 g
Proteínas	1,4 g
Gorduras Totais	0,1 g
Fibra Alimentar	1,9 g
Cinzas	0,8 g
Cálcio	3 mg
Magnésio	28 mg
Manganês	0,14 mg
Fósforo	27 mg
Ferro	0,3 mg
Potássio	376 mg
Zinco	0,2 mg
Cobre	0,10 mg
Vitamina C	5,9 mg

Fonte: Taco, 2011.

### 2.1.1 Produção de banana no Brasil

A banana é a segunda fruta mais consumida no mundo, ficando atrás apenas da maçã. Já no Brasil ocupa a primeira posição, sendo São Paulo o maior produtor, responsável por aproximadamente 15% da produção total do país. O cultivo produziu 6.637.308 toneladas, gerando um lucro de 8.638.598 reais no ano de 2020, apresentando um acréscimo de mais de um milhão de reais comparado a 2019. (IBGE, 2020). A Tabela 2 apresenta a produção de banana por estado brasileiro, no ano de 2020.

Tabela 2: Produção de banana dos estados brasileiros no ano de 2020.

<b>ESTADOS</b>	<b>ÁREA COLHIDA (ha)</b>	<b>PRODUÇÃO (t)</b>	(continua)
			<b>RENDIMENTO (t ha<sup>-1</sup>)</b>
São Paulo	48.817	1.000.732	20,50
Minas Gerais	47.909	834.016	17,41
Bahia	64.912	785.061	12,09
Santa Catarina	29.410	669.255	22,76
Pernambuco	44.222	481.962	10,90
Ceará	35.690	431.017	12,08
Espirito Santo	28.737	415.882	14,47
Pará	35.654	407.372	11,43
Goiás	13.894	221.627	15,95

(conclusão)			
<b>ESTADOS</b>	<b>ÁREA COLHIDA (ha)</b>	<b>PRODUÇÃO (t)</b>	<b>RENDIMENTO (t ha<sup>-1</sup>)</b>
Paraná	8.318	197.611	23,76
Rio Grande do Norte	7.803	193.816	24,84
Paraíba	10.706	138.732	12,96
Alagoas	8.812	112.394	12,75
Amazonas	6.346	92.670	14,60
Acre	7.135	88.768	12,44
Rondônia	6.630	83.975	12,67
Rio de Janeiro	9.429	74.940	7,95
Mato Grosso	6.762	72.986	10,79
Rio Grande do Sul	12.154	67.056	5,52
Maranhão	4.216	66.265	15,72
Roraima	6.596	62.239	9,44
Piauí	2.35	53.439	21,08
Tocantins	3.392	30.356	8,95
Sergipe	1.853	25.076	13,53
Amapá	1.772	15.815	9,18
Mato Grosso do Sul	1,176	11.030	9,38
Distrito Federal	174	3.216	18,48
<b>BRASIL</b>	<b>455.004</b>	<b>6.637.308</b>	<b>14,59</b>

Fonte: EMBRAPA - Produção Agrícola, 2020.

Graças às condições climáticas encontradas no Brasil é possível produzir a fruta do norte ao sul do país durante o ano inteiro. A área de plantio chega a ocupar 455.004 hectares, o que o torna o quarto maior produtor de banana no mundo. Dessa produção, 99% destinam-se ao mercado interno, sobrando apenas 1% para exportação (CNA, 2021). Devido à importância do cultivo de bananicultura, tanto nutricional quanto na geração de renda, é comemorado no dia 22 de setembro o dia da banana no Brasil.

Entre as diversas variedades existentes para o cultivo da bananicultura, no Brasil predomina-se o consumo das bananas prata, nanica, maçã e ouro. O brasileiro consome em média 25 kg da fruta per capita/ano (CNA, 2021).

## 2.2 Agrotóxicos

Com a finalidade de garantir a ausência de possíveis pragas e o bom desenvolvimento da bananicultura é comum a utilização de agrotóxicos durante o

cultivo. A legislação brasileira, segundo o decreto nº 4.707, de janeiro de 2002, determinado pela Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, define agrotóxico como:

- a) Produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;
- b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL,2002).

Ainda podemos definir agrotóxicos, segundo o *Codex Alimentarius*, como uma mistura ou substância que tenha como alvo a prevenção, destruição, atração, expulsão ou controle de qualquer praga ou espécie indesejada de plantas ou animais presentes durante os processos envolvidos no plantio, colheita, armazenagem e transporte de alimentos (FAO, 2005). A definição também inclui o uso de aditivos que atuam como reguladores de crescimento, que promovam o amadurecimento ou que impeçam a deterioração do alimento durante a estocagem (FAO, 2005).

### 2.2.1 Classificação

Existem diversas maneiras para classificar os agrotóxicos, das quais se podem destacar: classes de ação para cada praga/doença, toxicidade, composição química e como interagem com o alvo escolhido.

Uma das classificações dos agrotóxicos normalmente utilizada são as classes de ação frente às espécies ou doenças que desejam ser controladas (TSIPI *et al.*, 2015), como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Classe de ação dos agrotóxicos

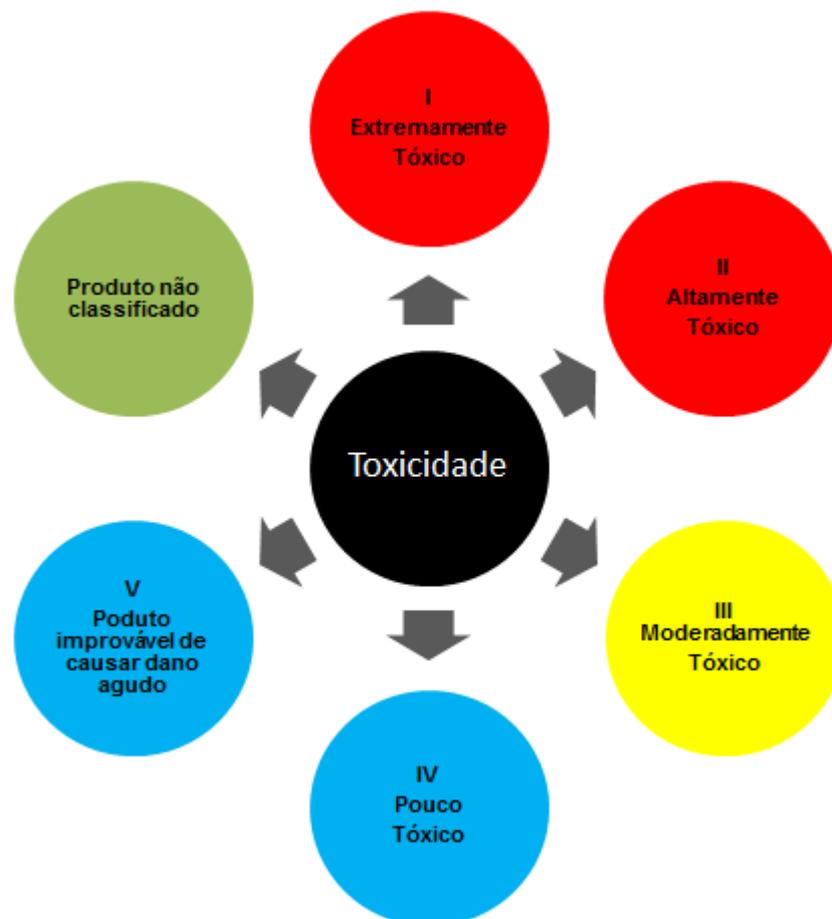
<b>Classe de Agrotóxico</b>	<b>Praga/doença</b>	<b>Exemplo</b>
Acaricida	Ácaros	Mancozebe
Bactericida	Bactérias	Complexos de cobre
Fungicida	Fungos	Bromuconazol
Herbicida	Ervas daninha	Diurom
Inseticida	Insetos	Imidacloprido
Nematicida	Nematoides	Terbufós

Fonte: Adaptada de TSIPI *et al.*, 2015.

Outra classificação importante que deve ser relatada dos agrotóxicos é quanto a sua toxicidade, definida pelo marco regulatório da ANVISA em 29 de julho de 2019

(ANVISA, 2019). Cada categoria e faixa de cor correspondem ao seu grau de risco referente a sua exposição, podendo ocorrer intoxicação por via oral, inalatória e cutânea, como exemplifica na Figura 2.

Figura 2: Toxicidade dos agrotóxicos



Fonte: Adaptado de ANVISA, 2019.

A classificação dos agrotóxicos quanto a sua composição química é dividida inicialmente em dois grandes grupos, naturais e sintéticos. Havendo uma subdivisão no grupo dos sintéticos, em compostos orgânicos e inorgânicos. Os agrotóxicos naturais são constituídos por compostos oriundos de óleos minerais e plantas. Já os orgânicos podem ser classificados normalmente, em quatro grupos: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (YADAV; DEVI, 2017).

O modo de interação dos agrotóxicos com o alvo biológico escolhido pode acontecer das seguintes formas: sistêmica, contato, venenos estomacais, fumegantes e repelentes (YADAV; DEVI, 2017).

Os agrotóxicos propiconazol e flutriafol são exemplos de compostos sistêmico e altamente sistêmico, respectivamente, ou seja, ao entrar em contato com as raízes

ou cutícula das plantas é facilmente absorvido, o que permite translocação pelo sistema vascular do vegetal, agindo de dentro para fora quando houver presença de pragas. Em contrapartida, os agrotóxicos de contato não são capazes de penetrarem nas plantas, atuam através do toque entre a praga alvo e a sua superfície, tendo como exemplo mancozeb e clorotalonil (YADAV; DEVI, 2017).

Outra forma de atuação são os venenos estomacais, que resulta no envenenamento do sistema digestivo da espécie-alvo, causando sua morte, podendo citar malationa. No caso dos compostos que atuam como fumegantes, devido ao vapor produzido ocorre a morte das pragas pelo seu sistema respiratório, podendo ser utilizado o cloropicrina. Existem os repelentes que afastam os alvos indesejados das áreas de cultivo, não causando sua morte (YADAV; DEVI, 2017).

### **2.2.2 Agrotóxicos liberados para a cultura da banana**

A bananicultura como qualquer outra cultura é suscetível à proliferação de pragas que afetam a rentabilidade e a qualidade da produção. A fim de solucionar e prevenir problemas futuros é proposto o uso de agrotóxicos. Porém, há evidências de que o uso de agrotóxicos traz riscos para a saúde e para o meio ambiente, principalmente se utilizados de forma incorreta (PRESTES *et al.*, 2009).

Para que o uso dos agrotóxicos ocorra de forma consciente e sustentável é necessário que haja fiscalização durante a fabricação e aplicação, e ainda fazer o monitoramento desses resíduos nos alimentos e no meio ambiente, bem como limitar quais compostos podem ser utilizados em determinada cultura. No Brasil esse controle deve ser realizado pelos órgãos públicos ANVISA, MAPA e Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA), que atuam no controle, checagem, análises e instruções corretas para uso, manejo e descarte.

A ANVISA estabelece os limites máximos de resíduo permitidos nos alimentos *in natura* para cada agrotóxico permitido em determinada cultura. Para a bananicultura são permitidos a utilização de 37 agrotóxicos, onde cada um possui seu LMR estabelecido. A Tabela 4 apresenta os agrotóxicos permitidos para banana, os respectivos LMRs e a classe agronômica.

Tabela 4: Agrotóxicos permitidos para a cultura da banana

<b>Composto</b>	<b>LMR (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Classe Agrônômica</b>
Ametrina	0,07	Herbicida
Azoxistrobina	15,0	Fungicida
Bifentrina	0,02	Inseticida, formicida e acaricida
Boscalida	0,10	Fungicida
Bromuconazol	0,50	Fungicida
Carbaril	0,20	Inseticida
Clorotalonil	3,0	Fungicida
Clorpirifós	0,01	Inseticida, formicida e acaricida
Cresoxim-metílico	0,01	Fungicida
Dicloreto de paraquate	0,05	Herbicida
Difenoconazol	0,50	Fungicida
Diurum	0,10	Herbicida
Epoconazol	0,10	Fungicida
Fenamifós	0,10	Nematicida
Fenpropimorfe	1,00	Fungicida
Fludioxonil	30,0	Fungicida
Flutriafol	0,20	Fungicida
Fostiazato	0,20	Inseticida e nematicida
Glifosato	0,02	Herbicida
Glufosinato	0,05	Herbicida e regulador de crescimento
Imazalil	1,00	Fungicida
Imidacloprido	0,10	Inseticida
Indaziflam	0,01	Herbicida
Mancozebe	2,00	Fungicida e acaricida
Piraclostrobina	0,50	Fungicida
Pirimetanil	0,10	Fungicida
Propiconazol	0,10	Fungicida
Saflufenacil	0,03	Herbicida
Simazina	0,02	Herbicida
Tebuconazol	0,30	Fungicida
Terbufós	0,05	Inseticida e nematicida
Tetraconazol	0,20	Fungicida
Tiabendazol	6,00	Fungicida
Tiacloprido	0,05	Inseticida
Tiofanato-Metílico	0,50	Fungicida
Triadimenol	0,20	Fungicida
Trifloxistrobina	0,05	Fungicida

Fonte: ANVISA, 2021.

Além dos LMR propostos pela ANVISA existem também os que são definidos pelo Codex Alimentarius, um conjunto de padrões internacionais propostos pela Organização das Nações Unidas (ONU) nos anos 1960, a fim de estabelecer requisitos para garantir a qualidade dos alimentos. Conta com 185 países participantes do qual o Brasil faz parte desde 1968. Existem também os limites estabelecidos pela União Europeia.

## 2.3 DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

### 2.3.1 Técnicas Cromatográficas para determinação de agrotóxicos

A determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos e amostras ambientais é de grande desafio, pois, normalmente apresentam-se em concentrações muito baixas. Além de possuírem matrizes muitas vezes complexas. O que acaba gerando a necessidade de utilizar equipamentos com técnicas cada vez mais avançadas, precisas e seletivas. Atualmente, já existem no mercado sistemas capazes de realizar análises de forma rápida e simultânea, garantindo qualidade e eficiência nos resultados (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007).

A cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*) e a cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*) são técnicas de separação muito utilizadas na química analítica, devido a sua ampla variedade de utilização e por serem capazes de permitir algumas otimizações para melhor performance, destacando-se o uso na determinação de resíduos de agrotóxicos, pois possuem boas especificidade e sensibilidade requeridas (MEIRA, 2015).

Ambas as técnicas citadas a cima possuem boa resolução e eficiência na separação de diversos compostos similares presentes em diferentes tipos de amostras. A GC destaca-se pela sua capacidade de detectar de forma rápida várias substâncias em uma única análise, possuindo uma alta detectabilidade e exatidão, ainda permitindo utilizar pequenos volumes de amostra. Porém, para que ocorra a separação é necessário que os analitos de interesse sejam voláteis e termicamente estáveis (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

A técnica de LC permite uma melhor determinação de agrotóxicos, que em sua grande maioria são polares, o que os torna mais compatíveis com o método de separação, não precisando serem voláteis. Possui alta sensibilidade, excelente resolução com um menor tempo de análise, versatilidade, podendo determinar

compostos orgânico e inorgânicos, iônicos ou covalentes (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). A separação na LC ocorre por meio de pequenas colunas, compostas por uma fase estacionária e uma fase móvel líquida. A polaridade dos compostos define a sua interação com a fase estacionária e móvel, o que determina em qual tempo cada um saíra em cada corrida cromatográfica (COLLINS *et al.*, 2009).

A técnica de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*) possibilita determinar concentrações a nível traço, destacando-se a sua eficiência e seletividade. Essa excelência se deve as colunas cromatográficas de diâmetros reduzidos, chegando a ter dimensões bem menores as tradicionais, com um comprimento entre 5 a 10 cm e diâmetros interno entre 1 e 2 mm. Compostas por partículas de fase estacionária com tamanho  $\leq 2 \mu\text{m}$ , permitem maior velocidade de eluição da fase móvel. A UHPLC destaca-se muito em comparação a LC, pois, os tempos de análise são menores, o uso de fase móvel e volume de amostra injetado são menores, o que reduz consideravelmente a geração de resíduos. Ainda possui melhores respostas quanto a detectabilidade e resolução (Maldaner & Jardim, 2012).

A espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) é uma técnica capaz de identificar e quantificar um ou mais elementos em uma única amostra. A determinação ocorre em razão da massa/carga ( $m/z$ ) de cada composto. Sendo basicamente composta por uma interface, uma fonte de íons, analisador de massas e um detector (LANÇAS, 2013). Durante anos foram realizados estudos para permitir o acoplamento ideal entre um cromatógrafo e um espectrômetro de massas. Tal combinação permite um melhor resultado, onde soma-se as vantagens e benefícios da cromatografia, com as informações estruturais, aumento de seletividade e massas molares geradas pela técnica espectrométrica (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Para que fosse possível ocorrer essa junção de equipamentos, foi necessário desenvolver uma interface capaz de ser compatível com as técnicas, pois, as substâncias precisam estar em sua forma ionizada para serem detectadas. As fontes de ionização mais utilizadas atualmente são ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray ionization*) e ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*) (LANÇAS, 2009).

A fonte ESI gera um *spray* composto do analito dissolvido em fase móvel que saiu da coluna de separação através do uso de uma corrente elétrica. Imediatamente choca-se com um fluxo de gás nitrogênio aquecido, o qual evapora o solvente, restando apenas gotículas que reduzem de tamanho até ocorrer explosão coulombica, gerado os íons dos analitos. Os íons são então conduzidos para o interior do espectrômetro de massas por meio de focalizadores. Normalmente, a fonte ESI é utilizada para a determinação de moléculas com maior polaridade e massa molar (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Já na APCI ocorre a produção de uma espécie química que será responsável pela ionização das substâncias em análise, sendo comumente empregada para moléculas pouco polares e com menor massa molecular (LANÇAS, 2009).

Há diversos tipos de analisadores disponíveis para uso em um espectrômetro, que realizam a separação dos íons baseado em sua razão  $m/z$ . Pode-se destacar como os mais usados: quadrupolo, analisadores em série, tempo de voo e aprisionador de íons. A escolha irá depender da razão massa/carga que precisará ser usada na aplicação das análises, custos e resolução necessária (LANÇAS, 2009).

Analisadores do tipo quadrupolo são muito utilizados, devido a sua robustez e qualidade em análises. São compostos por quatro hastes metálicas, onde uma dupla dessas hastes trabalha com correntes contínuas (DC) e a outra dupla com radiofrequência (Rf), onde cada par age como filtro de massas maiores e outro para filtrar massas menores. Apenas os íons de interesse selecionados passam pelas barras, sem que ocorra choque com as mesmas, e vão em direção ao detector, os demais íons são descartados ao colidirem com as barras por um sistema de vácuo (LANÇAS, 2013; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Os analisadores com triplo quadrupolo apresentam melhor desempenho e fornecem uma melhor identificação dos analitos. São formados por três quadrupolos que atuam em série. No primeiro quadrupolo os íons percursores são selecionados e direcionados para o próximo quarteto de barras. O segundo quadrupolo atua como uma célula de colisão, onde insere-se um gás inerte, normalmente Ar, He ou N<sub>2</sub>, com a função de chocar-se com os íons percursores e fragmentá-los em íons produtos. Ao chegarem ao terceiro quadrupolo, os íons produto são filtrados e direcionados ao detector (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

O acoplamento entre um sistema UHPLC e de espectrometria de massas em série (MS/MS, do inglês *tandem mass spectrometry*) do tipo triplo quadrupolo é

utilizado atualmente para determinação de resíduos de agrotóxico a nível traço em amostras. É capaz de atingir ótima seletividade, resolução e precisão de resultados. Porém, nem sempre é utilizado, devido seu alto custo de investimento e manutenção, tornando-se por vezes inacessível.

### **2.3.2 Preparo de amostras para determinação multirresíduo de agrotóxicos**

A etapa de preparo de amostra é de suma importância para obtenção de resultados confiáveis e satisfatórios ao final de cada análise. Como sabemos, as amostras não apresentam apenas os analitos de interesse, mas também inúmeros outros compostos indesejáveis para a quantificação. No caso de alimentos, gordura, proteínas, carboidratos e pigmentos fazem parte da composição dessas matrizes (FENIK; TANKIEWICZ; BIZIUK, 2011).

Ao realizar uma análise esses compostos indesejáveis são carregados juntos ao equipamento, caso não seja realizada uma etapa de preparo de amostra antes. A presença desses compostos gera diversos problemas tanto aos resultados, quanto ao equipamento. Podemos citar principalmente uma contaminação, entupimento e até mesmo danificação de equipamento devido ao sobre carregamento do mesmo ao ser injetado uma amostra com a presença de coextrativos indesejados. Em relação aos resultados não há uma precisão exata e adequada, pois esses compostos acabam atrapalhando a determinação e quantificação ideal.

Para a determinação de agrotóxicos existem métodos de preparo de amostras que atuam de forma simultânea, extraindo vários compostos em uma única etapa. Inicialmente utilizava-se o método Mills como preparo de amostra, principalmente para extração de compostos organoclorados presentes em amostras não gordurosas, usando como solvente o éter de petróleo e a acetonitrila (PRESTES, ADAIME, ZANELLA, 2011). Como adaptação para o método Mills surgiu o método Storherr, que substituiu o uso do éter de petróleo por diclorometano (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Com o passar dos anos, novas classes de agrotóxicos foram surgindo, em sua grande maioria compostos polares, o que gerou a necessidade de novas técnicas de preparo de amostra para determinação desses analitos. Em 1975 foi desenvolvida a técnica denominada Luke, a qual consistia na extração de 100 g de amostra com 200 mL de acetona. Posteriormente era adicionado éter de petróleo e diclorometano para que ocorresse a partição dos solventes (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Entretanto, os métodos existentes utilizavam elevada quantidade de amostra e solventes, o que tornava o método caro, demorado e ambientalmente insustentável e ainda apresentava baixa eficiência dos resultados (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015). O que levou a busca e desenvolvimento de outras técnicas mais rápidas, eficientes, com melhor custo benefício, menor geração de resíduos e com a capacidade de determinar várias classes de agrotóxicos de forma simultânea (REJCZAK; TUZIMSKI, 2015). Hoje existem diversas técnicas e métodos que possuem essas vantagens sendo elas, extração por fluido supercrítico, microextração em sorvente empacotado, extração e microextração líquido-líquido dispersiva, extração em fase sólida e QuEChERS (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007).

