

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

Karina Ues Larentis

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO  
PRETO EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

Santa Maria, RS  
2023

**Karina Ues Larentis**

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO PRETO  
EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**, área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

Santa Maria, RS  
2023.

## Ficha catalográfica

**Karina Ues Larentis**

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO PRETO  
EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**, área de concentração Química Analítica.

**Aprovada em 10 de março de 2023**

---

**Osmar Damian Prestes, Dr. (UFSM)**  
(Orientador)

---

Eliane Pereira Dos Santos, Dra. (UFSM)

---

Magali Kemmerich, Dra. (UNIPAMPA)

Santa Maria, RS  
2023

Dedico ao meu filho, que soube entender a minha ausência nas horas de estudo,  
bem como a minha irmã Carolina, por ter acreditado sempre em mim e não me  
deixar desistir de meu sonho!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus por me dar forças e manter a minha fé durante essa jornada.

Agradeço à minha família, minha mãe, minhas irmãs, meu filho e meu padrasto, que sempre foram meu porto seguro, que souberam entender minha falta durante esse período, que me apoia em todos os momentos difíceis, e que desenvolveram o papel de verdadeira família, dando todo apoio e afeto que meu querido filho necessitava, neste período de ausência.

Agradeço aos professores do LARP Renato e Osmar, que me receberam de braços abertos, me deram essa grande oportunidade de crescimento profissional e compartilharam comigo seus conhecimentos.

Um agradecimento especial ao meu orientador, Prof. Dr. Osmar, que sempre estava disposto a me ajudar e fez seu papel com excelência.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório, que tornaram a jornada mais leve e divertida, sou grata pela amizade de todos vocês.

Agradeço, especialmente, a grande amiga e colega de longa data Cleusa, que me acolheu em sua casa durante toda essa jornada, sempre me apoiando, me incentivando e acreditando em mim e em meu potencial. Você que me fez enxergar que com muita dedicação e força de vontade eu poderia realizar esse sonho de ser mestre! Provou mais uma vez o quanto essa nossa amizade vale ouro! Serei eternamente grata por tudo que faz e sempre fez por mim! Obrigado amiga!

Agradeço ao meu colega Leonardo, que me ajudou nas práticas do laboratório e me socorreu nos momentos de desânimo e dificuldade, bem como a colega e amiga Ana.

Agradeço à minha amiga de infância Mariana, que esteve sempre presente, acreditando e torcendo pelo meu sucesso!

Agradeço a Escola Tancredo Neves e Visconde de Taunay, por entender e contribuir para que esse grande sonho se tornasse realidade.

Agradeço à UFSM e aos professores do Programa de Pós Graduação em Química (PPGQ) pela contribuição essencial na minha formação.

## RESUMO

### DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO PRETO EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS E UHPLC-MS/MS

AUTORA: Karina Ues Larentis

ORIENTADOR: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) sendo que 60% de sua população consome esta leguminosa. Durante o cultivo de feijão, agrotóxicos podem ser utilizados em qualquer etapa de desenvolvimento da planta. No entanto, devido aos efeitos adversos na saúde humana, há preocupações crescentes sobre os riscos associados à exposição a estas substâncias em alimentos. Conseqüentemente, muitos países estabeleceram limites máximos de resíduos (LMRs) para agrotóxicos em alimentos. O monitoramento analítico é frequentemente realizado para determinar se os resíduos estão presentes, visando a segurança alimentar, regulamentação, responsabilidade do produto, qualidade, pesquisa e/ou rotulagem de alimentos proposto. O objetivo deste trabalho foi avaliar o método multirresíduo simples e rápido para a determinação de 85 pesticidas em feijão preto utilizando cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas em séries (UHPLCMS/MS). A etapa de extração foi avaliada testando as versões não tamponada (original) e tamponada (acetato e citrato) do método QuEChERS. A etapa final de extração foi realizada com 10 g de amostra (slurry) e 10 mL de acetonitrila, com a adição dos sais do método QuEChERS citrato. Avaliou-se o desempenho de diferentes sorventes para a etapa de limpeza, como C18, amina primária secundária (PSA) e carvão grafitizado (GCB). A determinação de resíduos de agrotóxicos foi realizada empregando sistema UHPLC-MS/MS com ionização eletrospray positiva e negativa no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM). A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, tamanho de partícula de 1,7 µm). A fase móvel utilizada consistiu em (A) água:metanol (98:2, v/v) e (B) metanol:água (98:2, v/v), ambas contendo 5 mmol L<sup>-1</sup> de formato de amônio e fórmica ácido 0,1% (v/v), com vazão constante de 0,225 mL min<sup>-1</sup>. O volume de injeção foi de 10 µL e o tempo total de análise foi de 10 min. Os resultados dos testes de exatidão e precisão, avaliados nos níveis de 10, 25 e 50 e 100 µg kg<sup>-1</sup> (n = 6), mostraram-se adequados, pois apresentaram recuperações entre 70 e 120%, com RSD ≤ 20% para 85 compostos. Os LOQs do método ficaram entre 10 e 50 µg kg<sup>-1</sup>. Os resultados sugerem que o método desenvolvido é adequado para análises de resíduos de agrotóxicos em feijão preto.

**Palavras-chave:** alimentos, cromatografia, preparo de amostras, espectrometria de massas

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF A MULTIRRESIDE METHOD FOR DETERMINATION OF PESTICIDES IN BLACK BEANS USING MODIFIED QUECHERS METHOD AND LC-MS/MS

AUTHOR: Karina Ues Larentis

ADVISOR: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

Brazil is the third largest producer of black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in the world, with 60% of its population consuming this legume. During bean cultivation, pesticides can be used at any stage of development and in any part of the plant. However, due to their adverse effects on human health, there are growing concerns about the risks associated with residual exposure to these substances in foods. Consequently, many countries have established maximum residue limits (MRLs) for pesticides in food. Analytical monitoring is often performed to determine if residues are present, targeting food safety, regulation, product liability, quality, research and/or proposed food labeling. The objective of this work was to evaluate the simple and rapid multi-residue method for the determination of 85 pesticides in black beans using ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLCMS/MS). The extraction step was optimized testing the unbuffered (original) and buffered (acetate and citrate) versions of QuEChERS method. The final extraction step was performed with 10 g of sample (slurry) and 10 mL of acetonitrile, with the addition of the citrate QuEChERS salts. The performance of different sorbents for the cleanup step were evaluated, such as C<sub>18</sub>, secondary primary amine (PSA) and graphite carbon black (GCB). The pesticide residue analysis was performed with Acquity UPLCTM liquid chromatography coupled to a Xevo TQ MS/MS triple quadrupole mass spectrometer (Waters Corporation, USA) with positive and negative electrospray ionization interface in multiple selected reaction monitoring (SRM) mode. The chromatographic separation was performed using an BEH C<sub>18</sub> column (50 mm x 2.1 mm, 1.7 µm particle size). The mobile phase used consisted of (A) water:methanol (98:2, v/v) and (B) methanol:water (98:2, v/v), both containing 5 mmol L<sup>-1</sup> of ammonium formate and formic acid 0.1% (v/v), with a constant at flow rate of 0.225 mL min<sup>-1</sup>. The injection volume was 10 µL and total run time was 10 min. The results of the accuracy and precision tests, evaluated at levels of 10, 25 and 50 e 100 µg kg<sup>-1</sup> (n = 6), proved to be adequate, since they showed recoveries between 70 and 120%, with RSD ≤ 20% for 85 compounds. The method LOQs were between 10 and 50 µg kg<sup>-1</sup>. The results suggest that the developed method is suitable for the regulatory-purpose analyses of pesticides in black beans.