É possível encontrar na literatura os métodos citados a cima para preparo de amostra para determinação de agrotóxicos na matriz banana. Na Tabela 5 estão destacados alguns artigos referentes a cada método.

Tabela 5: Diferentes métodos de preparo de amostra para determinação de resíduos de agrotóxicos em banana e outras frutas e vegetais.

MATRIZ	ANALITOS	EQUIPAMENTO	MÉTODO DE EXTRAÇÃO	LOQ	Referência
Banana	298	UHPLC-MS/MS	QuEChERS acetato	0,0032-0,0241 mg kg <sup>-1</sup>	MENDONÇA, 2019
Banana	11	GC-MS	QuEChERS citrato	0,01 - 0,14 mg kg <sup>-1</sup>	BORGES <i>et al.</i> , 2009
Frutas tropicais (incluindo banana)	5	GC-ECD	MSPD	1,20 - 6,91 µg kg <sup>-1</sup>	FREITAS <i>et al.</i> , 2018
Banana	1	LC-MS/MS	QuEChERS original	0,005 µg kg <sup>-1</sup>	GOPINATHAN <i>et al.</i> , 2018
Frutas e vegetais (incluindo banana)	8	LC-MS/MS	QuEChERS original	30 - 42,3 ng kg <sup>-1</sup>	LI <i>et al.</i> , 2016
Banana	8	LC-MS/MS	Dispersive liquid-liquid micro-extraction (DLLME)	0,096 - 1,30 µg kg <sup>-1</sup>	RAVELO-PÉREZ <i>et al.</i> , 2009

Fonte: Autoria própria

Como se pode observar na Tabela 5, o método QuEChERS é o mais utilizado dentre as opções de preparo de amostra, não apenas para a matriz banana. Além das matrizes apresentadas na Tabela o método também pode ser utilizado para amostra ambientais e diferentes tipos de alimentos, pois é um método que permite modificações para melhorias em sua eficiência. Outra possibilidade é a determinação simultânea de vários compostos, como por exemplo, ao utilizado por Mendonça (2019).

### 2.3.3 Método QuEChERS

A fim de suprir as necessidades e limitações dos métodos já existentes para preparo de amostra Anastassiades e colaboradores desenvolveram, em 2003, um novo modelo de método, denominado QuEChERS (do inglês **Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe**). Como seu próprio nome já sugere, é um método rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro para ser utilizado em rotinas de laboratório que visam deixar a amostra mais adequada para determinação de agrotóxicos (PRESTES *et al.*, 2011).

O método QuEChERS tem como base as etapas de extração, partição e limpeza (*clean-up*). Para realizar a extração são utilizados 10 mL de solvente Acetonitrila para cada 10 g de amostra, e agitados de forma vigorosa. Num segundo momento são adicionados sais para que ocorra a etapa de partição. Esses sais são o sulfato de magnésio e cloreto de sódio, que ao entrarem em contato com a mistura, amostra e solvente, proporcionam o efeito *salting out*, que é capaz de diminuir os compostos polares na fase aquosa. Como a concentração salina começa aumentar com a adição dos sais os compostos são forçados a migrarem para a fase orgânica. O sulfato de magnésio atua também como um secante, removendo o excesso de água no meio. A última etapa é a limpeza do extrato, que ocorre de forma dispersiva com a adição de sulfato de magnésio e PSA no extrato, através da técnica de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid phase extraction*) e tem como função remover coextrativos presentes no extrato, como gorduras, pigmentos e carboidratos (BANDEIRA *et al.*, 2014; ZANELLA *et al.*, 2015; CABRERA *et al.*, 2012). Essa versão original do método QuEChERS apresentou resultados muito satisfatórios, podendo ser utilizado em uma ampla variedade de amostras, para determinação de um ou vários compostos ao mesmo tempo. Entretanto, para alguns compostos não se obtém uma boa recuperação/estabilidade, devido ao pH da matriz, o que gerou a necessidade de desenvolver um método otimizado, específico para atender essas necessidades, sem perder a eficiência do método (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Em 2005, Lehotay e colaboradores propuseram um tamponamento na etapa de extração e partição, definido como QuEChERS acetato, o qual utiliza como solvente extrator acetonitrila com 1%(v/v) de ácido acético, e na etapa de partição é realizada a substituição do cloreto de sódio pelo acetato de sódio (CH<sub>3</sub>COONa). As

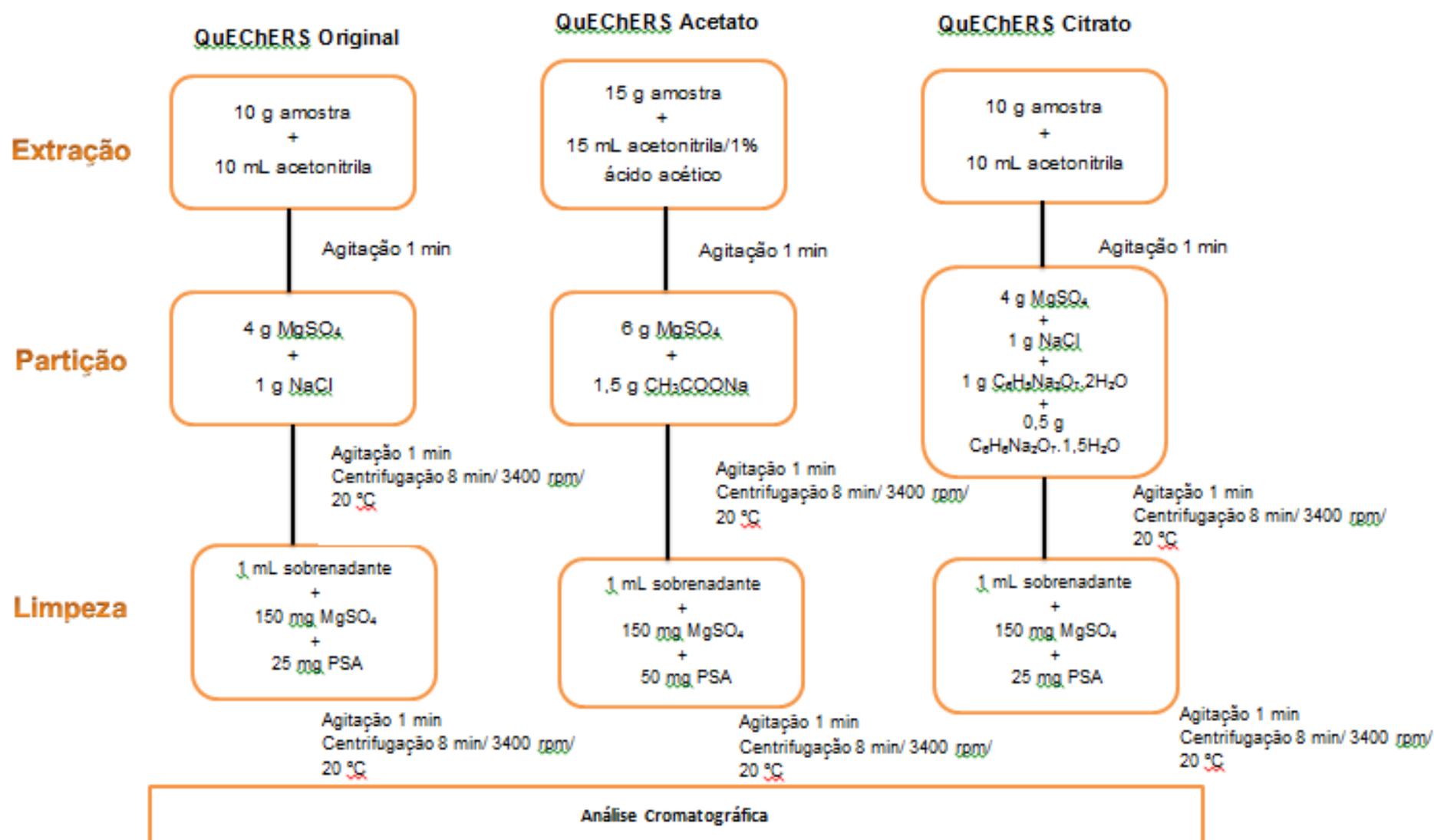
mudanças permitem a formação de um tampão de pH 4,8 durante todo o processo, favorecendo a extração de analitos que antes não conseguiam ser recuperados com o pH da matriz, como é o caso do imazalil, tiabendazol e carbendazim. O método foi tão eficiente que recebeu a contemplação de melhor método para preparo de amostra para determinação de resíduos de agrotóxicos pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) no ano de 2007 (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Em 2007, Anastassiades e colaboradores desenvolveram o QuEChERS citrato, uma nova versão para o método inicialmente criado por eles. A qual na etapa de partição utiliza juntamente como sulfato de magnésio e o cloreto de sódio uma mistura de citrato de sódio diidratado ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ) e hidrogenocitrato sesquihidratado ( $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1,5H_2O$ ) que formam um tampão de pH 5,0-5,5 (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011). Essa variação do QuEChERS também foi muito promissora, sendo reconhecido na União Europeia como método referência pelo *Comité Européen de Normalisation* (CEN) no ano de 2008.

A Figura 3 apresenta de forma detalhada as etapas do método QuEChERS e suas principais modificações, bem como as quantidades de solvente, amostra, sais e sorventes adicionadas em cada uma, assim como o tempo de cada etapa.

Devido a sua grande versatilidade e possibilidade de otimizações o método QuEChERS e suas variações vem sendo a escolha preferida como preparo de amostra para determinação de agrotóxicos. O método permite a mistura de solvente extrator, troca ou adição de sais de partição e mudança e adaptação dos sorventes. Além disso, é aplicável à uma ampla faixa de compostos, sendo muito seletivo e eficiente. Outra vantagem muito significativa é a redução da quantidade de solvente, a eficiência e a rapidez do método.

Figura 3: Variações do método QuEChERS.



Fonte: adaptado de ZANELLA *et al.* (2015).

## 2.4 Validação

Segundo Lanças (2004), a validação pode ser definida como o ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal. Tem como objetivo diminuir fatores que levam a imprecisão e inexatidão de determinado dado. Ainda, de acordo com a ANVISA (2017), a validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos.

A realização do processo de validação para métodos analíticos é de suma importância para garantir que os resultados obtidos sejam confiáveis e para isso são conduzidos comparações, rastreabilidade e verificações. Existem diversos manuais de validação disponíveis, tanto nacionais quanto internacionais. No Brasil podem ser utilizados os guias ofertados pela ANVISA (2003), bem como o do Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2020). Já os internacionais podem ser consultados na União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2005), e SANTE (2021).

Durante a validação de métodos analíticos alguns parâmetros são avaliados. Neste trabalho foram avaliados os itens: seletividade, curva analítica e faixa linear, efeito matriz, limites de detecção e quantificação, exatidão, precisão (repetitividade e precisão intermediária).

A seletividade é a capacidade do método em definir/medir um único analito presente numa mistura, sem sofrer interferência dos outros compostos. É o parâmetro que irá garantir que o pico resposta seja específico do composto de interesse. Caso ela não seja garantida irá comprometer a faixa linear, a exatidão e a precisão do método (RIBANI *et al.*, 2004).

A curva analítica e a faixa linear têm como função demonstrar que os resultados encontrados estão diretamente proporcionais as concentrações do analito, em um determinado intervalo. Este parâmetro pode ser constatado pelo coeficiente de determinação ( $r^2$ ) que é uma evidência de ajuste ideal quando apresenta valores iguais ou superiores a 0,999 (RIBANI *et al.*, 2004). A linearidade é resultante da realização de padronização interna ou externa, onde é formulada em expressão matemática que será utilizada para o cálculo de definição da concentração do analito na amostra (INMETRO, 2011).

O efeito matriz é causado por componentes presentes na amostra que são carregados junto com o extrato como coextrativos, os quais interferem na eficiência

da medição. Causando supressão ou aumento de sinal do sinal analítico (LANÇAS, 2004). Ainda, segundo Krueve e colaboradores (2008) o efeito matriz pode ser devido à má eficiência da ionização, gerada pela presença de outros compostos.

O limite de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) pode ser definido como a menor quantidade que um analito pode ser detectado pelo equipamento, não precisando obrigatoriamente ser quantificado. Já o limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) é definido como a menor concentração de um analito que pode ser determinada, em nível aceitável de segurança (RIBANI *et al.*, 2004). Ambos podem ser calculados por método visual, método relação sinal/ruído, pelo método baseado em parâmetros que utilizam a curva analítica, ensaios de fortificação entre outros. (RIBANI *et al.*, 2004).

A exatidão do método representa o nível de aceitação quanto a concordância entre resultados encontrados e valores aceitos como verdadeiros. Para avaliar a exatidão os processos mais utilizados são: comparação de métodos, ensaios de recuperação, adição de padrões e materiais de referência. Para substâncias em níveis traços a recuperação ideal é entre 70 e 120%, com uma precisão (RSD) de até  $\pm 20\%$ , podendo varia de 50 a 120% para o caso de matrizes muito complexas (RIBANI *et al.*, 2004). Para o *Codex Alimentarius*, na falta de materiais de referência podem ser utilizados ensaios de fortificação e recuperação (PRESTES, 2011).

A precisão é avaliada em termos de RSD e definida como a proximidade entre os resultados encontrados e pode ser expressa por meio de repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade é representada pela concordância entre os resultados encontrados em medições sucessivas utilizando as mesmas condições. A precisão intermediária tem como objetivo verificar em mesmo laboratório, em dias diferentes a obtenção de mesmos resultados (INMETRO, 2011).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). A seguir serão apresentados os materiais, reagentes, preparo de soluções e instrumentação utilizados nos experimentos e validação.

#### 3.1 Instrumentação

Os equipamentos utilizados no trabalho estão listados a seguir:

- Agitador Vortex Genie 2 (Scientific Industries, EUA);
- Agitador Vortex VX-38 (Ion, Brasil);
- Balança analítica de precisão APX-200 (Dever Instrument Company, Brasil);
- Balança analítica de precisão AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- Balança analítica de precisão UX-420H (Shimadzu, Japão);
- Centrífuga (Centribio, Brasil);
- Centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- Centrífuga refrigerada SL 703 (Solab Científica, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha e Eppendorf, Canadá);
- Mixer PMX 700 (Philco, Brasil);
- Sistema de purificação de água, Milli-Q Direct-Q® 3UV (Millipore, França);
- Sistema UHPLC-MS/MS, modelo Xevo TQ (Waters, EUA), contendo amostrador automático sample manager (Acquity), e equipado com:
  - Cromatógrafo líquido modelo Acquity, composto de sistema controlador de solventes (sistema binário de bombas) para operação de gradientes a alta pressão e sistema de injeção com agulha de poliéter-éter-cetona (PEEK) dentro da agulha de aço. Coluna Acquity UPLC® BEH C18 (50 x 2,1 mm d.i.; 1,7 µm) Waters (EUA);
  - Detector MS do tipo triplo quadrupolo, com interface/fonte de ionização por eletronebulização, modelo Xevo TQ;
  - Sistema de aquisição de dados pelo *software* MassLynx 4.1 (Waters, EUA).
  - Gerador de nitrogênio Peak Scientific (Escócia) modelo NM30L-MS.

### 3.2 Materiais, Reagentes e Solventes

- Acetato de sódio anidro p.a. ACS (J.T. Baker, Japão);
- Acetona grau HPLC (Supelco, Alemanha);
- Acetonitrila grau HPLC (Supelco, EUA);
- Ácido acético glacial 100% (J.T. Baker, Japão);
- Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3<sup>®</sup> (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- Atrazina-d5 (Padrão de Controle) (CDN Isotopes, Canadá);
- Carvão Supelclean ENVI-Carb 120-400 μm (Supelco, EUA);
- Extran<sup>®</sup> neutro (Merck, Brasil);
- Filtros de seringa PTFE 13 mm e 0,2 μm (Agilent Technologies, Brasil);
- Frascos de vidro (vial), capacidade de 2 mL (Agilent Technologies, Brasil);
- Gás de colisão: Argônio 99,999% de pureza (Air Products, Brasil);
- Hexano HPLC (Supelco, Alemanha);
- Metanol HPLC Grade gradiente (Supelco, Alemanha);
- Microtubos tipo Eppendorf (2 mL) (Axygen Scientific, EUA);
- Padrões sólidos dos analitos (Tabela 4) (LGC Standards, Alemanha);
- Sorvente Alumina 100-125 mesh (Sigma Aldrich, EUA);
- Sorvente Bondesil C18 (octadecilsilano) com tamanho de partícula de 40 μm (Supelco, EUA);
- Sorvente Bondesil PSA com tamanho de partícula de 40 μm (Supelco, EUA);
- Sorvente carbono grafitizado (GCB) (Supelco, EUA);
- Sorvente Celite<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, Brasil);
- Sorvente Florisil<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, Brasil);
- Sorvente fase fluorada (UNICAMP, Brasil);
- Sorvente Oasis HLB<sup>®</sup> (Waters, Irlanda);
- Sorvente propilamino (Agilent Technologies, EUA);
- Sorvente quitosana (FURG, Brasil);
- Sorvente sílica 50 μm (Sigma-Aldrich, EUA);
- Sorvente Strata-X<sup>®</sup> (Phenomenex, EUA);
- Sorvente terra diatomácea (Sigma Aldrich, EUA);
- Sorvente Supel QuE Z-Sep+ (Sigma Aldrich, EUA)

- Sulfato de magnésio anidro p.a. (J.T. Baker, Japão);
- Tubos de polipropileno, com tampas de rosca, capacidade de 15 e 50 mL (Sarstedt, Alemanha);
- Vidrarias de laboratório.

### **3.3 Processamento da amostra**

A amostra “branco” de banana, a qual não apresentou resíduos de agrotóxicos analisados, foi adquirida em uma propriedade de produção orgânica na cidade de São João do Polêsine - RS. Para o processamento foi utilizado 1 kg de amostra com casca e polpa, retirando apenas o pedúnculo, sendo triturado em mixer até obtenção de uma mistura homogênea, como sugerido pelo Codex. Em seguida, a amostra processada foi armazenada em tubos de polipropileno e mantido sob congelamento à -10 °C até a utilização.

### **3.4 Utilização do Padrão Interno (PI) e Padrão de Controle (PC)**

Para avaliar a eficiência da extração foi utilizado um padrão de controle (PC) nas amostras, sendo escolhida uma solução de atrazina deuturada (atrazina-d5) na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> em acetonitrila. Antes da extração foi adicionado 50 µL de PC na amostra, resultando na concentração de 50 µg L<sup>-1</sup>. Ao final a amostra foi diluída cinco vezes, obtendo-se uma concentração final de atrazina-d5 no equipamento de 10 µg L<sup>-1</sup>. O PC foi utilizado para verificar se a extração e a análise das amostras foram efetuadas de forma adequada.

Além disso, foi utilizado o trifenilfosfato (10 mg L<sup>-1</sup>), como padrão interno, com o objetivo de acompanhar a eficiência de injeção da amostra no equipamento UHPLC-MS/MS e a resposta do mesmo. Foram adicionados 2 µL do trifenilfosfato no vial de injeção, junto com a amostra e o solvente de diluição. A concentração final do PI foi de 20 µg L<sup>-1</sup>.

### **3.5 Preparo das soluções analíticas**

A Tabela 6 lista todos os compostos utilizados ao longo do trabalho, bem como padrão de controle e padrão interno, além de grupo químico e classe agrônômica de cada substância.