**Keywords:** food, chromatography, sample preparation, mass spectrometry



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cultivares de feijão mais consumidos no Brasil, com diferentes cores, formatos e tamanhos.....	22
Figura 2 – Método QuEChERS, original, acetato e citrato. <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
Figura 3 - Cromatograma SRM obtido por UHPLC-MS/MS a partir de uma solução padrão 10 µg L <sup>-1</sup> preparada no extrato da matriz.....	65
Figura 4 - Comparação da eficiência de extração das diferentes versões do método QuEChERS (original, acetato e citrato).....	67
Figura 5 - Efeito matriz resultante para cada versão do método QuEChERS testado (T1: original, T2: acetato e T3: citrato).....	69
Figura 6 - Extratos obtidos após utilização de diferentes sorventes na etapa de limpeza, em ordem visual de remoção dos pigmentos.....	70
Figura 7 – Avaliação visual do extrato final obtido após a realização da etapa de evaporação dos extratos obtidos pelo método QuEChERS citrato com diferentes sorventes de limpeza .....	71
Figura 8 - Gráfico da eficiência de remoção de coextrativos obtidos a partir dos testes gravimétricos utilizando o QueChERS citrato com diferentes sorventes PSA (T5), C18 (T6), GCB (T7), PSA+C18+GCB (T8) na etapa de limpeza.....	72
Figura 9 - Cromatogramas obtidos a partir de injeções no sistema GC-MS/MS no modo <i>full scan</i> , do extrato “branco” de feijão a) sem a etapa de limpeza (preto) e extratos obtidos após a etapa de limpeza utilizando os sorventes: b) PSA (vermelho) c) C18 (verde) d) GCB (azul) e e) combinação dos sorventes PSA+C <sub>18</sub> + GCB (roxo) .....	73
Figura 10 - Resultado do efeito matriz resultante para os 85 agrotóxicos avaliados na etapa de limpeza, empregando diferentes tipos de sorventes utilizados. ....	73
Figura 11 – Número de compostos com recuperação (70-120% e RSD ≤20%), dos 85 agrotóxicos avaliados, obtidos através da limpeza de extrato por diversos sorventes.....	74
Figura 12 - Procedimento de extração e limpeza de extrato otimizado para determinação de resíduos de agrotóxicos em feijão preto por UHPLC-MS/MS.....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA). Universidade de São Paulo (USP) de composição do feijão preto cru, cru por 100 g de parte comestível. ....	23
Tabela 2 – Classes toxicológicas dos agrotóxicos com base na DL50 <sup>1</sup> .....	25
Tabela 3 – Classificação dos agrotóxicos de acordo com sua classe e espécie alvo destinada .....	26
Tabela 4 – Compostos registrados no Brasil para uso na cultura de feijão – Limite Máximo de Resíduo (LMR), mg kg <sup>-1</sup> estabelecidos de acordo com a ANVISA, União Europeia e Codex Alimentarius.....	29
Tabela 5 – Ingredientes ativos comercializados no Brasil, entre os anos de 2009 a 2020, por tonelada. ....	36
Tabela 6 – Revisão dos métodos de preparo de amostra e condições cromatográficas empregadas na determinação de resíduos de agrotóxicos em feijão e outras matrizes de origem vegetal. ....	40
Tabela 7 – Parâmetros avaliados para determinação de resíduos de agrotóxicos por cromatografia em um método analítico.....	45
Tabela 8 – Amostras de feijão preto avaliadas neste estudo, bem como a cidade de ensacamento.....	48
Tabela 9 – Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido e propriedades físico-químicas.....	50
Tabela 10 – Gradiente de fase móvel utilizado na determinação de resíduos de agrotóxicos em feijão preto por UHPLC-MS/MS. ....	55
Tabela 11 – Condições cromatográficas do sistema UHPLC-MS/MS .....	56
Tabela 12 – Testes de extração realizados para análise de resíduos de agrotóxico em feijão. ....	57
Tabela 13 – Diferentes sorventes (C18, PSA, GCB) avaliados na etapa de limpeza por QuEChERS.....	59
Tabela 14 – Parâmetros de validação avaliados no desenvolvimento do método analítico proposto. ....	60
Tabela 15 – Compostos determinados por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ), voltagem do cone (VC), íons precursores e produto, e energias de colisão (EC) utilizados. ....	61

Tabela 16 – Resumo dos resultados dos ensaios de fortificação em cada versão do método QuEChERS, para 85 agrotóxicos avaliados. ....	66
Tabela 17 – Comparação do efeito matriz (%), por faixa percentual e calculado nos métodos QuEChERS (T1: original, T2: acetato e T3: citrato), para os 85 agrotóxicos avaliados. ....	68
Tabela 18 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS: LOQ, LOD, linearidade (coeficiente de determinação, $r^2$ ), exatidão e precisão em termos de repetibilidade e precisão intermediária e efeito matriz (EM). ....	82
Tabela 19 – Resíduos de agrotóxicos encontrados nas amostras de feijão preto, empregando o método desenvolvido neste trabalho. ....	88
Tabela 20 – Resultados da análise das amostras reais de feijão, em relação a concentração encontrada, limite de quantificação do método (LOQ) e o limite máximo de resíduos (LMR) permitidos pela ANVISA, UE e Codex Alimentarius. ....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação de Químicos Analíticos Oficiais, do inglês <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CGVIAGRO	Coordenação-Geral do Sistema de Vigilância Agropecuária
CV	Coeficiente de variação
C <sub>18</sub>	Octadecilsilano
DSV	Departamento de Sanidade Vegetal e Insumos Agrícolas
DIPOV	A Inspeção de Produtos de Origem Vegetal
d.p.	Diâmetro de partícula
DL <sub>50</sub>	Dose Letal para 50% dos organismos testes
DOQ-CGCRE	Documento orientativo da Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva, do inglês <i>dispersive solid phase extraction</i>
EC	Energia de colisão
ECD	Detecção por captura de elétrons, do inglês <i>electron capture detection</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EM	Efeito matriz
ESI	Ionização por eletronebulização, do inglês <i>electrospray ionization</i>
EU	União Européia, do inglês <i>European Union</i>
EUA	Estados Unidos da América
Ev	Elétrons <i>volt</i>
FA	Fortificação na amostra
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês <i>Food and Agriculture Organization</i>
FPD	Detecção fotométrica de chama, do inglês <i>flame photometric detection</i>
FTD	Detector termiônico de chama, do inglês <i>flame thermionic detector</i> ,