Tabela 6: Agrotóxicos analisados

(continua)

Nr	Agrotóxicos	Grupo Químico	Classe Agronômica
1	Abamectina ( <i>Abamectin</i> )	Avermectinas	Acaricida, inseticida
2	Acefato ( <i>Acephate</i> )	Organofosforado	Inseticida
3	Acetaprimido ( <i>Acetaprimid</i> )	Neonicotinóide	Inseticida
4	Ametrina ( <i>Ametryn</i> )	Triazina	Herbicida
5	Atrazina ( <i>Atrazine</i> )	Triazina	Herbicida
6	Atrazina deuterada ( <i>Atrazine d-5</i> ) - PC	-	-
7	Azinfós etílico ( <i>aziphos ethyl</i> )	Organofosforado	Inseticida
8	Azinfós metílico ( <i>Aziphos methyl</i> )	Organofosforado	Inseticida
9	Azoxistrobina ( <i>Azoxystrobin</i> )	Estrobilurina	Fungicida
10	Biteranol ( <i>Bitertanol</i> )	Triazol	Fungicida
11	Boscalida ( <i>Boscalid</i> )	Anilida	Fungicida
12	Bromuconazol ( <i>Bromuconazole</i> )	Triazol	Fungicida
13	Buprofenzina ( <i>Buprofenzin</i> )	Tiadiazinona	Inseticida e acaricida
14	Carbaril ( <i>carbaryl</i> )	Metilcarbamato de naftila	Inseticida
15	Carbendazim ( <i>Carbendazim</i> )	Benzimidazol	Fungicida
16	Carbofurano ( <i>Carbofuran</i> )	Metilcarbamato	Inseticida, acaricida, nematocida
17	Carbofurano-3-OH ( <i>Carbofuran-3-OH</i> )	Carbamato	Inseticida
18	Carboxim ( <i>Carboxym</i> )	Oxatina	Fungicida
19	Cianazina ( <i>Cyanazine</i> )	Triazina	Herbicida
20	Clomazona ( <i>Clomazone</i> )	Isoxazolidinona	Herbicida
21	Clorimurrom etílico ( <i>ethyl chloride</i> )	Sulfonilureia	Herbicida
22	Clorpirifós etílico ( <i>chlorpyrifos ethyl</i> )	Organofosforado	Inseticida, formicida e acaricida
23	Clorpirifós metílico ( <i>chlorpyrifos methyl</i> )	Organofosforado	Acaricida e inseticida
24	Clorprofam ( <i>Chlorpropham</i> )	Carbamato	Herbicida
25	Cresoxim metílico ( <i>Kresoxim methyl</i> )	Estrobilurina	Fungicida
26	Diazinona ( <i>Diazinon</i> )	Organofosforado	Inseticida
27	Difenoconazol ( <i>Difenoconazole</i> )	Triazol	Fungicida
28	Dimetoato ( <i>Dimethoate</i> )	Organofosforado	Inseticida e acaricida
29	Diuron ( <i>Diuron</i> )	Uréia	Herbicida
30	Epoxiconazol ( <i>Epoxiconazole</i> )	Triazol	Fungicida
31	Espinosade ( <i>Spinosad</i> )	Triazol	Inseticida
32	Etefon ( <i>Ethephon</i> )	Etileno	Regulador de crescimento
33	Fempiroximato ( <i>fenpyroximate</i> )	Pirazol	Acaricida
34	Fempropatrina ( <i>Fenpropathrin</i> )	Piretróide	Inseticida e Acaricida
35	Fempropimorfe ( <i>Fenpropimorph</i> )	Morfolina	Fungicida
36	Fenamifós ( <i>Fenamiphos</i> )	Organofosforado	Nematocida
37	Fenarimol ( <i>Fenarimol</i> )	Pirimidinil carbinol	Fungicida
38	Fentiona ( <i>Fenthion</i> )	Organofosforado	Inseticida, formicida e acaricida
39	Fipronil ( <i>fipronil</i> )	Pirazol	Inseticida e Cupinicida
40	Fludioxonil ( <i>Fludioxonil</i> )	Acilalaninato	Fungicida
41	Fluquinconazol ( <i>Fluquinconazole</i> )	Triazol	Fungicida
42	Flutolanil ( <i>Flutolanil</i> )	Carboxamida	Fungicida
43	Flutriafol ( <i>Flutriafol</i> )	Triazol	Fungicida
44	Fluxapiroxade ( <i>Fluxapyrixad</i> )	Carboxamida	Fungicida
45	Fostiazato ( <i>fosthiazate</i> )	Organofosforado	Inseticida e nematocida
46	Hexitriazox ( <i>Hexythiazox</i> )	Tiazolidinacarboxamida	Acaricida

(conclusão)

<b>Nr</b>	<b>Agrotóxicos</b>	<b>Grupo Químico</b>	<b>Classe Agronômica</b>
47	Indoxacarbe ( <i>Indoxacarb</i> )	Oxadiazina	Inseticida
48	Imazalil	Imidazol	Fungicida
49	Imidacloprido ( <i>imidacloprid</i> )	Neotinotínóide	Inseticida
50	Iprovalicarbe ( <i>iprovalicarb</i> )	Carbamato	Fungicida
51	Linurom ( <i>Linuron</i> )	Uréia	Herbicida
52	Melationa ( <i>Melation</i> )	Organofosforado	Acaricida e Inseticida
53	Mecarbam ( <i>Mecarbam</i> )	Organofosforado	Acaricida e inseticida
54	Mepronil ( <i>Mepronil</i> )	Carboxamida	Fungicida
55	Metalaxil ( <i>Metalaxyl</i> )	Acilalaninato	Fungicida
56	Metconazol ( <i>Metconazole</i> )	Itraconazol	Acaricida e Inseticida
57	Metsulfurom metílico ( <i>metsulfuron methyl</i> )	Sulolinuréia	Herbicida
58	Monocrotófos ( <i>Monocrotophos</i> )	Organofosforado	Inseticida
59	Monolinurom ( <i>Monolinurom</i> )	Uréia	Herbicida
60	Ometoato ( <i>Omethoate</i> )	Organofosforado	Inseticida e acaricida
61	Oxamil (Oxamyl)	Carbamato	Acaricida e inseticida
62	Piraclostrobina ( <i>Pyraclostrobin</i> )	Estrobilurina	Fungicida
63	Pirazofós ( <i>Pirazophos</i> )	Fosforotiolato	Fungicida e inseticida
64	Piridabem ( <i>Pyridaben</i> )	Piridazinona	Inseticida e acaricida
65	Piridafentiona ( <i>pyridaphenthion</i> )	Organofosforado	Inseticida e acaricida
66	Pirimetanil ( <i>Pyrimethanil</i> )	Anilino pirimidina	Fungicida
67	Pirimicarbe ( <i>Pirimicarb</i> )	Dimetilcarbamato	Inseticida
68	Pirimifós metílico ( <i>Pirimiphos methyl</i> )	Organofosforado	Inseticida e Acaricida
69	Piriproxifem ( <i>Pyriproxifen</i> )	Éter piridiloxipropílico	Inseticida
70	Propargito ( <i>Propargite</i> )	Sulfito de aquila	Acaricida
71	Propiconazol ( <i>Propiconazole</i> )	Triazol	Fungicida
72	Propizamida ( <i>Propyzamide</i> )	Amidas	Herbicida
73	Propoxur ( <i>Propoxur</i> )	Carbamato	Inseticida
74	Quinoxifem ( <i>Quinoxifen</i> )	Fenoxiquinolona	Fungicida
75	Saflufenacil ( <i>Saflufenacyl</i> )	Pirimidinadiona	Herbicida
76	Simazina ( <i>Simazine</i> )	Triazina	Herbicida
77	Tebuconazol ( <i>Tebuconazole</i> )	Triazol	Fungicida
78	Teflubenzurom ( <i>Teflubenzuron</i> )	Benzoiluréias	Inseticida, regulador crescimento
79	Terbufós ( <i>Terbufos</i> )	Organofosforado	Inseticida e Nematicida
80	Terbutilazina ( <i>Terbuthylazine</i> )	Triazina	Herbicida
81	Tetraconazol ( <i>Tetraconazole</i> )	Triazol	Fungicida
82	Tiabendazol ( <i>Thiabendazole</i> )	Benzimidazol	Fungicida
83	Tiacloprido ( <i>Thiacloprid</i> )	Neonicotinóide	Inseticida
84	Tiametoxam ( <i>Tiamethoxam</i> )	Neonicotinóide	Inseticida
85	Tiodicarbe ( <i>Thiodicarb</i> )	Metilcarbamato de oxima	Inseticida
86	Tiofanato metílico ( <i>Thiophanate methyl</i> )	Benzimidazol	Fungicida
87	Tolclofós metílico ( <i>Tolclofos methyl</i> )	Organofosforado	Fungicida
88	Triadimienol ( <i>Triadimenol</i> )	Triazol	Fungicida
89	Triazofós ( <i>Triazophos</i> )	Organofosforado	Inseticida acaricida e nematicida
90	Trifenilfosfato - PI	-	-
91	Trifloxistrobina ( <i>Trifloxystrobin</i> )	Estrobilurina	Fungicida
92	Vamidationa ( <i>Vamidathione</i> )	Organofosforado	Inseticida

Fonte: Autoria própria

Foram selecionados 90 agrotóxicos de diferentes classes agronômicas para realização do trabalho, além dos padrões PI e PC. Dentre esses estavam a maioria dos agrotóxicos permitidos pela ANVISA para a cultura da bananicultura, bem como, uns comumente utilizados em outras culturas, como o herbicida atrazina e o inseticida fipronil.

A partir dos padrões sólidos dos agrotóxicos são preparadas soluções estoques individuais de 10 mL, calculando sua massa a ser pesada, considerado a pureza de cada composto. Em seguida, foi produzida uma solução em acetonitrila de todos os 90 compostos com concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>. Todos os padrões possuem pureza maior que 95%.

### 3.6 Sistema UHPLC-MS/MS para a determinação de agrotóxicos em banana

O acoplamento entre o sistema cromatográfico e o espectrômetro de massas é a combinação perfeita na determinação de agrotóxicos. Essa junção de técnicas permite o desenvolvimento de métodos mais sensíveis, seletivos e específicos (CALDAS *et al.*, 2011).

#### 3.6.1 Escolha da fase móvel

É essencial a escolha adequada da fase móvel, para que ocorra corretamente o sinal analítico na separação dos analitos. Considerando os compostos de interesse selecionados para esse trabalho utilizou-se a seguinte fase móvel: (A) solução aquosa 2 v/v metanol e (B) metanol, ambas contendo ácido fórmico 0,1% (v/v) e formiato de amônio 5 mmol L<sup>-1</sup>, conforme gradiente descrito na Tabela 7 a seguir. A vazão foi de 0,225 mL min<sup>-1</sup> e o tempo de corrida foi de 10 min.

Tabela 7: Gradiente de fase móvel, utilizado para determinação de agrotóxicos em banana no UHPLC-MS/MS

Tempo (min)	%A	%B
0	95,0	5,0
0,25	95,0	5,0
7,75	0,0	100,0
8,50	0,0	100,0
8,51	95,0	5,0
10,00	95,0	5,0

Fonte: Autora

### 3.6.2 Condições utilizadas no sistema UHPLC-MS/MS

Os parâmetros utilizados no UHPLC-MS/MS foram previamente otimizados no LARP-UFSM. As condições utilizadas para a otimização do método e análise de agrotóxicos em amostras de banana foram as seguintes:

- Temperatura da coluna: 40 °C;
- Temperatura da fonte: 150 °C;
- Temperatura de dessolvatação: 500 °C;
- Tempo de aquisição (*dwell time*): 0,01 s;
- Vazão do gás de colisão: 0,15 mL min<sup>-1</sup>;
- Vazão do gás de dessolvatação (N<sub>2</sub>): 600 L h<sup>-1</sup>;
- Vazão do gás do cone (N<sub>2</sub>): 80 L h<sup>-1</sup>;
- Volume de injeção: 10 µL;
- Voltagem capilar: 2,0 kV.

O software MassLynx 4.1 foi utilizado para aquisição de dados e controle do sistema. Os íons característicos de cada composto de interesse foram monitorados nos quadrupolos Q1, para o íon precursor, e Q3, onde foi realizada a varredura de dois íons produto, variando as energias de colisão para que ocorresse uma otimização garantindo melhor detecção. As transições foram analisadas no modo de aquisição Monitoramento de Reação Seleccionada (SRM, do inglês *Selected Reaction Monitoring*) onde a transição utilizada para quantificação foi a de maior intensidade e para a identificação foi utilizada a transição com segunda maior intensidade dos compostos estudados.

### 3.7.1 Avaliação do Método QuEChERS para o Preparo de Amostra Visando a Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Banana

O método de preparo de amostra proposto neste trabalho para determinação de agrotóxicos em banana foi definido com base em trabalhos já realizados da literatura, onde em maioria é utilizado o QuEChERS. Existem na literatura três variações do método, sendo inicialmente o método QuEChERS original (ANASTASSIADES *et al.*, 2003), QuEChERS acetado (LEHOTAY *et al.*, 2005) e QuEChERS citrato (ANASTASSIADES *et al.*, 2007). Foi proposto diferentes experimentos de extração e limpeza a fim, de otimizar e selecionar o melhor método.

Inicialmente foi realizado o experimento 1 comparando os três métodos QuEChERS, para determinar qual apresentaria melhor recuperação dos compostos investigados. Foi utilizado um branco fortificado com a solução analítica previamente preparada que contém todos os compostos de interesse. O nível de concentração foi de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  para a realização do experimento. Na Tabela 8 encontra-se descrito o procedimento para realização de cada método, os quais foram testados em triplicata.

Tabela 8: Procedimento dos três métodos QuEChERS

<b>Etapa</b>	<b>QuEChERS original</b>	<b>QuEChERS acetato</b>	<b>QuEChERS citrato</b>
<b>Quantidade de amostra</b>	10 g	15 g	10 g
<b>Extração</b>	10 mL acetonitrila	15 mL acetonitrila 1% ácido acético	10 mL acetonitrila
<b>Homogeneização</b>	Agitação 1 min (vórtex)	Agitação 1 min (vórtex)	Agitação 1 min (vórtex)
<b>Partição</b>	4 g $\text{MgSO}_4$ + 1 g NaCl	6 g $\text{MgSO}_4$ + 1,5 g $\text{CH}_3\text{COONa}$	4 g $\text{MgSO}_4$ , 1 g NaCl 1 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$
<b>Centrifugação 1</b>	Agitação 1 min (vórtex) + centrifugação 3400 rpm/ 8 min/ 20 °C	Agitação 1 min (vórtex) + centrifugação 3400 rpm/ 8 min/ 20 °C	Agitação 1 min (vórtex) + centrifugação 3400 rpm/ 8 min/ 20 °C
<b>Limpeza do extrato</b>	1 ml de sobrenadante + 150 mg $\text{MgSO}_4$ + 25 mg PSA + 125 mg C18	1 ml sobrenadante + 150 mg $\text{MgSO}_4$ + 50 mg PSA + 125 mg C18	1 ml sobrenadante + 150 mg $\text{MgSO}_4$ + 25 mg PSA + 125 mg C18
<b>Centrifugação 2</b>	Agitação 1 min (vórtex) + centrifugação 3500 rpm/ 8 min/ 20 °C	Agitação 1 min (vórtex) + centrifugação 3500 rpm/ 8 min/ 20 °C	Agitação 1 min (vórtex) + centrifugação 3500 rpm/ 8 min/ 20 °C

Fonte: Adaptada ZANELLA, 2015

Na etapa de limpeza foi utilizado os mesmos sorventes e quantidades iguais a fim de inicialmente avaliar apenas o processo de extração e partição no experimento 1. Foi utilizado para 1 mL de extrato 150 mg de sulfato de magnésio, 25 mL de PSA e 125 mg de C18. Após realização de todas as etapas conforme a Tabela 06, os extratos então foram transferidos para um vial, diluídos 5 vezes e filtrados antes de serem injetados no UHPLC-MS/MS.

Foi preparado um ponto da curva analítica com concentração  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  utilizando o extrato “branco” obtido em cada experimento, para ser utilizado no cálculo de recuperação dos compostos. Cada extrato foi diluído cinco vezes e em seguida filtrado antes de serem injetados no equipamento.

### 3.7.2 Modificações na etapa de limpeza no método QuEChERS

No método QuEChERS, após a etapa de extração/partição, é realizada a etapa de limpeza do extrato, tendo como sorventes mais utilizados a amina primária secundária (PSA, do inglês *primary secondary amine*) e o sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ). Outros sorventes muito utilizados são o octadecilsilano (C18) e o carvão grafitizado (GCB, do inglês *Graphitized Carbon Black*).

Cada sorvente emprega uma função diferente para a remoção de coextrativos, a escolha vai depender da matriz que está sendo analisada e de experimentos que indiquem qual apresenta melhores resultados. O PSA é frequentemente utilizado, e tem como função a remoção de açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos e pigmentos. O C18 atua na remoção de lipídios e coextrativos apolares. Já o GCB é utilizado para pigmentos, esteróis e coextrativos apolares (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

A escolha do sorvente é de suma importância para que ocorra uma eficiente limpeza do extrato, a fim de evitar sujidades que possam atrapalhar a análise ou danificar o equipamento, bem como evitar prejuízos na recuperação dos compostos de interesse.

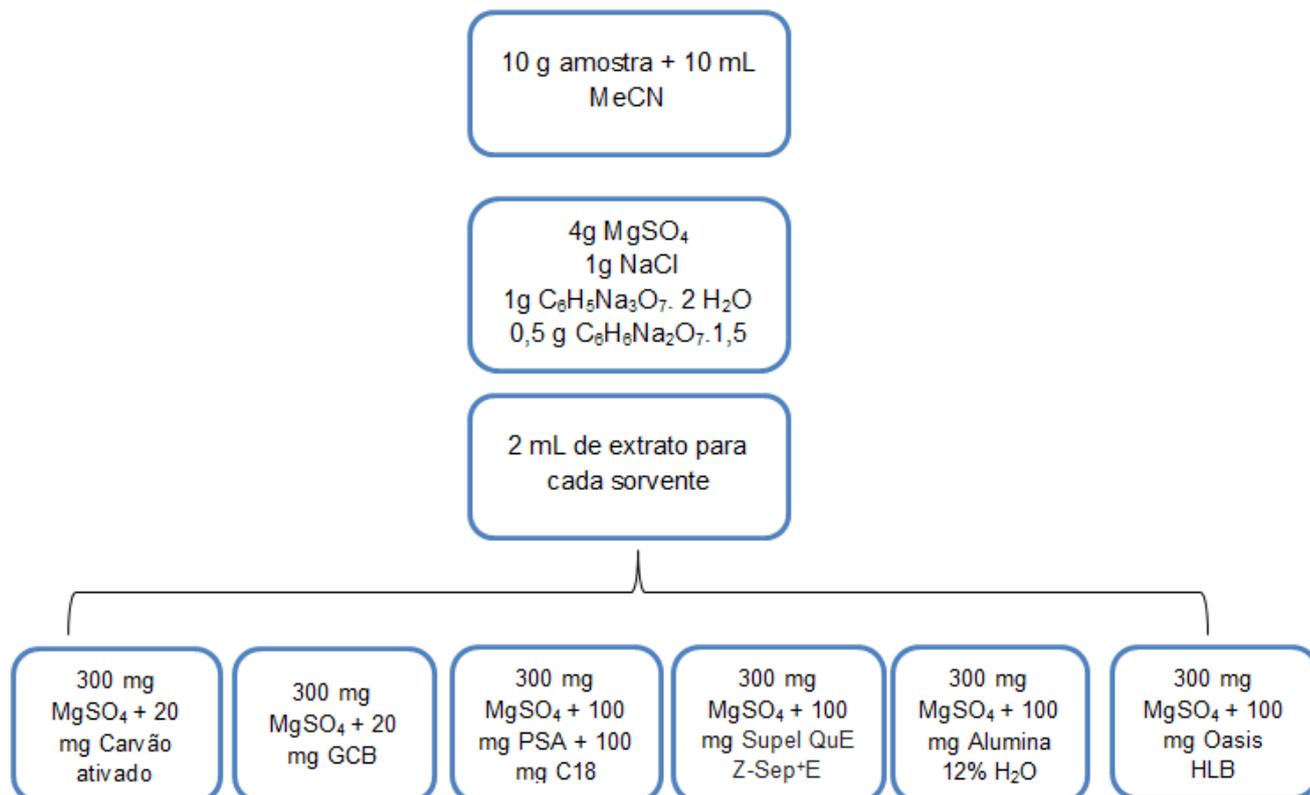
Após a escolha do método QuEChERS mais apropriado para a matriz banana foi realizado o experimento 2 para definir alguns sorventes a serem testados. Além do PSA, C18 e GCB, outros 14 sorventes ou combinações desses foram avaliados junto com o sulfato de magnésio. Sendo eles: quitosana, alumina, Florisil, terra diatomácea, sílica, Strata-X, fase fluorada, carvão ativado, Supel<sup>TM</sup> QuE Z-Sep+, PSA + C18, Oasis HLB<sup>®</sup>, propilamino, terra diatomácea 521 e alumina 12% H<sub>2</sub>O (m/v). O experimento 2 tinha como finalidade avaliar visualmente a eficiência de limpeza dos sorventes.

Para a realização do experimento 2, utilizou-se na etapa de limpeza 50 mg de cada sorvente e 150 mg  $MgSO_4$  para 1 mL de extrato. Exceto para o GCB e carvão ativado, onde utilizou-se 10 mg de sorvente e 150 mg de  $MgSO_4$ , pois esses sorventes tem capacidade de reter compostos planares, logo é necessidade utilizar uma menor quantidade para evitar resultados menos eficientes.

A partir do experimento 2, escolheu-se quais os 6 sorventes que apresentaram melhor limpeza visualmente, ou seja, apresentaram o extrato mais límpido. Em sequência, foi realizado o experimento 3 que tinha como finalidade avaliar a

recuperação dos compostos de interesse utilizando separadamente os 6 sorventes escolhidos em conjunto com o  $\text{MgSO}_4$ , conforme Figura 4.

Figura 4: Fluxograma do experimento 3



Fonte: Autoria própria

A fortificação do experimento 3 foi realizada no extrato antes da etapa de limpeza do extrato com uma concentração de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  do mix que continha os compostos de interesse. O objetivo foi avaliar a recuperação dos compostos somente na etapa da limpeza, sem incluir as etapas de extração e partição para não interferir nos resultados. Também foi preparado um ponto da curva analítica de concentração  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  com o extrato “branco” de cada experimento, para serem utilizados no cálculo de recuperação dos compostos. Cada extrato foi diluído cinco vezes e em seguida filtrado antes de serem injetados no equipamento. Os experimentos com sorventes foram realizados em triplicatas.

### 3.7.3 Determinação da massa dos sorventes de limpeza

Após a escolha do melhor sorvente foi realizado o experimento 4 para definir qual a melhor proporção e quantidade de sorvente, utilizou-se o planejamento fatorial

para fazer essa definição. A Tabela 9 mostra como foi realizado o experimento, quantidades usadas do sal secante e do sorvente. Para a extração utilizou-se o mesmo método QuEChERS escolhido no experimento 1.

Tabela 9: Proporção entre o sulfato de magnésio e sorvente

Ensaio	Sulfato de Magnésio (mg)	Sorvente (mg)
1	50	25
2	50	50
3	50	100
4	150	25
5	150	50
6	150	100
7	250	25
8	250	50
9	250	100

Fonte: autoria própria

A avaliação de diferentes proporções entre o sorvente e o sulfato de magnésio permite avaliar simultaneamente uma grande quantidade de variáveis da análise, a partir de um número menor de ensaios realizados (CUNICO *et al.*, 2008). Após o experimento 4 foi possível selecionar qual a melhor quantidade sorvente utilizado para a limpeza do extrato.