FM	Fase Móvel
GC	Cromatografia gasosa, do inglês <i>gas chromatography</i>
GCB	Carbono grafitizado, do inglês <i>graphitized carbon black</i>
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês <i>Gas chromatography coupled to mass spectrometry</i>
GC-MS/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês <i>gas chromatography coupled to tandem mMass spectrometry</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>
IA	Ingrediente ativo
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
Koc	Constante de sorção normalizado para o teor de carbono orgânico;
LARP	Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas
LC	Cromatografia líquida, do inglês <i>liquid chromatography</i>
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 resíduos
LOD	Limite de detecção, do inglês <i>limit of detection</i>
log Kow	Coeficiente de partição octanol-água
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>limite of quantification</i>
<i>m/z</i>	Razão massa carga
MAPA	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
N	número de replicatas
N <sub>2</sub>	Nitrogênio
n.d.	não detectado
MSPD	Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês <i>Matrix Solid Phase Dispersion</i>
OC	Organoclorados
OP	Organofosforados

PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PC	Padrão de controle
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Padrão interno
pKa	Constante de dissociação ácida
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PSA	Amina primária secundária, do inglês <i>primary secondary amine</i>
Q1	Primeiro quadrupolo
Q2	Segundo quadrupolo ou cela de colisão
Q3	Terceiro quadrupolo
QqLIT	Triplo quadrupolo-linear íon trap, do inglês <i>triple quadrupole-linear ion trap</i>
QuEChERS	Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, acrônimo do inglês <i>quick, easy, cheap, effective, rugged and safe</i>
r <sup>2</sup>	Coefficiente determinação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Rec	Recuperação
Rpm	Rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>relative standard deviation</i>
SANTE	Saúde e Proteção do Consumidor, do francês <i>Santé et protection des consommateurs</i>
SPME	Extração em fase sólida dispersiva, do inglês <i>solid phase extraction</i>
SRM	Monitoramento de Reações Seleccionadas, do inglês <i>Selective Reaction Monitoring</i>
TIC	Cromatograma de íons totais
TID	Detector de ionização termiônica, do inglês <i>thermionic ionization detector</i>
TPP	Trifenilfosfato
TQ	Triplo quadrupolo
t <sub>R</sub>	Tempo de retenção
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria

UHPLC	Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência, do inglês <i>ultra high performance liquid chromatography</i>
UHPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra-alta performance acoplada a espectrometria de massa em série, do inglês <i>ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry</i>
UV	Ultravioleta
V	<i>Volts</i>
v/v	Razão volume volume
VC	Voltagem do cone
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>
.....	<b>18</b>
1.1 OBJETIVOS .....	20
<b>1.1.1 Objetivos específicos.....</b>	<b>20</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>21</b>
2.1 FEIJÃO.....	21
<b>2.1.1 Produção e consumo de Feijão .....</b>	<b>21</b>
2.2 AGROTÓXICOS.....	24
<b>2.2.1 Classificação e toxicidade dos agrotóxicos .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.2 Monitoramento de resíduos e contaminantes em alimentos e Limite Máximo de Resíduos.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.3 Plano nacional de controle de resíduos e contaminantes em produtos de origem vegetal.....</b>	<b>35</b>
2.3 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA determinação DE resíduos de AGROTÓXICOS EM FEIJÃO.....	37
<b>2.3.1.1 Modificações no método QuEChERS .....</b>	<b>38</b>
2.4 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS.....	42
2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	44
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
3.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	46
3.2 REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS .....	47
3.3 AMOSTRAS .....	48
3.4 COMPOSTOS SELECIONADOS E PREPARO DE SOLUÇÕES ANALÍTICAS .....	49
3.5 PREPARO E UTILIZAÇÃO DO PADRÃO INTERNO (PI) E PADRÃO DE CONTROLE (PC).....	54
3.6 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO PRETO.....	54



<b>3.6.1 Escolha da fase móvel</b> .....	<b>54</b>
<b>3.6.2 Condições utilizadas no sistema UHPLC-MS/MS para determinação multirresíduo de agrotóxicos</b> .....	<b>55</b>
<b>3.7 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO PRETO UTILIZANDO UHPLC-MS/MS</b> .....	<b>56</b>
<b>3.7.1 Testes de extração</b> .....	<b>56</b>
<b>3.7.1.1 Avaliação da eficiência de extração de cada uma das versões do método QuEChERS</b> .....	<b>58</b>
<b>3.7.1.2 Avaliação de diferentes sorventes na etapa de limpeza do método QuEChERS</b> .....	<b>58</b>
<b>3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO PRETO</b> .....	<b>59</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO PRETO</b> .....	<b>61</b>
<b>4.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO PRETO</b> .....	<b>66</b>
<b>4.2.1 Avaliação da extração pelo método QuEChERS</b> .....	<b>66</b>
<b>4.2.2 Avaliação dos sorventes utilizados na etapa de limpeza do extrato</b> .....	<b>70</b>
<b>4.2.2.1 Avaliação gravimétrica dos coextrativos obtidos após realização da etapa de limpeza</b> .....	<b>71</b>
<b>4.2.2.1 Avaliação da presença de coextrativos empregando GC-MS/MS no modo varredura (full scan)</b> .....	<b>72</b>
<b>4.2.2.2 Avaliação do efeito matriz nos extratos obtidos após etapa de limpeza</b>	<b>73</b>
<b>4.2.2.3 Avaliação dos percentuais de recuperação nos extratos obtidos após etapa de limpeza</b> .....	<b>74</b>
<b>4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO</b> .....	<b>75</b>
<b>4.3.1 Seletividade</b> .....	<b>77</b>
<b>4.3.2 Linearidade</b> .....	<b>78</b>

<b>4.3.3 Efeito Matriz .....</b>	<b>78</b>
<b>4.3.5 Exatidão e Precisão.....</b>	<b>80</b>
<b>4.3.4 Limite de detecção e de quantificação .....</b>	<b>81</b>
<b>4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO EM AMOSTRAS COMERCIAIS.....</b>	<b>86</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>92</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma espécie amplamente cultivada no mundo, e praticamente em todo território brasileiro (PEREIRA et al., 2009; BARBOSA & GONZAGA, 2012). O Brasil é o quarto maior produtor mundial de feijão, atrás de Mianmar e Índia, com uma produção correspondente a aproximadamente 10% dos 28,9 milhões de toneladas produzidas em 2019, segundo a FAO (2021).