### 3.8 Validação do método QuEChERS para a determinação de resíduos de agrotóxicos em banana

Após definir as condições cromatográficas e otimização do método QuEChERS para melhor determinação e quantificação dos compostos de interesse, foi realizada a validação do método segundo os critérios: curva analítica e faixa de trabalho, seletividade, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão (recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e efeito matriz.

#### 3.8.1 Curva analítica e faixa de trabalho

A curva analítica foi verificada a partir da injeção de extratos brancos fortificados nas seguintes concentrações finais de: 0,5; 1; 2; 5; 10 e 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Os níveis de fortificação foram diluídos cinco vezes, partindo das concentrações iniciais: 2,5; 5; 10; 25; 50 e 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Foram realizadas curvas na matriz (CTM) e curvas no

solvente (CTS), ambas foram feitas em triplicatas conforme exigido pelo do INMETRO (2011). O solvente utilizado na CTS foi acetonitrila e na CTM como mencionado antes foi realizado em extrato de branco de banana.

A equação utilizada pra avaliação da curva foi:

$$y = ax + b \quad \text{Equação 1}$$

Onde,

x= concentração.

a= coeficiente angular-inclinação da curva analítica = sensibilidade.

b= coeficiente linear-interseção com o eixo y, quando x= 0.

Após as injeções as áreas das curvas foram calculadas e assim obtidas a curva analítica, o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e a faixa de linearidade.

### 3.8.2 Seletividade e linearidade

A seletividade foi definida a partir da comparação dos cromatogramas da amostra branco e a amostra branco fortificada com o mix dos compostos selecionados injetadas no UHPLC-MS/MS. A linearidade foi avaliada em 6 níveis de concentração tendo como critério de resíduo <20%.

### 3.8.3 LOQ e LOD

O LOQ resulta da concentração do analito, que foi capaz de produzir uma relação sinal/ruído igual a 10, ou seja,  $LOQ = 10S/R$ . Já o LOD correspondente a relação sinal/ruído igual a 3, isto é,  $LOD = 3S/R$ . O próprio software do equipamento gera esse sinal (RIBANI *et al.*, 2004). O LOQ foi definido como o menor nível de fortificação, que os compostos de interesse obtiveram recuperações entre 70 e 120% e  $RSD \leq 20\%$ . Para a obtenção do LOD foi dividido o valor de LOQ por 3,33 conforme determinado pelo INMETRO (INMETRO, 2011; SANTE, 2021). Os valores de LOQ e LOD do método estão expressos em  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

### 3.8.4 Exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária)

Para avaliar a exatidão e precisão é necessário que a recuperação e RSD dos analitos de interesse sejam obtidos de forma confiável. Para isso, o INMETRO (2011) exige que sejam analisadas amostras branco em diferentes níveis de fortificação, sendo no mínimo três concentrações requeridas: baixa, média e alta. A recuperação

é resultante da relação de analitos obtidos nas fortificações, a partir da quantidade adicionada do mix que contém os compostos, na amostra branco. Seu resultado é expresso em porcentagem (RIBANI et al., 2004).

O ensaio para determinar a exatidão consistiu na adição da solução analítica que contém os agrotóxicos em estudo à amostra branco de banana nos seguintes níveis de concentração: 5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , que corresponde às concentrações 1, 2, 5 e 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ , após diluição de 5x no extrato final na amostra “branco” de banana. Para cada nível foram realizadas seis repetições. O cálculo da recuperação segundo o INMETRO (2011) e SANTE (2021) resulta da equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = (C1 - C2 \div C3) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

C1= Concentração determinada na amostra fortificada;

C2= Concentração determinada na amostra não fortificada;

C3= Concentração usada para fortificação.

O INMETRO (2011) e SANTE (2021) determina que a precisão seja definida pela seguinte equação do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*):

$$\text{RSD (\%)} = (s \div x) \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

s= estimativa de desvio padrão absoluto;

$s = \{\sum(x_i - x_m)^2 / n - 1\}^{1/2}$

$x_i$ = valores individuais;

X= média das medidas em replicatas;

N= número de medidas.

Para a determinação da precisão foi utilizado a injeção do mesmo vial utilizado para determinar a exatidão, onde foi fortificado a amostra branco com 4 concentrações diferentes (5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), com seis repetições cada nível (n= 6). Para a precisão intermediária (RSDpi) foi realizada a análise em dias diferentes, porém com apenas dois níveis de fortificação (10 e 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

### 3.8.5 Efeito matriz

O efeito matriz possui muitas causas, porém na LC-MS/MS, segundo Moreno-González e colaboradores (2014), ocorre normalmente a partir do

enriquecimento/supressão da ionização dos analitos causada pela competição dos coextrativos afetando a resposta para os analitos. Para calcular esse efeito o guia SANTE (2021), recomenda a seguinte equação:

$$\text{Efeito matriz} = (x1 - x2 \div x2) \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

x1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas na matriz;

x2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em solvente (acetonitrila).

Segundo o guia SANTE (2021) há efeito matriz significativo quando o resultado é maior ou igual a +/- 20%, o que gera a necessidade utilizar curva preparada na matriz.

### 3.9 Aplicação do Método em Amostras Reais

O método desenvolvido e validado apresentado nesse trabalho foi utilizado para analisar 16 mostras de banana de diferentes cidades do Rio Grande do Sul - RS. Algumas amostras foram oriundas de mercados e outras de propriedades privadas. Na Tabela 10 é possível identificar quais amostras pertencem a cada município.

Tabela 10: Identificação das amostras obtidas em diferentes municípios do RS

Amostras	Municípios do RS
A1	Cruz Alta
A2	Pinhal Grande
A3	Cruz Alta
A4	Santa Maria
A5	Santa Maria
A6	Santa Maria
A7	Santa Maria
A8	Santa Maria
A9	Santa Maria
A10	Santa Maria
A11	Cruz Alta
A12	Cruz Alta
A13	Cruz Alta
A14	Frederico Westphalen
A15	São Borja
A16	Alegrete

Fonte: Autoria própria

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

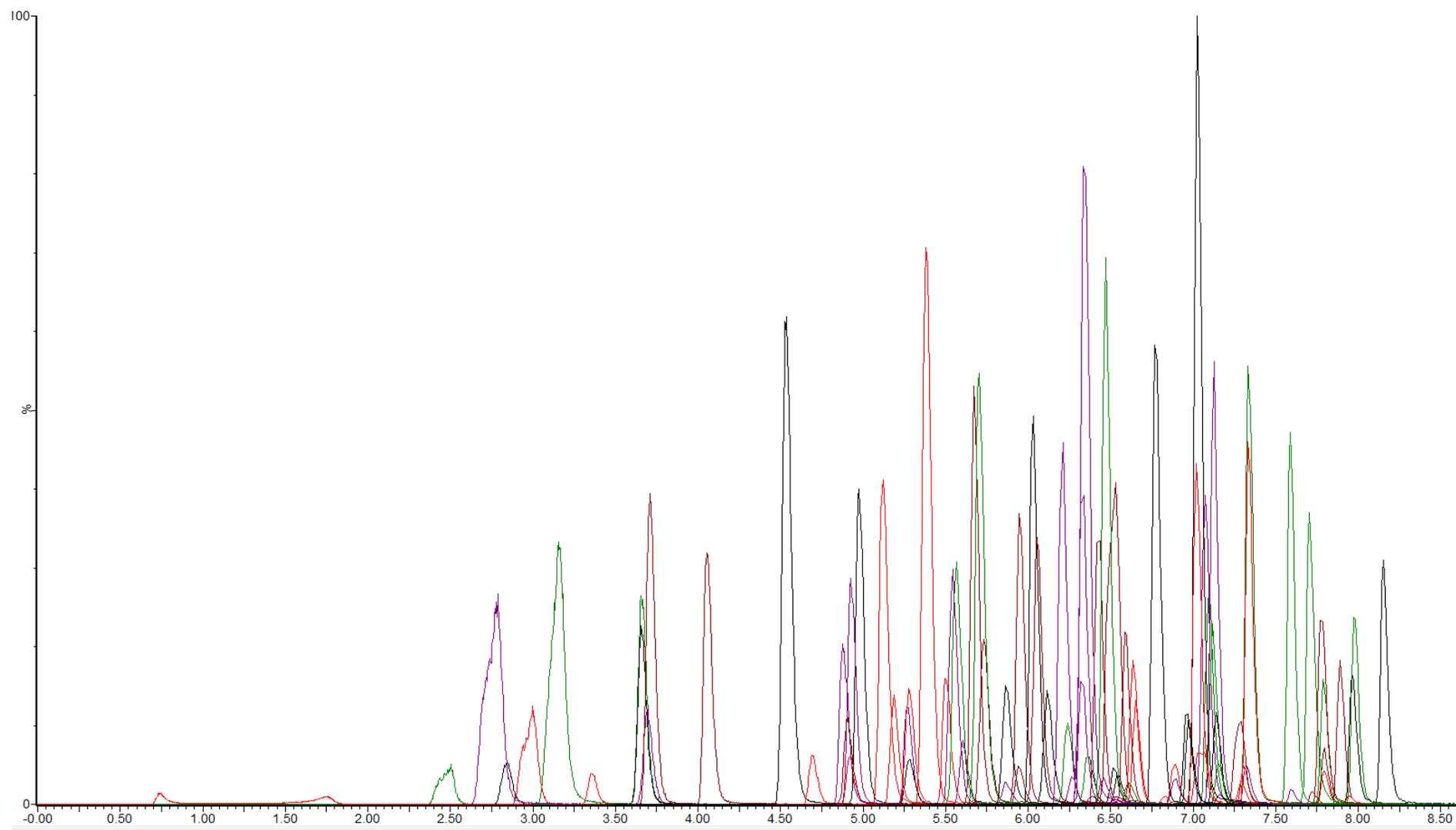
### 4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM BANANA

Foi utilizado sistema UHPLC-MS/MS equipado com analisador triplo quadrupolo. As condições cromatográficas usadas asseguraram adequada separação dos compostos. O tempo de análise de 10 min para cada corrida foi satisfatório, considerando que é uma análise multirresíduo.

Na Figura 5 é apresentado o cromatograma com os 91 compostos da solução analítica além dos padrões de controle e interno. O cromatograma apresenta o resultado dos íons totais oriundos da solução analíticas preparada em acetonitrila com analitos na concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , obtidos no sistema UHPLC-MS/MS utilizando o modo de aquisição Monitoramento de Reação Seleccionada (SRM, do inglês *Selected Reaction Monitoring*).

A Tabela 11 apresenta todos os agrotóxicos analisados no UHPLC-MS/MS, usando o modo de ionização ESI+, modo de aquisição SRM, com os seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ), íons percursores e íons produto para definir a quantificação e identificação de cada analito em estudo.

Figura 5: Cromatograma com os 91 analitos em acetonitrila na concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$



Fonte: Aatoria própria

Tabela 11: Agrotóxicos analisados por UHPLC-MS/MS utilizando o modo de ionização ESI+, no modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ), íons precursores e produtos

Composto	$t_R$ (min)	VC (V)	Íon precursor (m/z)	Íon produto 1* (m/z)	EC (eV)	Íon produto 2** (m/z)	EC (eV)
Abamectina	8,27	20	890,6	567,4	11	193,1	30
Acefato	9,2	8	184,1	143	8	125,1	8
Acetamiprid	3,51	23	223	126	20	56,1	15
Ametryn	5,43	32	228,1	186,1	18	68,1	36
Atrazine	5,39	30	216	174	18	96	23
Azinfos etil	6,38	10	346	132	16	77	36
Azinfos metil	5,7	12	318	160	8	261	8
Azoxystrobin	5,87	17	404	329	30	372	15
Bitertanol	6,98	15	440	166	42	181	20
Boscalid	6,08	32	343	307	20	140	20
Bromuconazole	6,29	32	376	159	35	70	25
Buprofezin	7,4	22	306	201	12	57	20
Carbaryl	5,03	19	202	145	22	117	28
Carbendazim	2,68	24	192	160	18	132	28
Carbofuran	4,81	25	222	165	16	123	16
Carbofuran-3-hydroxy	3,56	24	192	160	18	132	28
Carboxin	4,96	25	236	143	16	87	22
Cyanazine	4,54	28	241	214	17	96	25
Clomazone	5,78	23	240	125	18	89	46
Clorimurrom etil	6,11	25	415	186	15	83	40
Chlorpyrifos ethyl	7,6	27	350	97	32	198	20
Chlorpyrifos-methyl	7,1	23	322	125	20	289	16
Chlorpropham	6,22	9	214	154	18	172	8
Cresoxim-methyl	6,9	15	314,1	206,0	7	116,0	12
Diazinon	6,85	20	305	97	35	169	22
Difenoconazole	7,1	37	406	251	25	111	60
Dimethoate	3,52	12	230	125	20	199	10
Diuron	5,46	27	233	72,1	18	46,3	14
Epoxiconazole	6,46	25	330	101	50	121	22
Espinosade A	7,12	47	732,6	142	31	98,1	59
Espinosade D	7,34	42	746,52	142	31	98,1	53
Etefon	7,34	25	409	186	16	145	40
Fenpyroximat	7,97	23	422,2	366,1	15	138,1	32
Fenpropathrin	7,6	15	350	97	34	125	14
Fenpropimorph	5,87	41	285	97	46	199	10
Fenamiphos	6,46	27	304	202	36	217	24
Fenarimol	6,44	37	331	81	34	268	22
Fenthion	6,77	25	279	169	16	247	13
Fipronil	6,66	12	392	331	10	238	20
Fludioxonil	6,27	7	249,1	229,1	10	158,1	28
Fluquiconazol	6,35	37	376	307	30	349	18
Flutolanil	6,16	23	324	65	40	262	18
Flutriafol	5,32	23	302	123	29	70	18
Fluxapiraxade	5,75	44	380	131	24	248	21
Fostiazato	5,39	19	284	104	22	228	10
Hexitiazox	7,79	21	353	228,1	14	168,1	26

Composto	t <sub>R</sub> (min)	VC (V)	Íon precursor (m/z)	Íon produto 1* (m/z)	EC (eV)	Íon produto 2** (m/z)	EC (eV)
Indoxacarbe	7,32	25	528	203	40	150	22
Imazalil	5,33	31	297	159	22	69	22
Imidacloprid	3,24	23	256	175	20	209	15
Iprovalicarb	6,34	19	321	119	16	203	10
Linuron	5,95	25	249	160	18	181	16
Malathion	6,15	12	331	99	24	127	12
Mecarbam	6,41	12	330	227	8	97	35
Mepronil	6,17	27	270	91	44	119	28
Metalaxyl	5,51	15	270	91	44	119	28
Metconazole	6,97	29	320	70	22	125	36
Metsulfuron methyl	4,77	22	382	199	22	167	16
Monocrotophos	2,89	15	224	127	16	98	12
Monolinuron	5,11	23	215	99	34	126	22
Omethoate	1,88	16	214,1	125,1	22	183,1	11
Oxamyl	2,4	12	237	72	10	90	10
Pyraclostrobin	6,91	20	388	163	25	194	12
Pyrazophos	6,94	33	374	194	32	222	22
Pyridaben	7,96	19	365	147	24	309	12
Pyridaphenthion	6,25	31	341	189	22	92	34
Pyrimethanil	5,68	42	200	107	24	82	24
Pirimicarb	4,36	25	239	182	15	72	18
Pirimiphos-methyl	6,93	25	306	108	32	164	22
Piriproxifeno	7,36	23	322	227	14	116	14
Propargito	7,7	25	239	182	15	72	18
Propiconazole	6,87	37	342	159	34	69	22
Propizamida	6,19	23	295	93	14	96	14
Propoxur	4,76	12	210	111	16	168	10
Quinoxyfen	7,59	52	308	162	44	197	32
Saflufenacil	5,95	30	501,1	198	49	349	30
Simazine	4,74	34	202	96	22	124	16
Tebuconazole	6,79	31	308	70	22	125	40
Teflubenzurom	7,73	17	380,9	158	40	140,9	20
Terbufos	7,41	12	289	103	8	57	22
Terbutylazine	6,04	28	230	174	16	96	28
Tetraconazole	6,48	32	372	159	30	70	20
Thiabendazole	3,04	202	42	175	25	131	30
Thiacloprid	3,91	32	253	126	20	90	40
Thiamethoxam	2,75	19	292	132	22	211	12
Thiodicarb	5,33	17	308	70	22	125	40
Tiofanato metil	4,63	23	343,1	151	21	311,1	11
Tolcofos methyl	6,98	30	301	125	17	175	48
Triadimenol	6,37	12	296	70	10	99	15
Triazophos	6,3	22	314	162	35	119	18
Trifloxystrobin	7,15	25	409	145	40	186	16
Vamidotion	3,54	17	288	118	28	146	10
Atrazina-d5	5,55	26	221	179	18	101	23
Trifenilfosfato (PI)	6,72	40	327,2	152,1	37	215,2	28

VC: voltagem do cone; EC: energia de colisão; \* íon de quantificação; \*\* íon de identificação  
Fonte: Autoria própria

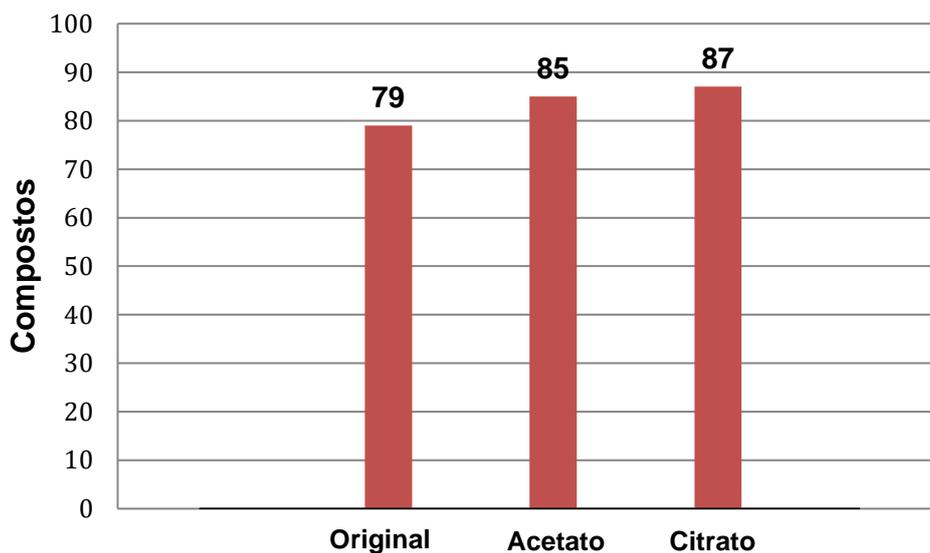
## 4.2 PREPARO DE AMOSTRA

### 4.2.1 Avaliação dos ensaios de extração realizados para a determinação de resíduos de agrotóxicos em banana

Inicialmente foi realizado o experimento 1, para avaliar qual das três variações do método QuEChERS (original, acetato e citrato) apresentaria uma maior quantidade de compostos de interesse recuperados na matriz banana. O objetivo principal foi avaliar a etapa de extração e partição em cada um deles. Dessa forma utilizou-se a mesma limpeza de extrato com quantidades iguais, conforme descrito no item 3.7.1., o que permite avaliar melhor apenas essas etapas pois, possíveis interferências causadas pelos sorventes de limpeza ocorreria de forma igual nas três variações.

Na Figura 6 podemos observar o resultado dos três QuEChERS para a avaliação das etapas de extração/partição. Como pode ser visto o QuEChERS citrato foi o que conseguiu uma maior quantidade de compostos recuperados, com recuperações entre 70 e 120% e RSD  $\leq$  20%.

Figura 6: Número de compostos recuperados, com recuperações entre 70 e 120% pelas três versões do QuEChERS



Fonte: Autoria própria

Ao realizar o experimento 1, foi possível observar a recuperação dos compostos de interesse utilizando os diferentes QuEChERS. A diferença entre cada um não foi muito grande, porém o citrato foi o que apresentou melhores resultados, sendo capaz de determinar ao todo 87 compostos seguindo a exigência de recuperação entre 70 e 120% com RSD  $\leq$  20%. O segundo melhor foi o acetato que

conseguiu uma recuperação de 85 compostos e o original recuperou 79 compostos, todos seguindo as exigências.

O QuEChERS citrato utiliza 10 g de amostra para 10 mL de acetonitrila como solvente extrator, não havendo a necessidade de acidificar o solvente. Porém, para a etapa de partição é necessário utilizar junto com o sulfato de magnésio e o cloreto de sódio, 1 g de citrato de sódio dibásico sesqui-hidratado e 0,5 g de citrato de sódio tribásico. Essa mistura gera um tamponamento na etapa de partição que impede a mudança de pH, favorecendo a extração dos compostos.

A acetonitrila é comumente usada como solvente extrator em métodos de preparo de amostra para determinação multirresíduo de agrotóxicos. Isso ocorre porque ela consegue abranger uma ampla faixa de polaridade, ao ser comparada com outros solventes, como por exemplo, a acetona. Além disso, seu uso destaca-se também por extrair menos coextrativos, como gorduras, compostos lipofílicos entre outros (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015).