A dupla arroz e feijão é o prato básico presente no consumo diário dos brasileiros, o feijão é uma fonte alimentar rica em proteína vegetal, carboidratos, minerais e vitaminas e um componente básico na alimentação brasileira (WANDER, A. E. SILVA et al., 2013).

Atualmente, a produção agrícola utiliza diversos agrotóxicos, que são considerados essenciais para a proteção das plantas quanto ao ataque de pragas, doenças e ervas daninhas, garantindo a qualidade e produtividade da produção (EMBRAPA, 2011). Contudo, quando utilizados em excesso, apresentam um enorme risco a saúde humana, além de ocasionar contaminação dos mananciais de água, do solo e dos alimentos (ZANELLA et al., 2015; PRESTES et al., 2009). Uma possível consequência do seu uso, quando o manejo é realizado de forma incorreta, pode ser a presença de resíduos nos alimentos (EUROPEAN COMMISSION, 2011).

Entre as técnicas cromatográficas mais utilizadas para a determinação de resíduos de agrotóxicos, destaca-se a utilização da cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS do inglês, *ultra-high performance liquid chromatography coupled with serial mass spectrometry*). Esta técnica possibilita a determinação simultânea de um grande número de agrotóxicos em baixas concentrações ( $\mu\text{g L}^{-1}$  ou  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Além disso, apresenta excelente detectabilidade e tempo de análise reduzido quando comparada à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, *high-performance liquid chromatography*) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Os alimentos são considerados amostras complexas, em função dos altos teores de proteínas, gorduras, açúcares, pigmentos, entre outros constituintes. Assim, geralmente, se faz necessária a utilização de diferentes etapas de preparo de amostra, para a realização da extração dos resíduos de agrotóxicos (WU et al., 2011).

Entre os diferentes métodos de preparo de amostra, destaca-se o método QuEChERS (do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged, safe*) e suas

modificações. Este método é baseado em uma etapa de extração com acetonitrila e limpeza do extrato empregando a técnica de dispersão em fase sólida (d-SPE, do inglês, *solid phase dispersion*). Entre suas inúmeras vantagens, cita-se a possibilidade de ser aplicado em uma grande variedade de amostras e para diferentes compostos. Dependendo do tipo de amostra, sua versatilidade permite que várias combinações de sorventes possam ser utilizadas na etapa de limpeza, além de permitir o uso de diferentes técnicas cromatográficas (ANASTASSIADES et al., 2003).

Deste modo, a determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos é um desafio e de extrema importância para garantir a segurança dos alimentos e do consumidor.

## 1.1 OBJETIVOS

Avaliar a utilização do método QuEChERS como etapa de preparo de amostra na determinação multirresíduo de agrotóxicos em feijão preto, empregando sistema UHPLC-MSMS.

### 1.1.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar a eficiência de extração das diferentes versões do método QuEChERS (original, acetato e citrato);
- b) Avaliar, diferentes sorventes e combinações de sorventes visando a limpeza dos extratos e redução de coextrativos;
- c) Validar o método proposto de acordo com os parâmetros da legislação brasileira;
- d) Demonstrar a aplicabilidade do método validado para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de feijão preto provenientes de diferentes cidades do RS.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FEIJÃO

O feijão preto, pertence ao grupo das leguminosas, à família Fabacea, sendo citado como um dos alimentos mais antigos, estando presente nos primeiros registros da história da humanidade (LAJOLO; GENOVESE; MENEZES, 1996). Seu cultivo era realizado no Egito antigo e na Grécia, sendo considerado um símbolo da vida (EMBRAPA, 2010).

De acordo com a legislação brasileira duas espécies de feijão são cultivadas no Brasil: o feijão comum, espécie *Phaseolus vulgaris* (L.) e o feijão-caupi, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Destaca-se o tipo carioca, que representa 70% do mercado consumidor brasileiro, seguido pelo tipo preto, com 20% (BRASIL, 2008; PELOSO; MELO, 2005).

Em 2015, o Brasil foi considerado um dos maiores produtores e consumidores mundiais da espécie *Phaseolus vulgaris* (L.), respondendo a 11% da produção, atrás de Índia (14%) e Myanmar (13%) e à frente dos Estados Unidos (4%), China e México (4%) e Tanzânia (3%), por exemplo. (FAO, 2015).

#### 2.1.1 Produção e consumo de Feijão

O feijão-preto tem sua origem na América do Sul (ELIAS, 2007), era conhecido e consumido pelos nativos indígenas, chamado por grupos guaranis de: ora comanda, ora comaná, ora cumaná. Sua composição varia de acordo com o local do plantio, fatores ambientais e cultivar. Depois de colhido, realiza-se uma etapa de secagem para que se obtenha um teor de umidade recomendada (13 a 15%) e então possa ser armazenado (EMBRAPA, 2020).

Para o feijão comum, é possível conseguir até três safras anuais, sendo assim, o mesmo é considerado uma cultura atípica. A 1ª safra, é cultivada entre os meses de agosto a novembro sendo plantado nas Regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia, Tocantins e Rondônia. A 2ª safra, ocorre entre os meses de dezembro a abril, nas Regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e em único período de plantio no Norte, onde o feijão-comum é consorciado com o

milho. Por outro lado, a safra de 3ª época ou safra de inverno, acontece entre os meses de abril a julho, no Centro-Sul do Brasil (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2013).

Há diversos tipos de feijões disponíveis no mercado (Figura 1), mas nem todos são consumidos em grande escala. Os tipos vendidos no Brasil são o feijão comum, feijão carioca, feijão branco, feijão-de-corda ou fradinho, feijão-jalo, jalo-roxo, feijão-rosinha, feijão-azuki ou adzuki, esverdeado, feijão-bolinha ou manteiga, feijão-roxinho, entre outros (EMBRAPA, 2020).

Figura 1 - Cultivares de feijão mais consumidos no Brasil, com diferentes cores, formatos e tamanhos.



Fonte: Adaptada da Embrapa (2023).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a produção nacional de feijão na 1ª Safra da temporada 2019/20, foi de 609,6 mil toneladas, o que representa um aumento de 8,2% em relação às 563,4 mil toneladas produzidas no mesmo período da temporada anterior. O estado de Minas Gerais (176,1 mil ton) é o maior produtor nacional nesta 1ª Safra, seguido por São Paulo (112,5 mil ton), Goiás (98,8 mil ton) e Paraná (93,5 mil ton).