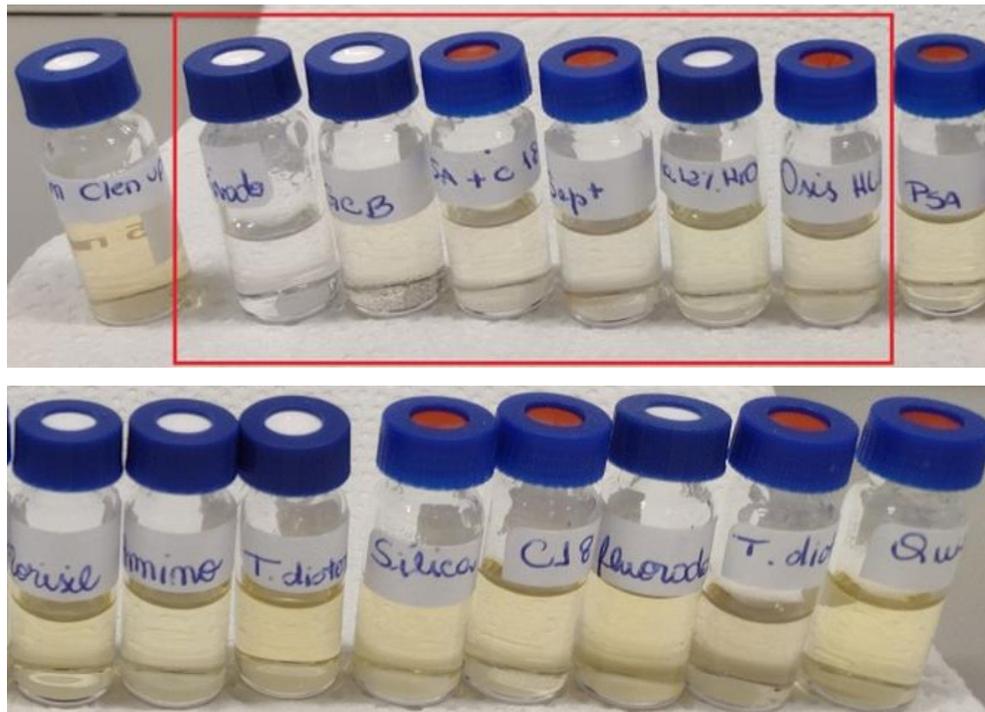
#### **4.2.2 Avaliação dos sorventes utilizados na etapa de limpeza do extrato**

Após definir o método QuEChERS citrato como o melhor método para a extração dos compostos em estudo para matriz banana, foi realizado o experimento 2. Que tinha como objetivo buscar de sorventes de limpeza alternativos para a remoção dos coextrativos.

Inicialmente, foram testados 17 sorventes a fim, de avaliar qual limparia melhor o extrato visualmente. Sendo eles: PSA, C18, GCB, quitosana, alumina, Florisil, terra diatomácea, sílica, Strata-X, fase fluorada, carvão ativado, Supel QuE Z-Sep+, PSA + C18, Oasis HLB<sup>®</sup>, propilamino, terra diatomácea 521 e alumina 12% H<sub>2</sub>O.

Na Figura 7 é possível observar uma ordem de limpeza para cada extrato, começando da esquerda para direita com os extratos mais limpos.

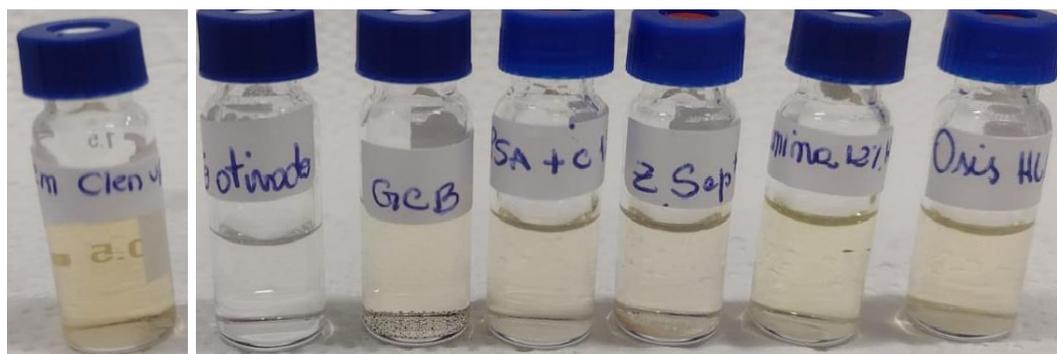
Figura 7: Coloração dos extratos limpos com diferentes sorventes



Fonte: Autoria Própria

Da esquerda para a direita os sorventes que apresentaram melhor limpeza visualmente foram: carvão ativado, GCB, PSA + C18, Supel QuE Z-Sep<sup>+</sup>, alumina 12% H<sub>2</sub>O, Oasis HLB<sup>®</sup>, PSA, Florisel, propilamino, terra diatomácea, sílica, C18, fase fluorada, terra diatomácea 521 e quitosana. O primeiro vial representa o extrato sem passar pela etapa de limpeza. Foram escolhidos os seis sorventes que apresentaram melhor eficiência na limpeza para dar sequência nos experimentos, como mostrado na Figura 8. Ao comparar com o extrato sem *clean-up*, os sorventes que mais limpam a amostra foram o carvão ativado, GCB, PSA + C18, Supel QuE Z-Sep<sup>+</sup>, alumina 12% H<sub>2</sub>O e Oasis HLB<sup>®</sup>.

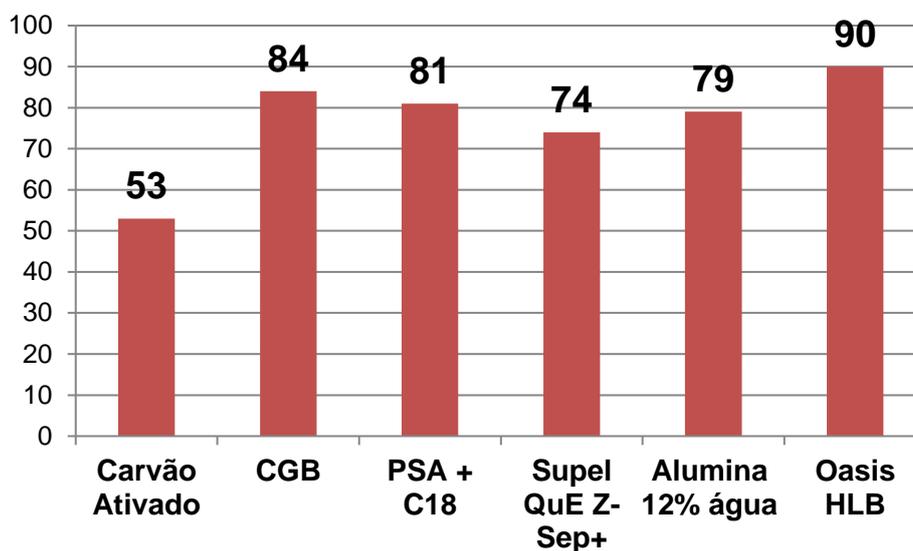
Figura 8: Sorventes mais eficientes na limpeza do extrato



Fonte: Autoria própria

A partir dos resultados foi realizado o experimento 3, fazendo a fortificação nos extratos e, então, a etapa de limpeza, sendo comparados com a curva preparada no extrato da matriz branco de cada. Em seguida, foram injetados no UHPLC-MS/MS para avaliar qual conseguiria obter melhor recuperação dos compostos, atendendo os parâmetros de recuperações entre 70 e 120%, com RSD  $\leq$ 20%. A Figura 9 apresenta os resultados.

Figura 9: Comparação de recuperação com diferentes sorventes.



Fonte: Autoria própria

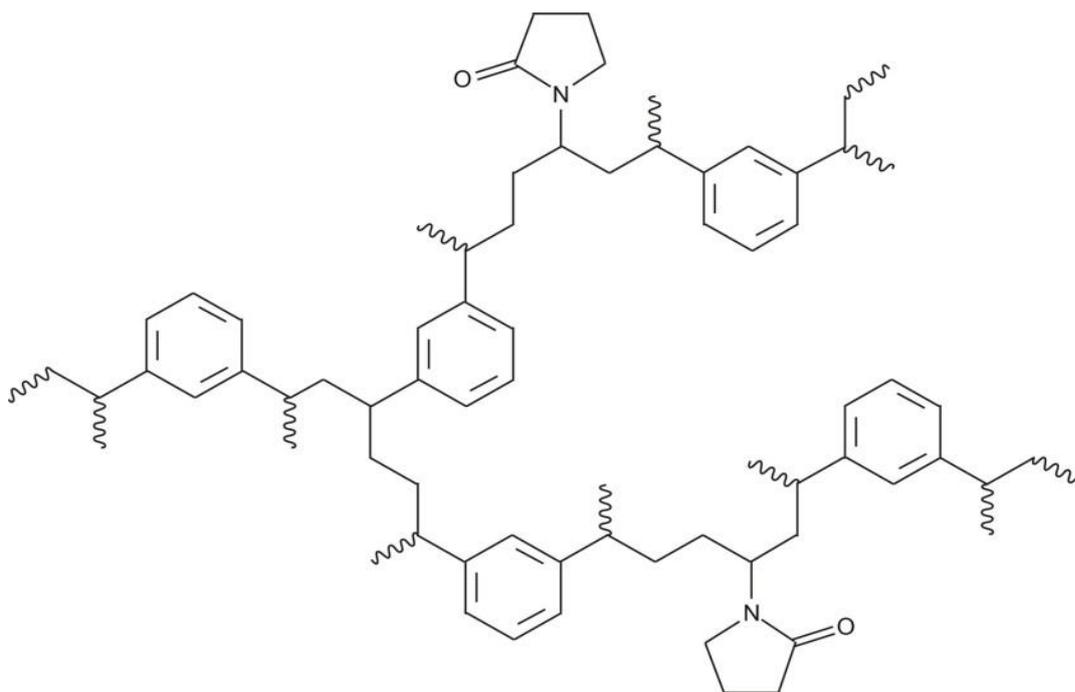
Como é possível observar na Figura 9, o sorvente Oasis HLB<sup>®</sup> apresentou melhores resultados, conseguindo recuperar 90 compostos, atendendo as exigências de exatidão e precisão, deixando apenas de fora o fludioxonil. O segundo melhor *clean-up* foi obtido com GCB, sendo capaz de recuperar 84 compostos dos 91 de interesse. Mesmo usando uma menor quantidade de GCB em relação aos demais sorventes, a recuperação foi satisfatória somente para parte dos compostos. Visualmente foi o segundo extrato mais límpido.

O PSA + C18 e a alumina 12% H<sub>2</sub>O apresentaram resultados bem próximos, sendo capazes de recuperar 81 e 79 compostos, respectivamente. O PSA + C18 havia sido usado no experimento 1 para escolher o melhor método QuEChERS para as etapas de extração e partição, estava em quantidades diferentes do experimento 3, porém apresentou melhor recuperação, 87 compostos, realizando a fortificação antes da extração do que fortificando apenas antes do *clean-up*.

O Supel QuE Z-Sep<sup>+</sup> conseguiu recuperar ao todo 74 compostos, ficando em penúltimo lugar dos seis sorvente em experimento. Já o carvão ativado que apresentou o extrato mais limpo, quase transparente foi que apresentou pior resultado, sendo capaz de recuperar apenas 53 compostos de 91. Essa baixa recuperação pode ser justificada, devido ao carvão ativado possuir afinidade com compostos apolares, que são a maioria dos agrotóxicos em estudo. Mesmo que esteja em menor quantidade ao se comparar com os demais, os analitos ficam retidos em sua estrutura.

Apesar o Oasis HLB<sup>®</sup> ocupar a última posição do experimento 02 de coloração, foi o que apresentou melhor recuperação, deixando apenas um composto de fora. Além disso, também é uma opção de sorvente alternativo aos tradicionais que normalmente são usados na determinação de agrotóxicos em banana, o que justifica a escolha dele para validação do método. O sorvente Oasis HLB<sup>®</sup> é um dos principais recheios de cartuchos utilizado no método SPE para a determinação multirresíduo de agrotóxicos.

Figura 10: Estrutura do sorvente Oasis HLB<sup>®</sup>



Fonte: [www.mn-net.com/chroma-news/chromabond-hlb-a-hydrophilic-lipophilic-balanced-n-vinylpyrrolidone-divinylbenzene-copolymer](http://www.mn-net.com/chroma-news/chromabond-hlb-a-hydrophilic-lipophilic-balanced-n-vinylpyrrolidone-divinylbenzene-copolymer)

Segundo a Waters, empresa fabricante do sorvente, Oasis HLB<sup>®</sup> é um polímero com partículas de 30 µm que atua em fase reversa o que garante um

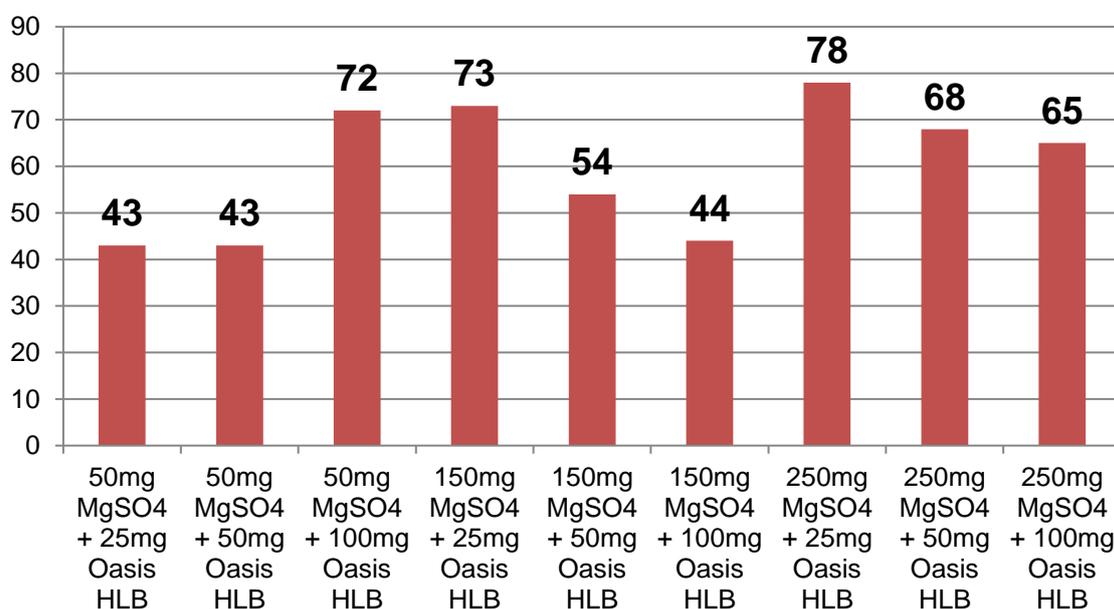
equilíbrio hidrofílico-lipofílico eficiente para compostos polares e apolares. É capaz de extrair uma ampla variedade de compostos ácidos, básicos e neutros em diferentes matrizes, permitindo trabalhar em pH de 0 a 14.

#### 4.2.3 Avaliação das proporções dos sorventes de *clean-up*

Após definir o método QuEChERS citrato como o melhor extrator dos compostos em estudo e otimizado o sorvente para realização da limpeza dos coextrativos do extrato iniciou-se o experimento 4, o qual tinha como finalidade estabelecer a melhor proporção entre o sulfato de magnésio e o sorvente Oasis HLB®.

A partir da amostra branco fortificada em concentração  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  foi possível escolher qual seriam as quantidades mais adequadas para a validação do novo método. Na Figura 11 é possível observar esses resultados.

Figura 11: Recuperação dos compostos no planejamento fatorial



Fonte: Autoria própria

Como se pode observar na Figura 11, ao manter a mesma quantidade de sulfato de magnésio, 50 mg para cada 1 mL de extrato, e avaliar o Oasis HLB® em 25, 50 e 100 mg, a quantidade de compostos recuperados mantém-se nas duas menores quantidades do sorvente. Porém, ao dobrar a quantidade de Oasis para 100 mg a recuperação aumenta, conseguindo um melhor resultado.

No entanto, ao aumentar a quantidade de sulfato de magnésio e aumentar as quantidades de Oasis HLB<sup>®</sup> ocorre a diminuição de compostos recuperados. Ao utilizar 150 mg de sal e com 25, 50 e 100 mg de sorvente, a primeira proporção é quem apresenta um melhor resultado, sendo capaz de recuperar 73 compostos. Esse experimento também permite observar como a quantidade de compostos recuperados é afetada quando realizada a fortificação desde o início do preparo de amostra. Ou seja, quando a amostra banco é fortificada antes da extração e partição e não apenas no extrato antes de passar pela etapa de limpeza. Pois como vimos no experimento 3 o sorvente Oasis HLB<sup>®</sup> foi capaz de recuperar 90 compostos, e agora esse valor foi reduzido para 54.

O terceiro e último nível de sulfato de magnésio foi de 250 mg, com 25, 50 e 100 mg de Oasis HLB<sup>®</sup> onde também ocorreu a diminuição de compostos recuperados ao se aumentar a quantidade do sorvente. Assim, o melhor resultado, com a recuperação de 78 compostos, foi obtido com a menor proporção, sendo a melhor proporção entre as seis condições do planejamento fatorial realizado.

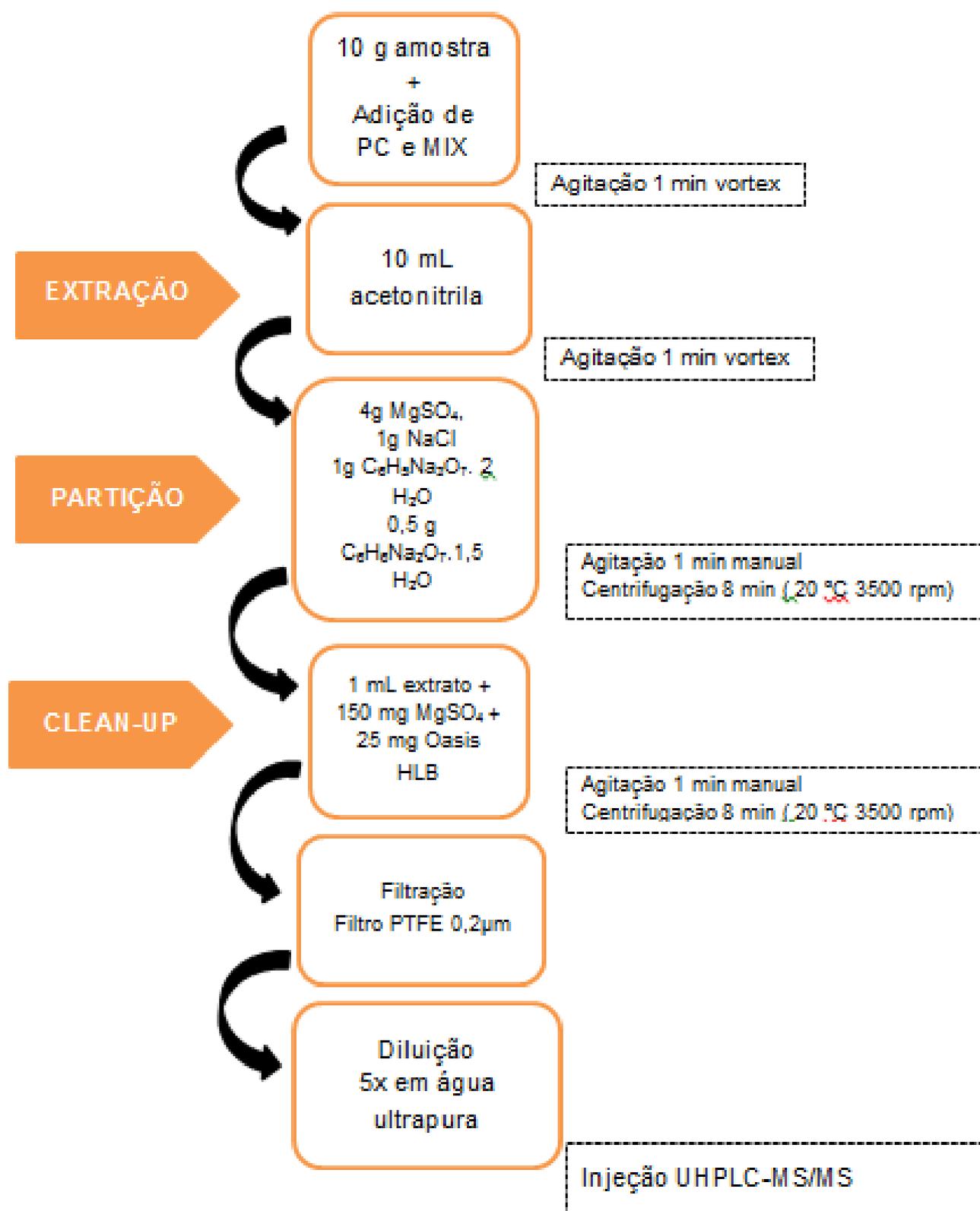
Apesar da proporção de 250 mg de sulfato de magnésio e 25 mg de Oasis HLB<sup>®</sup> ter sido a que conseguiu recuperar uma quantidade maior de compostos, não foi a escolhida, pois são apenas 5 compostos a mais e necessita um gasto maior de sal. A proporção 150 mg de sulfato de magnésio com 25 mg de Oasis HLB<sup>®</sup> foi selecionada como a mais adequada e satisfatória de todas, sendo a escolhida para realizar a validação do método. Essa proporção da quantidade para o *clean-up* foi capaz de recuperar 73 compostos, obedecendo às exigências de exatidão e precisão requeridas. Outro motivo por escolher essa proporção é que a quantidade de sal é a mesma utilizada nos experimentos anteriores, o que favorece a constância de utilização do mesmo. Outra vantagem que se destaca é a pequena quantidade de Oasis utilizada, sendo eficiente na limpeza, evitando o desperdício de mais reagente.

Outra relação que apresentou resultado satisfatório foi a de 50 mg de sal e 100 mg de sorvente. Porém, apesar de gastar menos sulfato a quantidade de Oasis HLB<sup>®</sup> é muito elevada, tornando o método mais caro e inviável.