O feijão é consumido em diversos países, sendo que o continente americano corresponde a 43,2 % do consumo deste grão (EMBRAPA, 2017). Em 15 anos, a quantidade média per capita anual de feijão caiu 52%, variando de 12,394 kg, na edição 2002/2003 da pesquisa, para 5,908 kg em 2017/2018.

O consumo médio de feijão no Brasil, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2011), é de 182,9 g/hab/dia e, aproximadamente, 67 kg/hab/ano de feijão preparado, existindo preferências de cor e tipo de grão, com maior consumo na zona rural do que na zona urbana (IBGE, 2011).

Em geral, as leguminosas apresentam altos teores de proteínas, fibras, minerais e carboidratos complexos, além de apresentarem baixos teores de lipídios (COSTA *et al*, 2009). O feijão é um produto presente na mesa da maioria da população

brasileira, sendo considerada uma cultura de elevada importância tanto nutricional quanto econômica e social (RIOS; ABREU; CORRÊA, 2003; FAO, 2013). Como verificado na Tabela 1, o feijão cru apresenta altos índices de proteínas, carboidratos e vitaminas principalmente do tipo B, além de minerais como ferro e zinco, o que torna seu consumo mais vantajoso e benéfico para a saúde (USDA, 2012, GEPTS *et al.*, 2008; ABREU, 2005).

Tabela 1 –Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA). Universidade de São Paulo (USP) de composição do feijão preto cru, cru por 100 g de parte comestível.

<b>Classe</b>	<b>Nutrientes</b>	<b>Unidade</b>	<b>Valor por 100 g</b>
Feijão preto	Niacina (B)	Mg	4,68
	Ácidos Graxos saturados	g	0,21
	Fibra Alimentar	g	21,5
	Lipídios	g	1,28
	Energia	Kcal	295
	Proteína	g	22,4
	Umidade	%	13,3
	Cinzas	g	3,93
	Carboidratos	g	59,1
	Ferro	Mg	9,83
	Potássio	Mg	1441
	Magnésio	Mg	186,83+/- 1,21
	Cálcio	Mg	122
	Cobre	Mg	0,94
	Zinco	Mg	3,37
	Sódio	Mg	traços
	Selênio	Mcg	11,9
	Vitamina E	Mg	0,19
	Tiamina	Mg	0,12

Fonte: Adaptado de TBCA *et al.*, 2020.

Apesar das vantagens consideráveis, o feijão apresenta características indesejáveis que limitam sua aceitabilidade como o baixo valor nutricional de suas proteínas (RAMÍREZCÁRDENAS; LEONEL; COSTA, 2008). Porém, essa deficiência pode ser providenciada pela ingestão de feijão juntamente com arroz, o qual formam a principal fonte proteica da alimentação brasileira, apresentando digestibilidade protéica em torno de 80% suprindo os aminoácidos essenciais (PIRES *et al.*, 2006).



## 2.2 AGROTÓXICOS

Segundo o artigo 2º da lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, agrotóxicos e afins:

São os 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; substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989).

A *Food and Agriculture Organization* (FAO), define os agrotóxicos como sendo substâncias ou misturas de substâncias usadas com o intuito de combater ou controlar qualquer praga, incluindo vetores de doenças humanas e animais, que causam danos durante o processamento, estocagem, transporte ou distribuição de alimentos (FAO,2003).

Segundo o dossiê ABRASCO (Associação Brasileira de Saúde Coletiva), cerca de 58% dos alimentos que consumimos estão contaminados por agrotóxicos. Entre os anos de 2007 a 2014, foram registradas cerca de 34.147 notificações de intoxicação humana aguda por agrotóxicos (ABRASCO, 2015).

Os agrotóxicos, além de afetar os ecossistemas aquáticos e terrestre, também potencializam um desequilíbrio ambiental, uma vez que, podem influenciar na interação predador-presa (HANLON; RELYEA, 2013).

A utilização de dosagens de agrotóxicos acima das recomendadas, ou ainda proibidas para algumas formas de plantio, influenciam diretamente na desestruturação da biodiversidade e conseqüentemente, a saúde da população está sendo afetada por essas substâncias químicas.





Segundo ações de monitoramento de resíduos de agrotóxicos realizadas entre 2013 e 2015, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2016), das 10.051 amostras de alimentos (cereais, frutas e verduras) analisadas, cerca de 19,7% das amostras apresentaram concentrações de agrotóxicos acima do limite máximo permitido, ou ainda resíduos de agrotóxicos não autorizados para determinadas culturas, ou as duas irregularidades ao mesmo tempo.

## 2.2.1 Classificação e toxicidade dos agrotóxicos

De acordo com o grau de toxicidade, os agrotóxicos são classificados em quatro categorias, sendo identificadas através de cores distintas. Assim torna-se possível a garantia de interpretação direta de acordo com o grau de perigo dos agrotóxicos à saúde humana, possibilitando ao consumidor maior praticidade na identificação do risco associado a cada composto (ANVISA, 2018).

Segundo a ANVISA, a classificação dos agrotóxicos é realizada com base no grau de toxicidade do produto sendo estabelecidas quatro classes: classe I - Extremamente Tóxico (rótulo vermelho); classe II - Altamente Tóxico (rótulo amarelo); classe III - Medianamente Tóxico (rótulo azul) e classe IV - Pouco Tóxico (rótulo verde), conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Classes toxicológicas dos agrotóxicos com base na DL50<sup>1</sup>

Classe Toxicológica	Classificação	Cor da faixa no rótulo da embalagem
I	<b>Extremamente Tóxico:</b> as formulações sólidas que apresentam DL 50 oral, para ratos, igual ou inferior a 5 mg/kg	Vermelho vivo 
II	<b>Altamente Tóxico:</b> as formulações sólidas que apresenta DL 50 oral, para ratos, superior a 5 mg/kg e até 50mg/kg, inclusive.	Amarelo intenso 
III	<b>Medianamente Tóxico:</b> as formulações sólidas que apresentam DL 50 oral, para ratos, superior a 50mg/kg e até 500mg/kg, inclusive.	Azul intenso 
IV	<b>Pouco Tóxico:</b> as formulações sólidas que apresentam DL 50 oral, para ratos, superior a 500mg/kg, inclusive.	Verde intenso 

Fonte: Adaptação EMBRAPA (2020).

Os agrotóxicos podem ser classificados ainda em relação a presença de grupos funcionais específicos, ou quanto ao modo de ação, eliminação e biotransformação no ambiente e nos organismos (KIM, KABIR e JAHAN, 2017). Desta forma, existem atualmente três métodos amplamente empregados para a classificação destas

substâncias, que consideram: a estrutura química, o modo de entrada e a ação do agrotóxico e dos organismos que matam (YADAV *et al.*, 2015).

De acordo com a origem, os agrotóxicos podem ser classificados como químicos (sintetizados) e biopesticidas (naturalmente encontrados na natureza) (ABUBAKAR *et al.*, 2020). A classificação dos agrotóxicos em função da estrutura química é mais utilizada por cientistas e analistas químicos, dividindo-os em quatro classes principais: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (BUCHHEL, 1983). Além destes, segundo o Decreto nº 4.074 (BRASIL, 1989), os agrotóxicos devem ser divididos em classes, com o objetivo de diferenciá-los em função da sua utilização, seu modo de ação e potencial, conforme observado na Tabela 3.

Tabela 3 – Classificação dos agrotóxicos de acordo com sua classe e espécie alvo destinada

<b>Tipo de agrotóxico</b>	<b>Espécies- alvo/função</b>	<b>Exemplos</b>
Inseticidas	Causa a morte de insetos e artrópodes.	Aldicarbe
Fungicidas	Causa a morte de fungos (incluindo bolores e ferrugem)	Azoxistrobina
Bactericidas	Causa a morte e age contra bactérias.	Complexo de cobre
Herbicidas	Causa a morte de plantas daninhas.	Atrazina
Acaricidas	Causa a morte de ácaros.	Bifenazato
Repelentes	Repelem pragas através do seu sabor ou cheiro.	Metiocarbe
Dessecantes	Age nas plantas secando seus tecidos.	Ácido bórico
Nematicidas	Causa a morte de nematódeos que atuam como parasitas em plantas.	Aldicarbe
Termiticidas	Causa a morte de cupins.	Fipronil

Fonte: Adaptação de BAIRD E CANN (2011)

Os agrotóxicos podem ser classificados pelo modo de ação, como de contato ou sistêmicos. Os de contato atuam nas partes externas da planta, embora também possa ser absorvido pelas partes internas. Por outro lado, os sistêmicos, tem seu modo ação no interior das folhas e polpas (ANVISA, 2020).

Apesar dos agrotóxicos serem de fácil aplicabilidade e produzem resultados imediatos, o uso intensivo ou de forma incorreta tem provocado grandes impactos negativos ao meio ambiente e nos alimentos produzidos. Mas quando são aplicados com cuidado e de forma correta, tornam-se grandes aliados na produção agrícola.

## 2.2.2 Monitoramento de resíduos e contaminantes em alimentos e Limite Máximo de Resíduos

O limite máximo de resíduo (LMR) é a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico (estabelecida com segurança toxicológica) ou afins, que é oficialmente permitida no alimento. O valor do LMR é expresso em miligrama do agrotóxico por quilograma do alimento ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) (BRASIL, 2002).

No Brasil, resíduos de agrotóxicos, conforme o decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002 (Brasil, 2002), são definidos como:

Substância ou mistura de substâncias remanescente ou existe em alimentos ou no meio ambiente decorrente do uso da presença de agrotóxicos e afins, inclusive, quaisquer derivados específicos, tais como produtos de conversão e de degradação, metabólitos, produtos de reação e impurezas, consideradas toxicológica e ambientalmente importante.

Segundo a resolução nº4, de 18 de janeiro de 2012 da ANVISA o LMR é definido como:

LMR é a quantidade máxima de resíduo de agrotóxicos ou afim oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expressa em partes (peso) dos agrotóxicos e afim ou seus resíduos por milhão de partes de alimentos ppm ou mg/Kg.

Sendo assim podemos afirmar que o resíduo de agrotóxico em determinada cultura não deve ultrapassar o LMR, desta maneira, teoricamente não oferece risco a saúde humana (JARDIM, 2012; CODEX ALIMENTARIUS, 2015). Em vista disso, o LMR é válido para a gestão de risco, sendo necessário a avaliação do risco de exposição da população e do biosistema aos agrotóxicos visto que risco é um conceito que envolve a possibilidade da ocorrência de um resultado adverso, a imprecisão sobre esta ocorrência e a relevância deste resultado (COVELLO; MERKHOFFER, 1993; PIRES 2013).

Segundo o Codex Alimentarius (2015), os valores de LMR são empregados principalmente para os produtos que são comercializados no mercado internacional e tem como intuito amparar este tipo de transação (CODEX ALIMENTARIUS, 2015).

No Brasil, o órgão responsável pelo estabelecimento do LMR, classificação toxicológica dos produtos e autorização dos ingredientes ativos de agrotóxicos no país é a ANVISA (BRASIL, 2016).

Os valores de LMR no Brasil são definidos por meio de estudos supervisionados de campo, que partem da utilização de quantidades mínimas de agrotóxicos, a fim de atender a eficiência agrícola necessária. O intuito é garantir que

a quantidade de resíduos nos alimentos sejam a menor possível, desde que represente a boa prática agrícola permitida.

No Brasil, são registrados 138 princípios ativos para a cultura de feijão e a maioria dos agrotóxicos permitidos são fungicidas e inseticidas.

A Tabela 4 apresenta os LMR estabelecidos para a cultura do feijão pela ANVISA e pelo Codex Alimentarius, bem como o grupo químico e a classe funcional de cada composto. Os LMRs estabelecidos pela legislação brasileira encontram-se em uma faixa de 0,01 a 8 mg kg<sup>-1</sup>

Tabela 4 – Compostos registrados no Brasil para uso na cultura de feijão – Limite Máximo de Resíduo (LMR), mg kg<sup>-1</sup> estabelecidos de acordo com a ANVISA, União Europeia e Codex Alimentarius.

Nº	Compostos	Classe (s)	Grupo Químico	ANVISA (mg kg <sup>-1</sup> )	Codex Alimentarius (mg kg <sup>-1</sup> )
1	Acefato	Inseticida	Organofosforado	0,02	-
2	Acetamiprido	Insecticida	Nicotenoide	0,15	-
3	Acibenzolar-S-metil	Fungicida	Benzotiadiazol	1,00	-
4	Abamectina	Acaricida, inseticida e nematocida	Avermectinas	0,01	0,005
5	Acifluorfem – Sódico	Ativador de plantas	Benzotiadiazol	0,02	-
6	Alfa-Cipermetrina	Inseticida	Piretróide	0,05	-
7	Azoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	0,20	-
8	Bentazona	Herbicida	Benzoatiadizinona	0,01	-
9	Boscalida	Fungicida	Anilida	0,10	-
10	Benziladenina	Regulador de crescimento	Citocinina	0,01	-
11	Benzoato de Emamectina	Inseticida	Avermectinas	0,01	-
12	Benzovindiflupir	Fungicida	Pirazol carboxamida	0,06	-
13	Beta – Ciflutrina	Inseticida	Piretróide	0,10	-
14	Beta – Cipermetrina	Inseticida	Piretróide	0,05	-
15	Bifentrina	Inseticida, formicida e acaricida	Piretróide	0,50	-
16	Bixafem	Fungicida	Carboxamida	0,07	-
17	Bromuconazol	Fungicida	Triazol	0,20	-
18	Buprofezina	Inseticida e acaricida	Tiadiazinona	0,02	-
19	Carbaril	Inseticida	Metilcarbamato de naftila	0,50	-
20	Captana	Fungicida	Dicarboximida	1,00	-
21	Carbendazim	Fungicida	Benzimidazol	2,00	0,5

(continua)

Tabela 4 - Compostos registrados no Brasil para uso na cultura de feijão – Limite Máximo de Resíduo (LMR), mg kg<sup>-1</sup> estabelecidos de acordo com a ANVISA, União Europeia e Codex Alimentarius.