### 4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO OTIMIZADO

A validação do método otimizado foi realizada no UHPLC-MS/MS para a matriz banana para a determinação de agrotóxicos, a partir de uma amostra branca. No primeiro dia da validação foram realizadas inicialmente 3 curvas no solvente (CTS) e posteriormente extraído amostras branco suficientes para o preparo de 3 curvas na matriz (CTM). Ambas as curvas tinham os mesmos pontos de concentração, sendo eles: 0,5, 1, 2, 5, 10 e 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ , as quais foram utilizadas para realizar os cálculos analíticos. Em seguida foi extraída amostras branco fortificadas nas concentrações 5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , cada nível tiveram seis replicatas ( $n= 6$ ). Para as extrações foi utilizado o método QuEChERS citrato otimizado, conforme ilustrado na Figura 12.

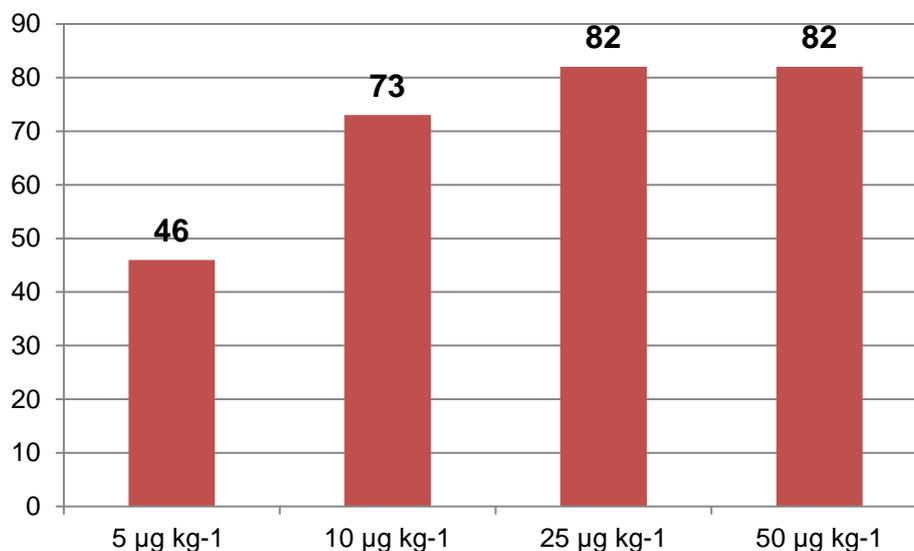
Figura 12: Fluxograma do método QuEChERS citrato otimizado



Fonte: Autoria própria

Na Figura 13 podemos observar o gráfico com a quantidade de compostos que conseguiram ser validados no método desenvolvido.

Figura 13: Quantidade de compostos recuperados empregando o método proposto em quatro níveis de fortificação



Fonte: Autoria própria

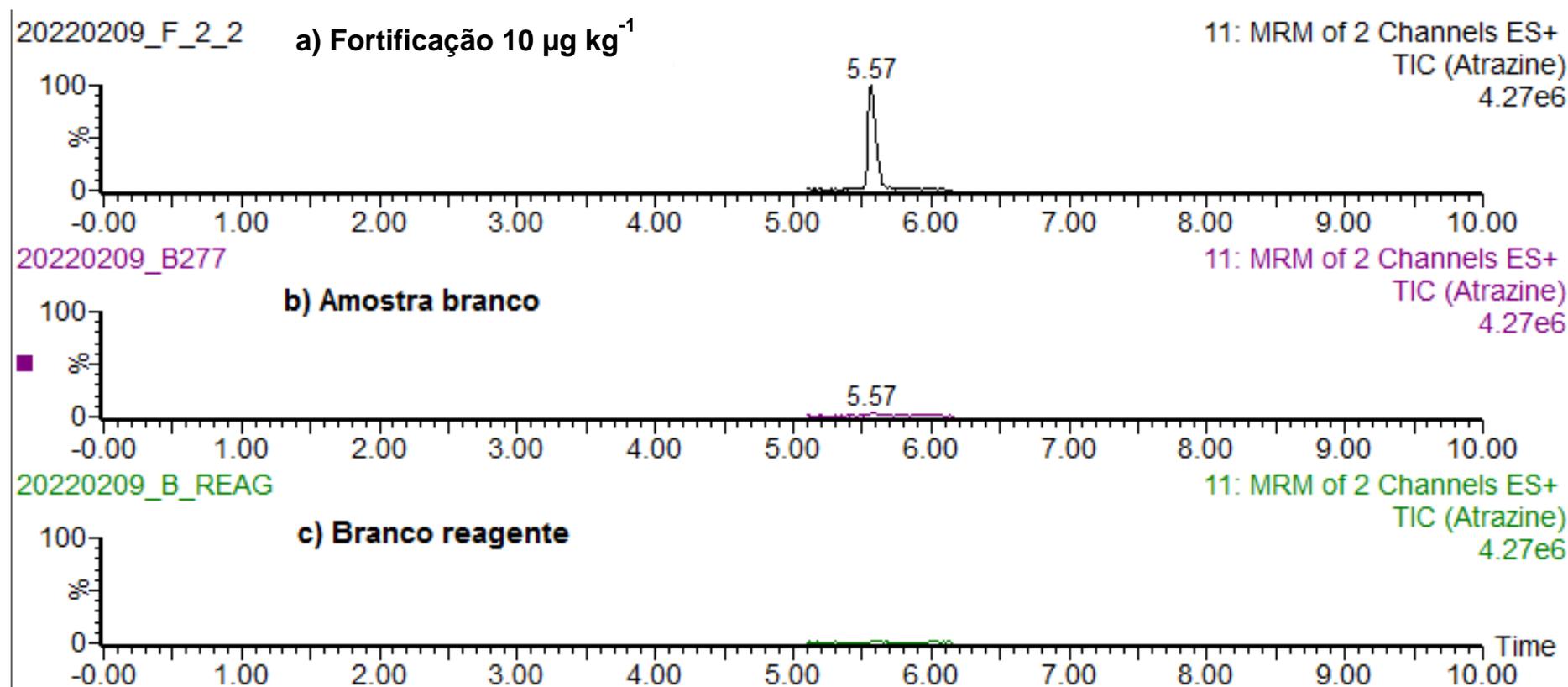
Dos 91 compostos selecionados para o estudo, o método foi capaz de recuperar seguindo as exigências requisitadas (recuperações entre 70-120% e RSD  $\leq 20\%$ ) um total de 82 compostos nos níveis de fortificação 25 e 50 µg kg<sup>-1</sup>. Os 9 analitos que não foram validados são: abamectina, chlorpyrifos, chlorpropham fenporpathrin, fludioxonil, pyridaben, piriproxfeno, propargito, tiofanato-metil.

Para a fortificação no nível 10 µg kg<sup>-1</sup> foram validados 73 compostos. Já o nível 5 µg kg<sup>-1</sup> por ser uma concentração menor conseguiu recuperar pouco mais da metade dos compostos, tendo um total de 46 compostos.

#### 4.3.1 Seletividade

O método garantiu seletividade adequada, não havendo interferência na amostra branco, pois, não havia presença de íons de identificação e confirmação nos mesmos tempos de retenção dos analitos de interesse. Também não foram encontrados nenhum composto do estudo com valor acima do LOD, o que possibilita a utilização da amostra para realização dos experimentos de fortificação e curva analítica. A Figura 14 ilustra a eficiência dessa seletividade.

Figura 14: Cromatogramas representativos obtidos no modo SRM por UHPLC-MS/MS para o composto (a) atrazina ( $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), (b) extrato branco da matriz e (c) branco reagente.



Fonte: Autoria própria

Para garantir a seletividade foi realizada a comparação entre a amostra “branco” (a), “branco” fortificado com atrazina na concentração de  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  (b) e “branco” reagente (c) para a matriz banana, como se pode observar na Figura 14, onde apresenta cada cromatograma. Para obtenção do “branco” reagente realiza-se o mesmo processo do método otimizado, porém ao invés das 10 g de amostra utiliza-se 10 mL de água ultrapura. Seu objetivo é testar a pureza dos solventes, sais e sorventes utilizados a fim de garantir que possíveis contaminações não prejudiquem os resultados.

#### **4.3.2 Linearidade**

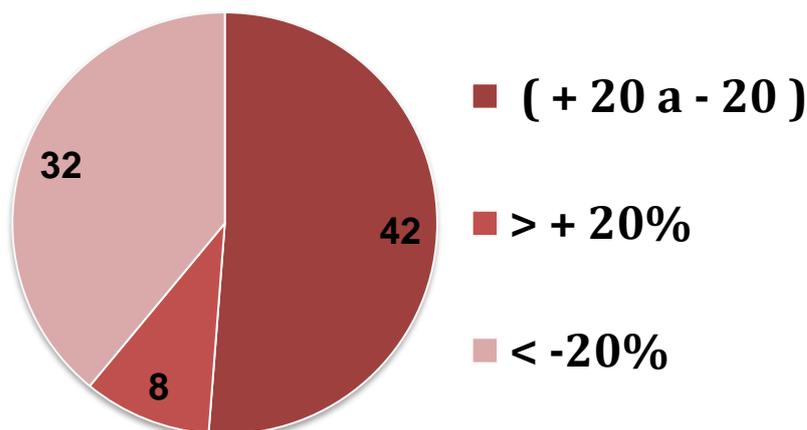
A linearidade do método desenvolvido foi obtida através de curvas analíticas, as quais geraram coeficiente de determinação ( $r^2$ ) entre 0,9910 e 1,0000 para a matriz banana. Para obtenção dos pontos das curvas analíticas foram fortificadas amostras brancas nas seguintes concentrações: 5, 10, 25 e  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Os valores de  $r^2$  de cada composto obtidos no trabalho estão apresentados na Tabela 12.

#### **4.3.3 Efeito Matriz**

O efeito matriz (EM) dos compostos de interesse foi obtido a partir da comparação entre a inclinação da curva preparada em solvente acetonitrila e a inclinação da curva preparada no extrato da matriz banana. Segundo SANTE (2021) valores entre +20 e -20% para EM são os mais adequados.

O efeito matriz apresentou resultados entre -66,5 e +65,4%. Os resultados do EM para os compostos validados no presente trabalho estão apresentados na Tabela 12. Na Figura 15 há o resumo dos resultados do efeito matriz dos 82 compostos validados no presente trabalho.

Figura 15: Resumo dos resultados do efeito matriz nos compostos validados



Fonte: Autoria própria

Como podemos observar no gráfico da Figura 15, dos 82 compostos recuperados, 42, ou seja, 51% obtiveram seu efeito matriz dentro da faixa sugerida por SANTE (2021). De outra forma 8 compostos apresentaram EM acima de + 20% e 32 compostos apresentaram resultados inferiores a -20%. Dessa forma, vários analitos apresentaram efeito matriz fora da faixa esperada, o qual deve ser considerado, pois esses resultados podem gerar uma supressão analítica ou aumento de sinal. A presença de compostos formados por superfícies ativas e/ou substâncias não-voláteis geram a supressão iônica. Além disso, compostos polares também são mais vulneráveis a alterações durante a ionização por eletronebulização (PRESTES *et al.*, 2009). Além dos riscos ao equipamento, a presença desses coextrativos pode causar uma competição durante a ionização dos íons, afetando a eficiência dos resultados. Para minimizar esse efeito foi utilizado durante a validação da curva analítica em extrato da matriz branca da banana. Também foram realizadas uma etapa de filtração em filtro de seringa de PTFE 0,2 µm e uma diluição de 5 vezes no extrato final para todas as amostras.

#### 4.3.4 Exatidão e precisão

Para avaliar a exatidão (recuperação) e precisão do método validado em termos de repetitividade foram realizados quatro níveis de concentração (5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) com seis repetições ( $n= 6$ ). Tendo como exigência para cada analito recuperação entre 70 e 120%, com  $\text{RSD} \leq 20\%$ , conforme legislação internacional (SANTE, 2021). Para a obtenção dos resultados foram utilizados cálculos a partir das curvas analíticas.

Para avaliar a precisão intermediária do método foi realizado novos experimentos em dia diferente do da validação. Foi realizado de maneira igual, mesmo analista, mesmas quantidades, amostras, materiais e equipamentos, porém os níveis de fortificação foram 10 e 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  ( $n= 6$ ), e as curvas analítica, tanto CTM quanto CTS foram feitas 1 vez. A quantidade de compostos recuperados nas duas concentrações manteve-se igual ao do ensaio de repetitividade, como pode ser observado na Tabela 12. O que variou foi apenas os valores de recuperação e de RSD.

Os resultados encontrados avaliando a exatidão, precisão e precisão intermediária foram satisfatórios, o que sugere que o método é seguro e eficiente para ser utilizado.

#### 4.3.5 Limite de quantificação e detecção

O limite de quantificação (LOQ) do método foi o menor nível de fortificação para cada composto que conseguiu ser validado. Os valores de LOQ do método variaram de 5 a 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , atendendo a critérios de relação sinal/ruído maior que 10,  $\text{RSD} \leq 20\%$  e recuperação entre 70 e 120%. O método possui um fator (diluição) de 5 vezes resultado em valores de LOQ adequados para programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos já que os limites de resíduos de agrotóxicos mais baixos são, em geral, 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . A possibilidade de tal diluição não compromete os resultados e favorece para uma melhor condição do extrato, diminuindo a possibilidade de interferentes serem injetados no equipamento.

Para a determinação do limite de detecção (LOD) foi considerado o valor de LOQ dividido por 3,33. Os valores de LOD do método estão apresentados na Tabela 12 e variaram de 1,5 a 7,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Tabela 12: Resultados obtidos na etapa de validação do método QuEChERS para os parâmetros de validação,

Compostos	EM (%)	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$r^2$	Nível de fortificação $\mu\text{g kg}^{-1}$				Precisão intermediária	
					Recuperação (RSD) %*				Recuperação (RSD) %*	
					5	10	25	50	10	25
Acefato	-32	5	1,5	0,9999	105 (6)	108 (3)	97 (5)	99 (2)	70 (7)	80 (5)
Acetamiprido	-12	25	7,5	0,9970	-	-	85 (4)	92 (4)	-	94 (3)
Ametrina	-9	25	7,5	0,9958	-	-	82 (6)	91 (9)	-	84 (4)
Atrazina	-26	5	1,5	0,9998	83 (6)	91 (4)	87 (4)	89 (3)	79 (4)	88 (4)
Azinfós etílico	-11	25	7,5	0,9969	-	-	84 (15)	83 (17)	-	74 (18)
Azinfós metílico	-13	5	1,5	0,9999	80 (15)	89 (12)	89 (7)	89 (7)	94 (6)	89 (8)
Azoxistrobina	-3,6	25	7,5	0,9954	-	-	86 (4)	92 (11)	-	88 (5)
Bitertanol	2,6	10	3	0,9996	-	95 (7)	84 (9)	80 (19)	88 (17)	89 (12)
Boscalida	-16	5	1,5	0,9998	80 (8)	90 (4)	87 (6)	84 (12)	70 (5)	81 (8)
Bromuconazol	-21	10	3	0,9988	-	86 (10)	83 (15)	91 (8)	72 (8)	81 (12)
Buprofezina	-32	25	7,5	0,9989	-	-	87 (14)	79 (19)	-	70 (2)
Carbaril	-19	5	1,5	0,9999	85 (4)	96 (2)	91 (5)	92 (4)	88 (3)	92 (4)
Carbendazim	-20	5	1,5	0,9999	89 (4)	87 (2)	77 (5)	76 (2)	82 (3)	82 (2)
Carbofurano	-21	5	1,5	0,9999	93 (3)	98 (3)	94 (4)	97 (3)	91 (5)	96 (2)
Carbofurano-3-hidroxi	-12	10	3	0,9993	-	85 (6)	87 (5)	92 (3)	76 (4)	92 (3)
Carboxin	-13	25	7,5	0,9991	-	-	77 (4)	82 (5)	-	78 (3)
Cianazina	19	5	1,5	0,9999	90 (4)	94 (2)	89 (5)	91 (4)	91 (2)	95 (3)
Clomazona	-9	10	3	0,9988	-	81 (3)	87 (4)	93 (4)	71 (3)	90 (3)
Clorimurom etílico	35	10	3	0,9995	-	83 (9)	90 (6)	88 (14)	77 (8)	93 (5)
Clorpirifós-metílico	-24	5	1,5	0,9997	105 (18)	85 (14)	79 (10)	75 (11)	70 (17)	74 (18)
Cresoxim-metílico	-16	10	3	0,9992	-	118 (10)	88 (9)	85 (18)	65 (17)	81 (16)
Diazinon	-21	5	1,5	0,9999	88 (7)	92 (2)	86 (5)	83 (11)	69 (4)	81 (6)
Difenoconazol	-23	5	1,5	0,9995	107 (8)	89 (7)	80 (9)	83 (7)	90 (6)	80 (13)
Dimetoato	-20	10	3	0,9986	-	79 (3)	90 (5)	97 (2)	70 (6)	95 (3)
Diurum	-18	10	3	0,9993	-	80 (2)	85 (4)	90 (4)	70 (4)	86 (1)
Epoxiconazol	-11	5	1,5	1,0000	91 (10)	93 (4)	90 (5)	89 (9)	94 (2)	91 (6)
Espinosade A	37	5	1,5	0,9999	77 (14)	70 (10)	89 (8)	90 (11)	74 (9)	87 (7)

Compostos	EM (%)	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$r^2$	Nível de fortificação $\mu\text{g kg}^{-1}$				Precisão intermediária	
					Recuperação (RSD) %*				Recuperação (RSD) %*	
					5	10	25	50	10	25
Espinosade D	38	5	1,5	0,9997	77 (14)	70 (6)	90 (11)	91 (13)	77 (11)	90 (9)
Etefom	-29	5	1,5	0,9996	92 (8)	84 (10)	76 (14)	78 (9)	70 (20)	72 (9)
Femproximato	-65	10	3	0,9946	-	85 (14)	70 (9)	70 (10)	104 (16)	70 (12)
Fempropimorfe	1,8	10	3	0,9993	-	72 (5)	87 (5)	93 (2)	70 (2)	87 (3)
Fenamifós	-10	10	3	0,9973	-	78 (5)	90 (9)	98 (8)	70 (10)	82 (20)
Fenarimol	-2,4	10	3	0,9993	-	70 (14)	80 (11)	80 (13)	82 (10)	86 (7)
Fentiom	-25	5	1,5	0,9999	79 (13)	74 (17)	71 (13)	75 (11)	70 (5)	72 (8)
Fipronil	39	10	3	0,9967	-	70 (8)	73 (16)	78 (13)	93 (13)	91 (16)
Fluquiconazol	-19	10	3	0,9984	-	75 (17)	89 (10)	90 (10)	70 (4)	84 (15)
Flutolanil	-23	10	3	0,9973	-	75 (11)	89 (6)	94 (12)	70 (11)	86 (7)
Flutriafol	-3,7	5	1,5	0,9996	71 (7)	87 (4)	88 (4)	93 (4)	79 (10)	95 (6)
Fluxaproxade	65	5	1,5	0,9995	96 (14)	72 (17)	82 (17)	75 (13)	112 (19)	99 (20)
Fostiazato	-11	10	3	0,9947	-	70 (4)	92 (4)	102 (2)	70 (2)	93 (3)
Hexitiazox	-60	10	3	0,9947	-	85 (11)	70 (4)	71 (12)	83 (13)	70 (9)
Indoxacarbe	-30	5	1,5	0,9990	87 (12)	79 (19)	73 (18)	76 (16)	76 (20)	73 (20)
Imazalil	-18	5	1,5	0,9999	85 (7)	86 (3)	85 (3)	86 (5)	88 (3)	91 (3)
Imidacloprido	36	5	1,5	0,9999	83 (12)	87 (6)	86 (7)	87 (4)	82 (6)	91 (2)
Iprovalicarbe	-14	5	1,5	0,9994	70 (5)	90 (2)	91 (5)	95 (3)	76 (5)	92 (5)
Linurom	-21	5	1,5	0,9997	74 (15)	90 (8)	82 (7)	85 (10)	70 (5)	75 (11)
Malatim	-9,3	5	1,5	0,9996	77 (8)	92 (5)	89 (3)	87 (9)	83 (8)	89 (5)
Mecarbam	-18	5	1,5	0,9993	71 (14)	81 (13)	89 (7)	88 (11)	84 (5)	90 (7)
Mepronil	-16	10	3	0,9989	-	78 (6)	84 (6)	88 (11)	71 (7)	80 (8)
Metalaxil	-9,6	10	3	0,9988	-	84 (4)	94 (5)	99 (1)	74 (3)	96 (4)
Metconazol	-23	5	1,5	0,9998	71 (10)	85 (5)	85 (4)	86 (10)	70 (5)	77 (5)
Metsulfuron metílico	57	10	3	0,9982	-	72 (4)	87 (4)	91 (5)	73 (4)	94 (30)
Monocrotófos	-5,3	5	1,5	0,9999	82 (4)	88 (2)	84 (3)	88 (1)	82 (2)	89 (1)
Monolinurom	-15	5	1,5	0,9998	82 (10)	92 (5)	93 (7)	95 (4)	85 (4)	93 (2)
Ometoato	-23	5	1,5	0,9996	73 (16)	96 (4)	92 (5)	96 (5)	88 (8)	94 (3)