Nº	Compostos	Classe (s)	Grupo Químico	ANVISA (mg kg <sup>-1</sup> )	Codex Alimentarius (mg kg <sup>-1</sup> )
22	Carfentrazona – Etilica	Herbicida	Triazolona	0,01	-
23	Ciantraniliprole	Inseticida	Carboxamida	0,01	0,3
24	Carboxim	Fungicida	Carboxanilida	0,20	-
25	Ciflutrina	Inseticida	Piretróide	0,10	-
26	Ciproconazol	Fungicida	Triazol	0,04	0,02
27	Ciprodinil	Fungicida	Anilinopirimidina	0,30	0,2
28	Cletodim	Herbicida	Oxima ciclohexanodiona	0,70	2
29	Cloretos de Benzalcônio	Fungicida e bactericida	Amônio Quaternário	0,10	-
30	Clorantranilipole	Inseticida	Antranilamida	0,05	-
31	Clorfenapir	Inseticida e acaricida	Análogo de Pirazol	0,10	-
32	Clorfluazurom	Inseticida	Benzoiluréia	0,01	-
33	Clorpirifós	Inseticida	Organofosforado	0,10	-
34	Cloridrato de Cartape	Fungicida e inseticida	Bis (Tiocarbamato)	0,10	-
35	Clorotalonil	Fungicida	Isoftalonitrila	2,00	-
36	Clotianidina	Inseticida	Neonicotinóide	0,02	-
37	Cresoxim metílico	Fungicida	Estrobilurina	0,05	-
38	Diafentiurom	Inseticida e formicida	Piretróide	0,30	-
39	Deltametrina	Inseticida e formicida	Piretróide	0,20	-
40	Difenoconazol	Fungicida	Triazol	0,08	-
41	Dibrometo de Diquate	Herbicida	Bipiridílio	0,50	-
42	Dicamba	Herbicida	Ácido Benzóico	4,00	-
43	Dicloreto de Paraquate	Herbicida	Bipiridílio	0,05	-

(continua)

Tabela 4 - Compostos registrados no Brasil para uso na cultura de feijão – Limite Máximo de Resíduo (LMR), mg kg<sup>-1</sup> estabelecidos de acordo com a ANVISA, União Europeia e Codex Alimentarius.

(continuação)

Nº	Compostos	Classe (s)	Grupo Químico	ANVISA (mg kg <sup>-1</sup> )	Codex Alimentarius (mg kg <sup>-1</sup> )
44	Dimoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	0,05	-
45	Dinotefuran	Inseticida	Neonicotinoide	0,09	-
46	Espiromesifeno	Inseticida	Cetoenol	0,06	-
47	Epoxiconazol	Fungicida	Triazol	0,05	-
48	Etefom	Regulador de crescimento	Gerador de etileno	0,10	-
49	Esfenvalerato	Inseticida biológico	Piretróide	0,05	-
50	Etofemproxi	Inseticida	Éter Difenílico	0,50	0,05
51	Espinetoram	Inseticida	Espinosinas	0,02	-
52	Famoxadona	Fungicida	Oxazolidinonas	0,30	-
53	Espinosade	Inseticida	Espinosinas	0,03	-
54	Espiromesifeno	Inseticida e Acaricida	Cetoenol	0,06	-
55	Etoxissulfurom	Herbicida	Sulfoniluréia	0,01	-
56	Fenoxaprope P. Etílico	Herbicida	Ácidos Ariloxifenoxipropiônicos	0,05	-
57	Fenpirazamina	Fungicida	Pirazol	0,01	-
58	Fenpropatrina	Inseticida e acaricida	Piretróide	0,01	-
59	Fluasifope-P-Butílico	Herbicida	Ácido Ariloxifenoxipropiônico	7,00	40
60	Fluazinam	Fungicida e acaricida	Fenilpiridinilamina	0,10	-
61	Flubendiamida	Inseticida	Diamida do ácido ftálico	0,07	-
62	Fludioxonil	Fungicida	Fenilpirrol	0,50	0,5
63	Fipronil	Pirazol	Inseticida, formicida e cupinicida	0,01	-
64	Fluopiram	Fungicida	Piriletilamida	0,15	-
65	Flupiradifurone	Inseticida	Butenolida	0,40	0,4



Tabela 4 - Compostos registrados no Brasil para uso na cultura de feijão – Limite Máximo de Resíduo (LMR), mg kg<sup>-1</sup> estabelecidos de acordo com a ANVISA, União Europeia e Codex Alimentarius.

(continuação)

Nº	Compostos	Classe (s)	Grupo Químico	ANVISA (mg kg <sup>-1</sup> )	Codex Alimentarius (mg kg <sup>-1</sup> )
66	Flumioxazina	Herbicida	Ciclohexenodicarboximida	0,05	0,07
67	Fluroxipir – metílico	Herbicida	Ácido piridiniloxialcanóico	0,01	-
68	Fluquinconazol	Fungicida	Triazol	0,05	-
69	Fomesafem	Herbicida	Éter difenílico	0,05	-
70	Flutriafol	Fungicida	Triazol	0,10	-
71	Fluxaproxade	Fungicida	Carboxamida	0,06	0,3
72	Formetanato	Inseticida e acaricida	Metilcarbamato de fenila	0,50	-
73	Fosfina	Inseticida, fungicida, formicida e nematocida	Inorgânico	0,10	-
74	Gama – Cialotrina	Inseticida	Piretróide	0,05	-
75	Glifosato	Herbicida	Glicina Substituída	0,05	-
76	Glufosinato	Herbicida e regulador de crescimento	Homoalanina Substituída	0,05	-
77	Halossulfurom metílico	Herbicida	Sulfonilureia	0,02	-
78	Haloxifope – P	Herbicida	Ácido Ariloxifenoxipropiônico	0,05	3,0
79	Haloxifope – P-Metílico	Herbicida	Ácido Ariloxifenoxipropiônico	0,06	-
80	Hidróxido de Fentina	Fungicida	Organoestânico	0,05	-
81	Imazamoxi	Herbicida	Imidazolinona	0,10	0,05
82	Imazetapir	Herbicida	Imidazolinona	0,05	-
83	Imazapir	Herbicida	Imidazolinona	0,02	-
84	Imibenconazol	Fungicida	Triazol	0,30	-
85	Imidacloprido	Inseticida	Neonicotinóide	0,07	-
86	Indoxacarbe	Inseticida e formicida	Oxadiazina	0,08	-
87	Iprodiona	Fungicida	Dicarboximida	0,10	-
88	Lambda – Cialotrina	Inseticida	Piretróide	0,05	-

Tabela 4 - Compostos registrados no Brasil para uso na cultura de feijão – Limite Máximo de Resíduo (LMR), mg kg<sup>-1</sup> estabelecidos de acordo com a ANVISA, União Europeia e Codex Alimentarius.