Compostos	EM (%)	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$r^2$	Nível de concentração $\mu\text{g kg}^{-1}$				Precisão intermediária	
					Recuperação (RSD) %*				Recuperação (RSD) %*	
					5	10	25	50	10	25
Oxamil	2,8	5	1,5	0,9996	70 (5)	84 (3)	84 (4)	88 (3)	86 (1)	93 (3)
Piraclostrobina	-27	5	1,5	0,9999	83 (12)	82 (17)	75 (16)	82 (12)	76 (12)	73 (18)
Pirazofós	-3,6	25	7,5	0,9971	-	-	82 (14)	90 (9)	-	87 (13)
Piridafentiona	-8,1	10	3	0,9987	-	81 (4)	90 (6)	92 (9)	73 (4)	89 (8)
Pirimetanil	-28	5	1,5	0,9999	88 (8)	85 (7)	83 (5)	85 (5)	83 (5)	79 (5)
Pirimicarbe	-10	25	7,5	0,9964	-	-	86 (40)	94 (4)	-	91 (1)
Pirimifós-metílico	-28	5	1,5	0,9998	71 (9)	79 (7)	80 (9)	79 (16)	70 (3)	74 (9)
Propiconazol	-19	10	3	0,9993	-	81 (4)	88 (6)	94 (7)	71 (5)	82 (4)
Propizamida	-19	25	7,5	0,9965	-	-	85 (10)	93 (6)	-	89 (5)
Propoxur	-16	5	1,5	0,9997	75 (3)	89 (3)	91 (5)	96 (2)	90 (2)	96 (2)
Quinoxifeno	-66	10	3	0,9910	-	96 (11)	71 (9)	71 (10)	92 (7)	70 (9)
Saflufenacil	28	5	1,5	0,9998	76 (3)	92 (1)	94 (4)	91 (9)	88 (4)	98 (3)
Simazina	-24	5	1,5	0,9998	82 (9)	90 (4)	90 (5)	93 (2)	80 (5)	88 (4)
Tebuconazol	-18	5	1,5	0,9997	116 (20)	109 (8)	90 (8)	89 (9)	74 (12)	86 (10)
Teflubenzurom	-32	5	1,5	0,9985	114 (14)	91 (19)	76 (20)	72 (12)	84 (19)	71 (11)
Terbufós	-41	5	1,5	0,9991	101 (8)	88 (10)	71 (17)	76 (18)	70 (6)	72 (9)
Terbutilazina	-26	5	1,5	0,9998	105 (5)	96 (3)	84 (5)	89 (4)	77 (4)	79 (6)
Tetraconazol	-27	5	1,5	0,9997	75 (11)	87 (5)	88 (7)	93 (9)	79 (6)	87 (5)
Tiabendazol	-25	5	1,5	0,9998	93 (2)	83 (1)	73 (3)	70 (3)	74 (4)	70 (1)
Tiacloprido	-5,2	5	1,5	0,9999	82 (3)	91 (1)	89 (4)	90 (4)	86 (2)	92 (2)
Tiametoxam	17	10	3	0,9993	-	77 (2)	85 (4)	89 (3)	70 (5)	90 (2)
Tiodicarbe	-6,8	5	1,5	0,9996	76 (11)	88 (5)	93 (6)	93 (4)	85 (6)	94 (3)
Tolcofos metílico	-36	10	3	0,9998	-	80 (20)	74 (18)	79 (11)	72 (14)	71 (18)
Triadimenol	4,7	10	3	0,9990	-	97 (8)	92 (7)	93 (8)	101 (18)	97 (7)
Triazophos	-24	10	3	0,9988	-	82 (5)	87 (10)	90 (14)	77 (19)	83 (7)
Trifloxistrobina	-39	5	1,5	0,9998	89 (8)	84 (12)	77 (14)	82 (7)	72 (20)	72 (7)
Vamidationa	-16	5	1,5	0,9998	79 (7)	89 (2)	91 (3)	91 (3)	86 (11)	90 (2)

\*n= 6

Fonte: Autoria Própria

#### 4.4 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

O método validado nesse trabalho foi utilizado para determinar a presença de resíduos de agrotóxicos em 16 amostras comerciais e de propriedades particulares de diferentes cidades do Rio Grande do Sul. Na Tabela 13 está apresentado os resultados dessas análises.

Tabela 13: Resultado, em  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , das amostras de bananas analisadas utilizando o método QuEChERS citrato otimizado e UHPLC/MS-MS e os valores de LMR, em  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , para banana.

<b>Compostos/ Amostras</b>	<b>Carbendazim</b>	<b>Difenoconazol</b>	<b>Imidacloprido</b>	<b>Mecarbam</b>
A1	n.d	n.d	n.d	n.d
A2	n.d	n.d	n.d	n.d
A3	n.d	n.d	n.d	n.d
A4	3,8	n.d	2,7	n.d
A5	n.d	n.d	n.d	n.d
A6	21,8	n.d	n.d	n.d
A7	21,9	20,6	n.d	n.d
A8	n.d	n.d	n.d	n.d
A9	n.d	n.d	n.d	1,8
A10	n.d	n.d	n.d	n.d
A11	11,1	n.d	n.d	n.d
A12	8,9	n.d	16,1	n.d
A13	161,9	n.d	n.d	n.d
A14	n.d	n.d	n.d	n.d
A15	3,2	n.d	n.d	n.d
A16	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>LMR Brasil</b>	<b>n.a.</b>	<b>500</b>	<b>100</b>	<b>n.a.</b>

Obs.: n.d.= não detectado; n.a.= não autorizado para a cultura

Fonte: Autoria Própria

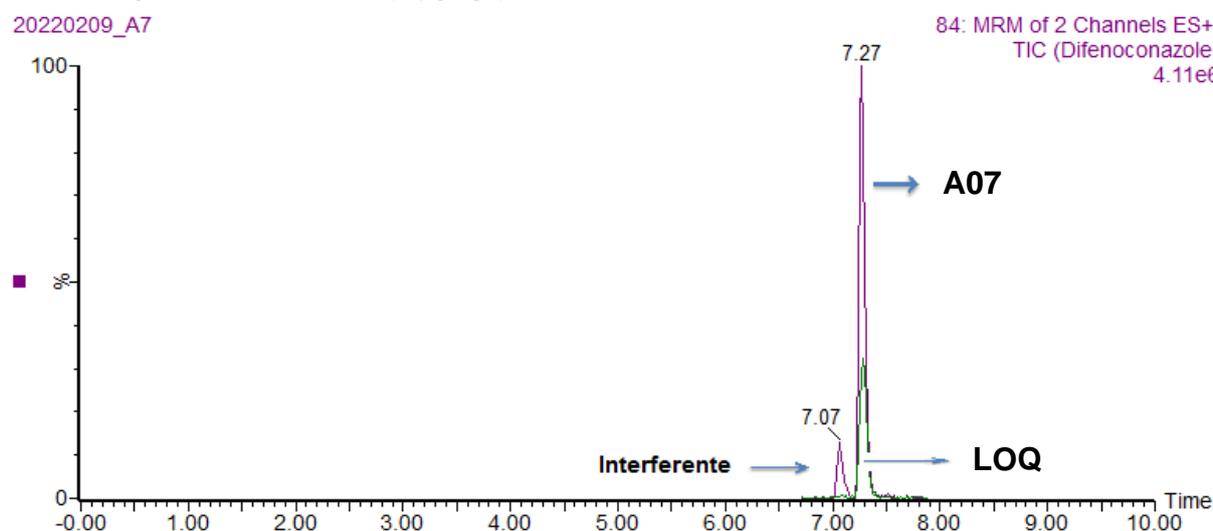
Como podemos observar na Tabela 13, foram quantificados 4 compostos diferentes em algumas das amostras. As amostras A4 e A12 apresentaram os agrotóxicos carbendazim e imidacloprido e a amostra A7 os agrotóxicos carbendazim e difenoconazol. Outras cinco amostras apresentaram só um agrotóxico, com destaque para a amostra A13 com  $161,9 \mu\text{g kg}^{-1}$  de carbendazim.

As amostras A7 e as amostras A4 e A12 apresentarem resíduos dos agrotóxicos difenoconazol e imidacloprido, respectivamente, porém seus valores estão abaixo do que a ANVISA permite para a cultura, que corresponde a 0,5 e 0,1  $\text{mg kg}^{-1}$  ( $500$  e  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), respectivamente.

O carbendazim foi o composto que mais apresentou resíduos nas amostras, sendo 7 ao todo. Entretanto, seu uso não é autorizado para a produção da banana. É possível observar que a amostra A13 tem maior concentração de resíduo que as demais. O agrotóxico mecarbam, que ocorreu na amostra A9, também não é autorizado para uso na cultura.

Na Figura 16 podemos observar o cromatograma com o pico cromatográfico no valor do LOQ do agrotóxico carbendazim e o pico cromatográfico presente na amostra A7. É possível ver que a concentração do agrotóxico está bem acima do LOQ.

Figura 16: Cromatograma para o composto difenoconazol na amostra A7 sobreposto ao cromatograma de fortificação no nível do LOQ ( $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ )



Fonte: Autoria própria

O carbendazim é um fungicida sistemático da classe dos benzimidazóis que possui ação curativa e protetora, indicado para as culturas da soja, feijão, trigo, algodão e alguns cítricos. Esse agrotóxico possui toxicidade média, pertence a classificação III, conforme determinado pela ANVISA, o qual apresentam elevados riscos à saúde. Seu uso é proibido na União Europeia, a qual produz e vende ao Brasil em grande escala (COUTINHO *et al.*, 2006).

## 5 CONCLUSÃO

O presente trabalho possibilitou o desenvolvimento e validação do método QuEChERS citrato modificado para determinação simultânea de 90 agrotóxicos na matriz banana, empregando UHPLC-MS/MS. Com base nos resultados obtidos o método mostrou-se muito satisfatório e de fácil utilização. A análise por UHPLC-MS/MS possibilitou atingir elevada sensibilidade e seletividade.

Para a otimização do método foram realizados alguns experimentos inicialmente foi testado qual dos três métodos QuEChERS (original, acetato e citrato) conseguiria recuperar maior quantidade dos compostos selecionados. Após a escolha do método, foi selecionado vários sorventes para avaliar qual melhor limparia e não afetaria a recuperação dos analitos. Dentre todos testados o sorvente Oasis HLB<sup>®</sup> foi o que melhor se destacou. Posteriormente foi realizada uma avaliação com diferentes quantidades dos sorventes de limpeza, com a finalidade de identificar em qual proporção entre sulfato de magnésio e Oasis HLB<sup>®</sup> apresentaria melhor resultado, de modo a ter um bom custo benefício e inovação.

A validação do método seguiu todos os critérios exigidos pelo Guia de Validação da SANTE (2021) para os 90 compostos propostos, destes 9 compostos não atenderam os critérios, não apresentando recuperação em nenhum dos níveis de concentração avaliados. Após aprovado, o método foi utilizado para testar 16 amostras comerciais e de propriedade particular. O qual possibilitou identificar a presença de resíduos de 4 agrotóxicos diferentes em 8 amostras, inclusive agrotóxicos não registrados para uso na cultura da banana.

Por fim, conclui-se que os objetivos definidos nesse trabalho foram alcançados. O método de preparo de amostra otimizado, bem como o uso do UHPLC-MS/MS, possui boa seletividade e desempenho para realização das análises possibilitando analisar baixos níveis de concentração com grande confiabilidade.

## **6 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS**

Durante a realização das atividades no laboratório gera-se resíduos sólidos e líquidos, os quais são separados e devidamente levado para seu destino apropriado.

Os resíduos sólidos contaminados eram colocados em sacos plásticos de coloração laranja e identificados como resíduos halogenados. Da mesma forma, os resíduos líquidos gerados durante trabalho eram separados em frascos âmbar em halogenados e não-halogenados.

Tanto os resíduos sólidos quanto os líquidos foram encaminhados para o almoxarifado do Departamento de Química da UFSM, é responsável pelo destino final de tipo de resíduo, onde será tratado e descartado por empresa terceirizada.

## **7 PROPOSTAS PARA FUTUROS TRABALHOS**

- Avaliar a eficiência do método desenvolvido em diferentes variedades de banana;
- Comparar o método em amostra processada com e sem a casca;
- Testar o método proposto para agrotóxicos mais voláteis, como por exemplo inseticidas, empregando sistema GC-MS/MS;
- Aumentar a quantidade de agrotóxicos analisados pelo método.

## REFERÊNCIAS

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

ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM, E.; TASDELEN, B.; STAJNBAHER, D. **Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue Analysis.** Pesticide Chemistry: Crop protection, public health, environmental safety, Wiley-VHC, p. 439-458, 2007.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Ministério da Saúde.** RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Dispõe sobre os critérios para avaliação e classificação toxicológica, priorização da análise e comparação da ação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira, e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 31 jul. 2019.

BANDEIRA, D. D.; MUNARETTO, J. S.; RIZZETTI, T. M.; FERRONATO, G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R.; ADAIME, M. B. **Determinação de resíduos de agrotóxicos em leite bovino empregando método QuEChERS modificado e GC-MS/MS.** Química Nova, v. 37, p. 900-907, 2014.

BLASCO, C.; FONT, G.; PICÓ, Y. **Analysis of pesticides in fruits by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–ion trap–triple stage mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1098, p. 37-43, 2005.

BORGES, K.B; FIGUEIREDO, E.C.; QUEIROZ, M.C.(Org). **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos.** Capítulo 24, 1ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015.

BORGES, J. H.; CABRERA, J. C.; DELGADO, M. Á. R.; HERNÁNDEZ-SUÁREZ, E. M.; SAÚCO, V. G. **Analysis of pesticide residues in bananas harvested in the Canary Islands (Spain).** Food Chemistry, v. 113, p. 313-319, 2009.

BRASIL, 2002. **Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002**. Regulamenta lei ° 7.802, de 11 de julho de 1989. <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm)> Acesso em: 09/12/2021.

CABRERA, L. C. **Estudo do efeito matriz na determinação de agrotóxicos em diferentes tipos de arroz pelo método QuEChERS modificado e LC-MS/MS**. 2012. 138 p. Dissertação (Pós-graduação em Química – Química Analítica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 2012.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. **Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduo de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas**. Química Nova, v. 34, p. 1604-1617, 2011.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. **O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos**. Química Nova, v. 31, p. 623-636, 2008.

CNA. **Dia da Banana – Fruta é cultivada em todos os estados**. Disponível em <https://www.cnabrazil.org.br/noticias/dia-da-banana-fruta-e-cultivada-em-todos-os-estados>. Acesso: 10 de janeiro de 2022.

**Codex Alimentarius**. FAOStat – Glossary search. 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-odexalimentarius/codextexts/dbs/pestres/glossary/en/>> Acesso em: 09 Dez.2021.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 2. ed. Campinas: Unicamp, 2009, cap 1 e 9.

COUTINHO, C. F. B.; GALLI, A.; MAZO, L. H.; MACHADO, S. A. S. **Carbendazim e o meio ambiente: degradação e toxidez**. Biblioteca digital de periódicos. . Ecologia e meio ambiente. 2006. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/view/7480/5349>> Acesso: 30 de março 2022.

CUNICO M. M. *et al.* **Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica**. Visão acadêmica, Curitiba, v.9, 2008.

EMBRAPA. **Banana: o produtor pergunta, a Embrapa responde** / editores técnicos, Marcelo Bezerra Lima, Sebastião de Oliveira e Silva, Cláudia Fortes Ferreira. – 2 ed. rev. e ampl. – Brasília, DF: Embrapa, 2012. 214p.

EMBRAPA. **O cultivo da banana** / Ana Lúcia Borges, Luciano da Silva Souza, editores; autores, Aldo Vilar Trindade... [ et al.]. - Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 279p.

EMBRAPA. **Produção Brasileira de banana 2020**. Disponível em: <[http://www.cnpmf.embrapa.br/Base\\_de\\_Dados/index\\_pdf/dados/brasil/banana/b1\\_banana.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/banana/b1_banana.pdf)> Acesso em: 12 de janeiro de 2022.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). YADAV, I. C.; DEVI, N. L. **Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment**. Environmental science and engineering: Toxicology. Cap. 7, v. 6, p. 140-158. 2017. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/313445102\\_Pesticides\\_Classification\\_and\\_Its\\_Impact\\_on\\_Human\\_and\\_Environment](https://www.researchgate.net/publication/313445102_Pesticides_Classification_and_Its_Impact_on_Human_and_Environment)>. Acesso em: 13 dez. 2021.

FENIK, J.; TANKIEWIC, M.; BIZIUK, M. **Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables**. Trends Anal. Chem., v. 30, p. 814, 2011.

FIGUEIREDO, E. C.; BORGES, K. B.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1ª ed. LTC, Rio de Janeiro, 2015.

FREITAS, S.; SERAFIM, F.; LANÇAS, F. **Determination of Target Pesticide Residues in Tropical Fruits Employing Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD) Extraction Followed by High Resolution Gas Chromatography**. Revista da Sociedade Brasileira de Química, 2018.

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

GOPINATHAN, Suganthi; NIKITA Awasthi; KOUSIKA, J.; KAITHAMALAI, Bhuvaneshwari; SRIDHARAN, S.. **Determination of thiamethoxam residues in banana stem and fruit through LC-MS/MS**. Environmental Monitoring and Assessment, 2018. p. 190.

IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017-2018: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil**. Rio de Janeiro, 2020.

ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE), 2005. < <http://www.ich.org/>>. Acesso em fevereiro de 2022.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações para validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008, ver.4, 2011.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE008, revisão 07, 2020.

KRUVE, A.; KUNNAPAZ, A.; HERODES, K.; LEITO, I. **Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry**. J. Chromatogr. A, v. 1187, p. 58-66, 2008.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. **Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review**. Anal Bioanal Chem, v. 389, p. 1663-1683, 2007.

LANÇAS, F. M. **A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”?** II. **A escolha do analisador de massas**. Scientia Chromatographica, v. 5, p. 27-46, 2013.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna**. Campinas: Átomo, 2009, cap. 4

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: Editora RiMa, 2004, pag. 62.

LEHOTAY, S.; MASTOVSKA, K.; YUN, S. **Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue Analysis in Fatty Food Matrixes**. Journal of AOAC International, v. 88, p. 630-638, 2005.

LI, W.; MORGAN, M. K.; GRAHAM, S. E.; STARR, J. M. **Measurement of pyrethroids and their environmental degradation products in fresh fruits and vegetables using a modification of the quick easy cheap effective rugged safe (QuEChERS) method**. Talanta, v. 151, p. 42-50, 2016.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. **UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes**. Scientia Chromatographica, v. 4, p. 197-207, 2012.

MAY, M. M.; FERRONATO, G.; BANDEIRA, N. M. G.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R.; ADAIME, M. B. **Determination of pesticide residues in soy-based beverages using a QuEChERS method (with clean-up optimized by central composite design) and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. Food Analytical Methods, v. 10, p. 369-378, 2017.

MEIRA, A. P. G. **Técnicas de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal: uma revisão**. Segurança Alimentar e Nutricional, v. 22, n. 2, p. 766-777. Campinas, 2015.

MELO, A. C. P. A. de. **Desenvolvimento, avaliação físico-química e sensorial de bananada com propriedades funcionais**. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 21. 2012.

MENDONÇA, R. A. F. de. **Validação e implementação de método analítico multirresíduo para determinação de agrotóxicos em banana por CLUE-EM/EM**. Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde, Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

MORENO-GONZÁLEZ, D.; HUERTAS-PÉRES, J. F.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; GÁMIZ-GRACIA, L. **Determination of carbamates in edible vegetable oils by ultra-high performance liquid chromatograph-tandem mass spectrometry using a new clean-up based on zirconia for QuEChERS methodology**. Talanta, v. 128, p. 299-304, 2014.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. **QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos.** Scientia Chromatographica v. 3, p. 51, 2011.

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

RAVELO-PÉREZ, L. M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; ASENSIO-RAMOS, M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á. **Ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of pesticides from bananas.** Journal of Chromatography A, v. 1216, p. 7336-7345, 2009.

RIBANI, M.; BOTTOLI C. B. G.; COLLINS C. H.; JARDIM I. C. S. F.; MELO L. F. C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Química Nova. v. 27, p. 771-780, 2004.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. **Recent trends in sample preparation and liquid chromatography/mass spectrometry for pesticide residue analysis in food and related matrixes.** Journal of AOAC International, v. 98, p. 1143-62, 2015.

SANTE (2021). **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed.** SANTE/12682/2019. Disponível em: <[https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlIALL/SANTE\\_11312\\_2021.pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlIALL/SANTE_11312_2021.pdf)>. Acesso em: 21 jan. 2022.

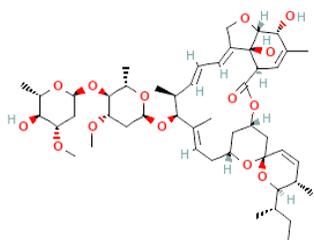
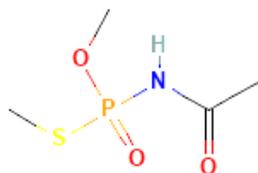
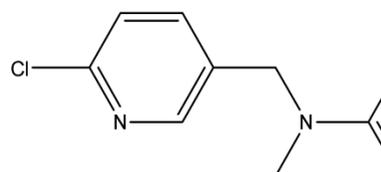
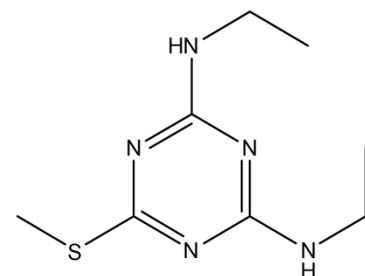
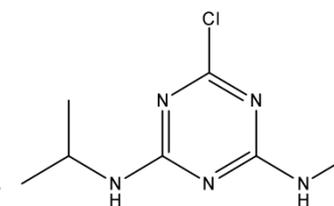
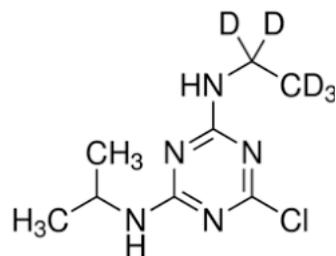
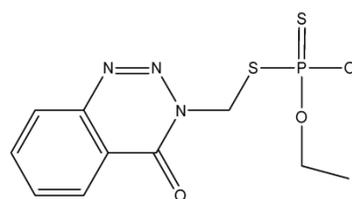
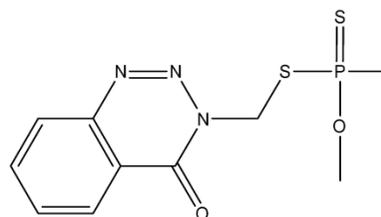
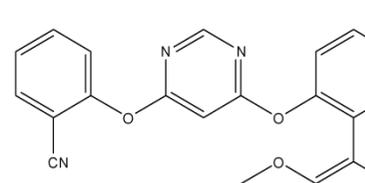
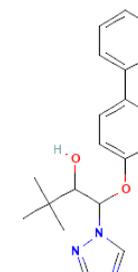
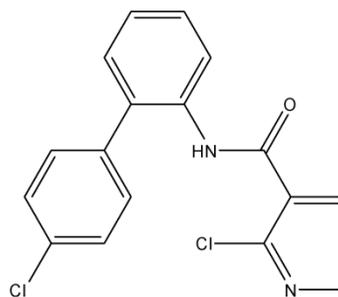
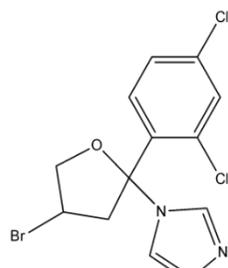
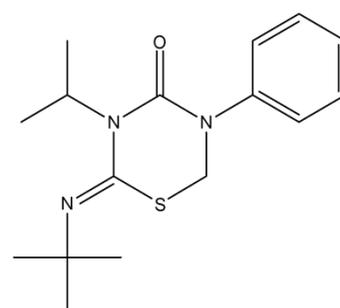
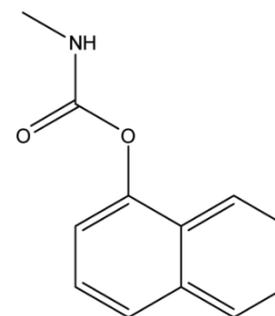
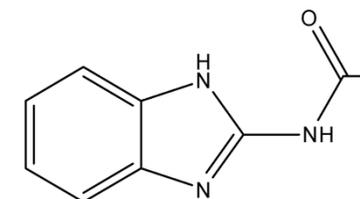
TACO. **Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP.**- 4. ed. rev. e ampl. -- Campinas: NEPA- UNICAMP, 2011. Disponível em <[https://www.cfn.org.br/wpcontent/uploads/2017/03/taco\\_4\\_edicao\\_ampliada\\_e\\_revisada.pdf](https://www.cfn.org.br/wpcontent/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf)>. Acesso 10 jan. 2022.

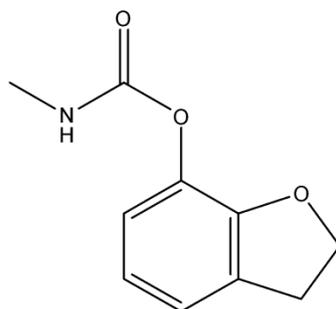
TSIPI, D.; BOTITSI, H.; ECONOMOU, A. **Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticide Residues and their Metabolites.** Wiley, 2015.

ZANELLA, R.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; MARTINS, M. L. QuEChERS. In: BORGES, K. B. *et al.* **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos.** 1. ed. Rio de Janeiro, LTC, 2015. cap. 24.

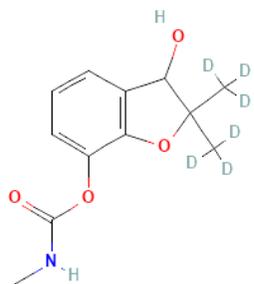
## ANEXOS

## ANEXO A: ESTRUTURA DOS COMPOSTOS UTILIZADOS NO TRABALHO.

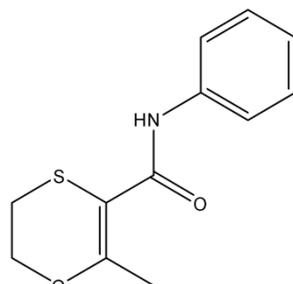
Abamectina (*Abamectin*)Acefato (*Acephate*)Acetamiprido (*Acetaprimid*)Ametrina (*Ametryn*)Atrazina (*Atrazine*)Atrazina deuterada  
(*Atrazine d-5*) - PCAzinfós etílico (*azinphos ethyl*)Azinfós metílico  
(*Azinphos methyl*)Azoxistrobina  
(*Azoxystrobin*)Bitertanol  
(*Bitertanol*)Boscalida (*Boscalid*)Bromuconazol  
(*Bromuconazole*)Buprofenzina (*Buprofenzin*)Carbaril (*carbaryl*)Carbendazim  
(*Carbendazim*)



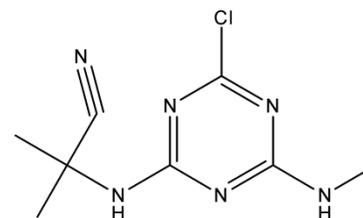
**Carbofurano  
(Carbofuran)**



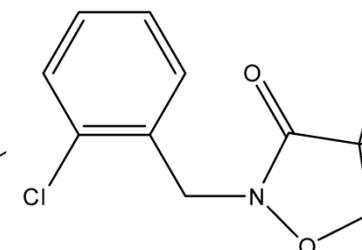
**Carbofurano -3- hidróxido  
(Carbofuran-3-hydroxy)**



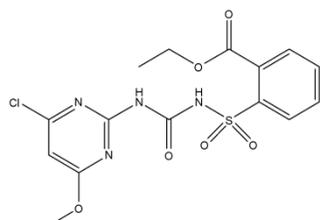
**Carboxim (Carboxym)**



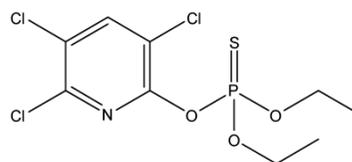
**Cianazina (Cyanazine)**



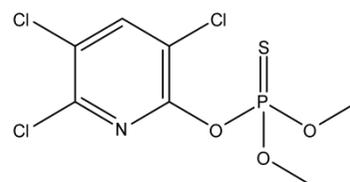
**Clomazona (Clomazone)**



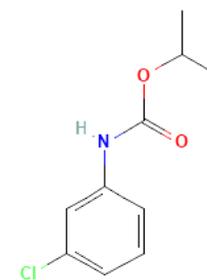
**Clorimurómetílico (ethyl  
chloride)**



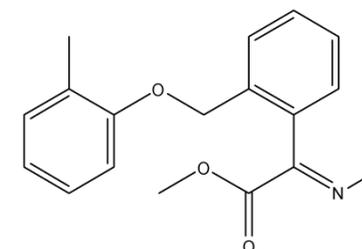
**Clorpirifós etílico  
(chlorpyrifos ethyl)**



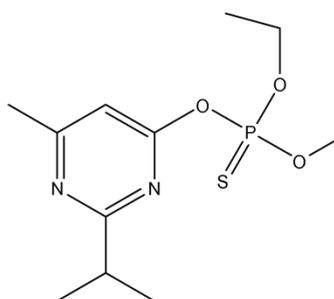
**Clorpirifós metílico  
(chlorpyrifos methyl)**



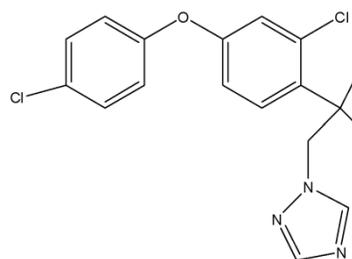
**Clorprofam  
(Chlorpropham)**



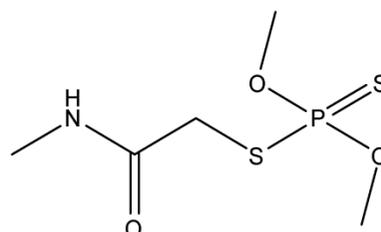
**Cresoxim - metílico  
(Kresoxim - methyl)**



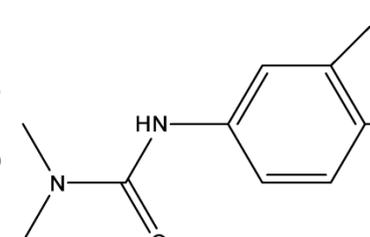
**Diazinona (Diazinon)**



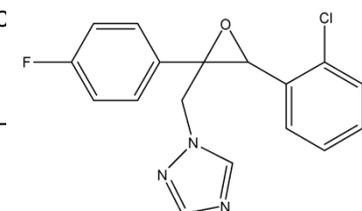
**Difenonazol  
(Difenoconazole)**



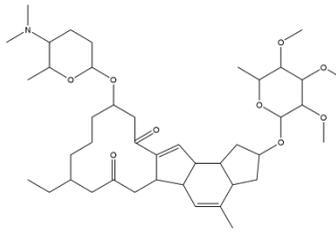
**Dimetoato (Dimethoate)**



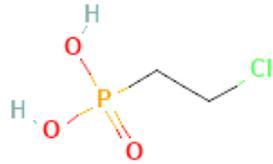
**Diuron (Diuron)**



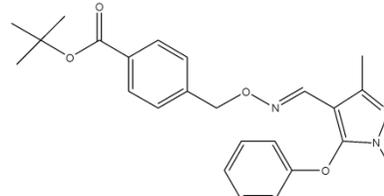
**Epoxiconazol  
(Epoxiconazole)**



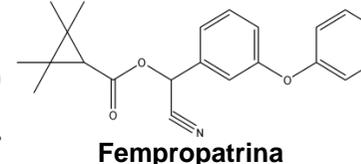
**Espinosade (Spinosad)**



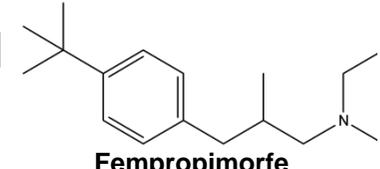
**Etefon (Ethephon)**



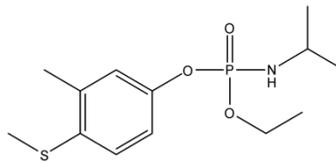
**Fempiroximato (fenpyroximate)**



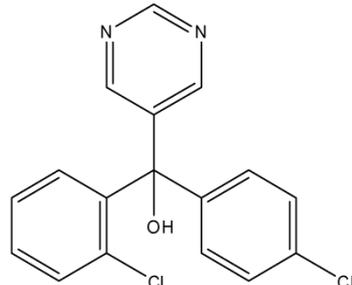
**Fempropatrina (Fenpropathrin)**



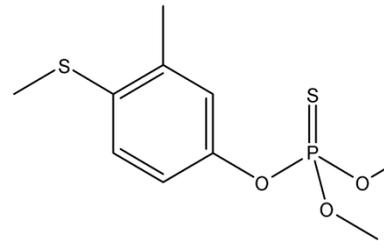
**Fempropimorfe (Fenpropimorph)**



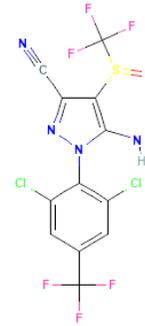
**Fenamifós (Fenamiphos)**



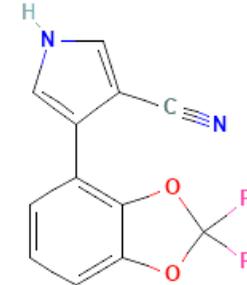
**Fenarimol**



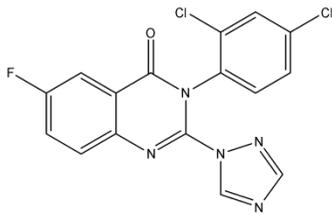
**Fentiona (Fenthion)**



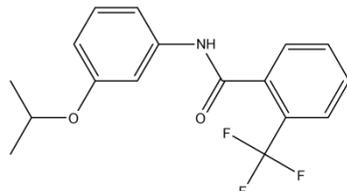
**Fipronil (fipronil)**



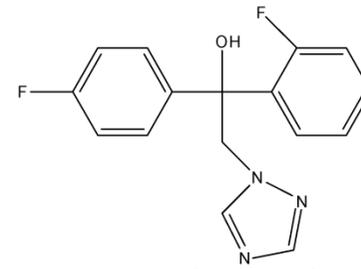
**Fludioxonil (Fludioxonil)**



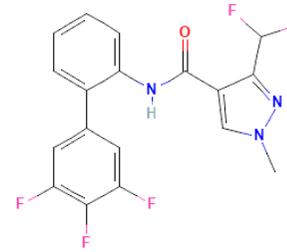
**Fluquinconazol (Fluquinconazole)**



**Flutolanil (Flutolanil)**



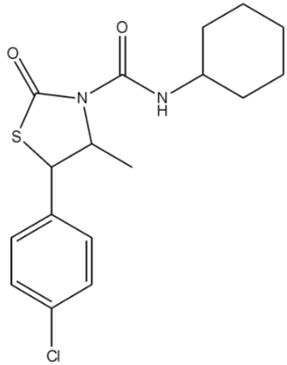
**Flutriafol (Flutriafol)**



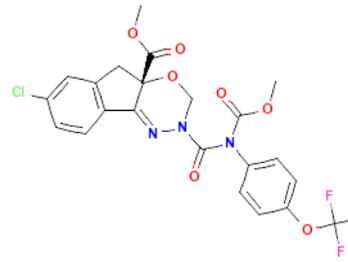
**Fluxapiroxade (Fluxapyrixad)**



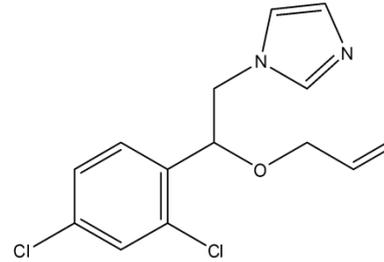
**Fostiazato (fostiazate)**



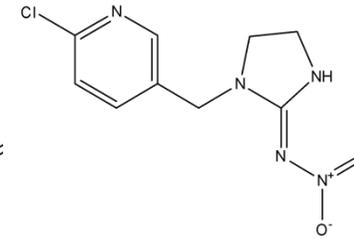
**Hexitiazoxi**  
(*Hexythiazox*)



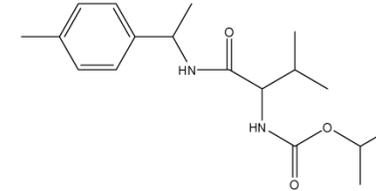
**Indoxacarbe** (*Indoxacarb*)



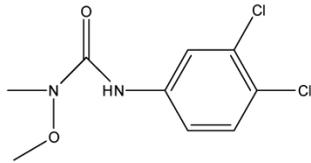
**Imazalil**



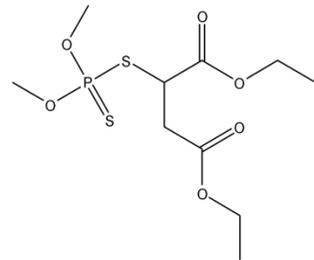
**Imidacloprido**  
(*Imidacloprid*)



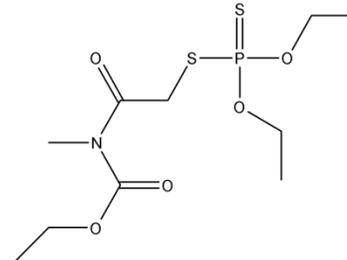
**Iprovalicarbe**  
(*Iprovalicarb*)



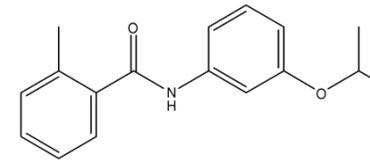
**Linurom** (*Linuron*)



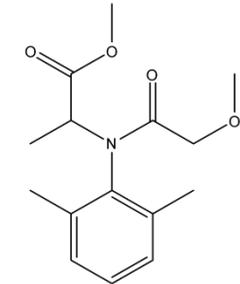
**Melationa** (*Melation*)



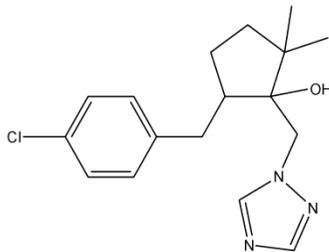
**Mecarbam** (*Mecarbam*)



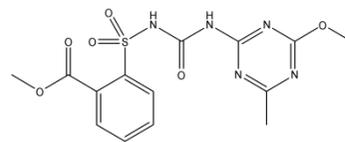
**Mepronil** (*Mepronil*)



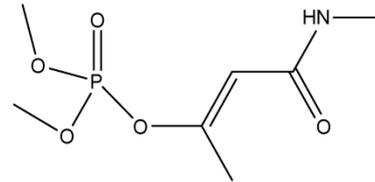
**Metalaxil** (*Metalaxyl*)



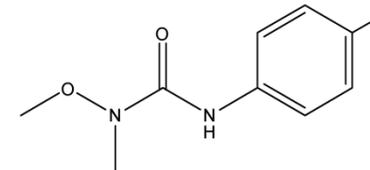
**Metconazol**  
(*Metconazole*)



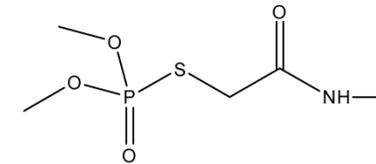
**Metsulfurom metílico**  
(*Metsulfuron methyl*)



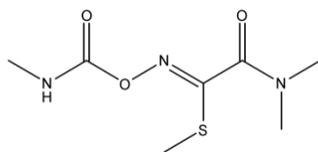
**Monocrotofós**  
(*Monocrotophos*)



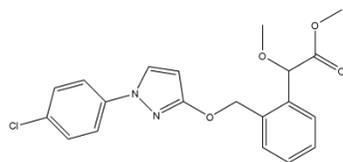
**Monolinurom**  
(*Monolinurom*)



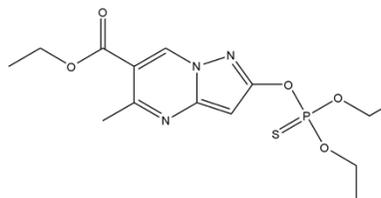
**Ometoato** (*Omethoate*)



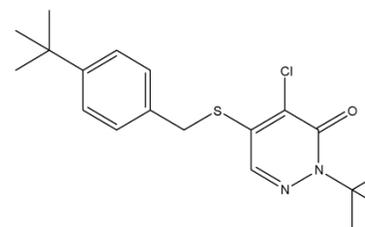
**Oxamil (Oxamyl)**



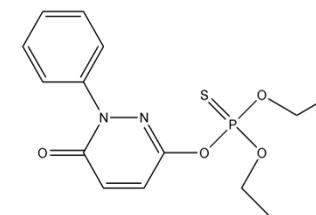
**Piraclostrobina (Pyraclostrobin)**



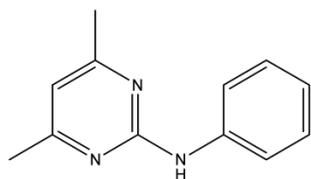
**Pirazofós (Pirazophos)**



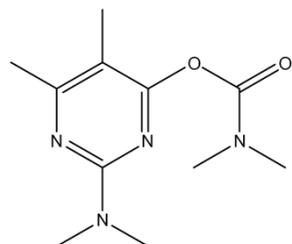
**Piridabem (Pyridaben)**



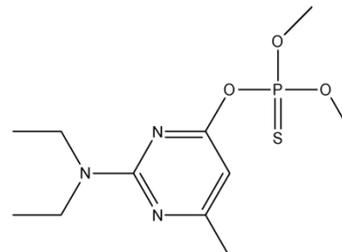
**Piridafentiona (Pyridaphenthion)**



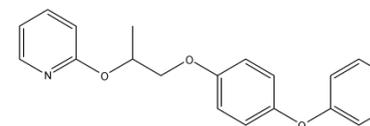
**Pirimetanil (Pyrimethanil)**



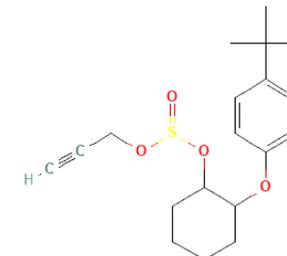
**Pirimicarbe (Pirimicarb)**



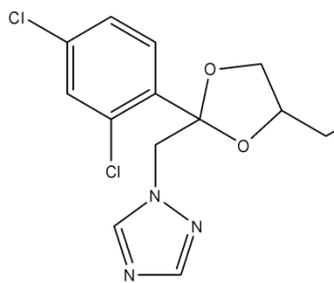
**Pirimifós metílico (Pirimiphos methyl)**



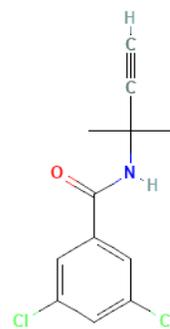
**Piriproxifem (Pyriproxifen)**



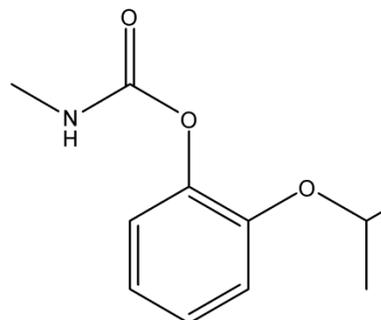
**Propargito (Propargite)**



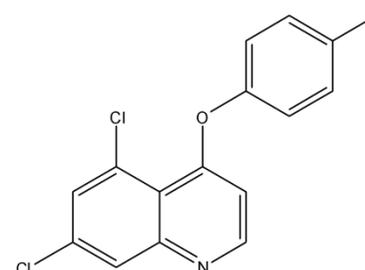
**Propiconazol (Propiconazole)**



**Propizamida (Propyzamide)**



**Propoxur**



**Quinoxifem (Quinoxifen)**



**Saflufenacil (Saflufenacyl)**