(continuação)

Nº	Compostos	Classe (s)	Grupo Químico	ANVISA (mg kg <sup>-1</sup> )	Codex Alimentarius (mg kg <sup>-1</sup> )
89	Isofetamida			0,10	-
90	Lufenurom	Inseticida e acaricida	Benzoiluréia	0,10	-
91	Malationa	Acaricida e inseticida	Organofosforado	8,00	2,0
92	Mancozebe	Fungicida e acaricida	Alquilenobis	0,60	-
93	Mefentrifluconazol	Acaricida e inseticida	Organofosforado	0,05	-
94	Metalaxil -M	Fungicida	Acalalaninato	0,01	-
95	Metiram	Herbicida	Cloroacetanilida	0,30	-
96	Metomil	Inseticida e acaricida	Metilcarbamato de oxima	0,05	0,05
97	Metconazol	Fungicida	Triazol	0,05	-
98	Metominostrobin	Fungicida sistêmico	Estrobilurina	0,02	-
99	Metoxifenozida	Inseticida	Diacilhidrazina	0,02	0,5
100	Novalurom	Inseticida	Benzoiluréia	0,20	-
101	Oxicarboxina	Fungicida	Carboxanilida	0,40	-
102	Pencicurom	Fungicida	Feniluréia	0,05	-
103	Pendimetalina	Herbicida	Dinitroanilina	0,10	0,05
104	Permetrina	Inseticida e formicida	Piretróide	0,02	0,1
105	Picoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	0,01	-
106	Piraclostrobina	Fungicida	Estrobilurina	0,10	-
107	Piraflufem – Etilico	Herbicida	Fenilpirazol	0,01	-
108	Piridabem	Inseticida e acaricida	Piridazinona	0,01	-
109	Pirimicarbe	Inseticida e acaricida	Organofosforado		-
110	Piriproxifem	Inseticida	Éter Piridiloxipropílico	0,01	-
111	Procimidona	Fungicida	Dicarboximida	0,50	-
112	Profenofós	Inseticida e acaricida	Organofosforado	0,10	-
113	Propiconazol	Fungicida	Triazol	0,05	-

Tabela 4 - Compostos registrados no Brasil para uso na cultura de feijão – Limite Máximo de Resíduo (LMR), mg kg<sup>-1</sup> estabelecidos de acordo com a ANVISA, União Europeia e Codex Alimentarius.

(conclusão)

Nº	Compostos	Classe (s)	Grupo Químico	ANVISA (mg kg <sup>-1</sup> )	Codex Alimentarius (mg kg <sup>-1</sup> )
114	Propinebe	Fungicida	Alquilenobis	0,30	-
115	Protioconazol	Fungicida	Triazolintiona	0,05	-
116	Quizalofope-P-Etilico	Herbicida	Ácido Ariloxifenoxipropiônico	0,03	-
117	Quizalofope-P-Tefurílico	Herbicida	Ácido Ariloxifenoxipropiônico	0,05	-
118	Saflufenacil	Herbicida	Uracila	0,03	-
119	Setoxidim	Herbicida	Oxima Ciclohexanodiona	1,00	-
120	S-Metolacoloro	Herbicida	Cloroacetanilida	0,05	-
121	Sulfoxaflor	Inseticida	Sulfoxaminas	0,20	0,3
122	Tebuconazol	Fungicida	Triazol	0,10	0,3
123	Teflubenzurom	Inseticida	Benzoiluréia	0,50	-
124	Tepraloxidim	Herbicida	Oxima Ciclohexanodiona	1,00	-
125	Terbufós	Inseticida e nematicida	Organofosforado	0,01	-
126	Tetraconazol	Fungicida	Triazol	0,20	-
127	Tetradifona	Acaricida	Clorodifenilsulfona	1,00	-
128	Tiabendazol	Fungicida	Benzimidazol	0,01	-
129	Tiacloprido	Inseticida	Neonicotinóide	0,10	-
130	Tiafenacil	Herbicida	Uracila	0,01	-
131	Tiametoxam	Inseticida	Neonicotinoide	0,02	-
132	Tipraloxidim	Herbicida	Oxima Ciclohexanodiona	1,00	-
133	Trifloxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	0,20	0,01
134	Tiafenacil	Herbicida	Uracila	0,01	-

Fonte: A autora, 2022

### **2.2.3 Plano nacional de controle de resíduos e contaminantes em produtos de origem vegetal**

Os programas, diretrizes e planos de ação correspondentes estão contidas no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal (PNCRC/Vegetal), instituído pela Instrução Normativa SDA/MAPA nº 42, de 31 de dezembro de 2008. Esta IN tem como função monitorar a qualidade dos produtos de origem vegetal produzidos em todo o território nacional, em relação à ocorrência de resíduos de agrotóxicos e contaminantes químicos e biológicos.

O PNCRC/Vegetal é constituído por quatro subprogramas, que são: o subprograma de monitoramento que gera as informações sobre a frequência, níveis e distribuição dos resíduos e contaminantes no país; o subprograma de Investigação que só é iniciado quando é detectada alguma violação no subprograma de monitoramento e é composto por processos de investigação; o subprograma de produtos importados que coleta amostras na zona primária (portos, postos de fronteira e aeroportos) e o subprograma exploratório que verifica a ocorrência de resíduos e contaminantes onde ainda não existam limites e níveis máximos estabelecidos (MAPA, 2022).

Segundo o Codex Alimentarius (2018), contaminantes são produtos que não foram intencionalmente adicionados aos alimentos. As etapas de fabricação, armazenamento, manuseio, processamento ou distribuição, muitas vezes podem estar relacionadas com a contaminação dos alimentos.

O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), criado no ano de 2001 pela ANVISA, tem monitorado os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos que chegam na mesa do consumidor.

No Brasil, o processo de regulamentação do uso de agrotóxicos, passa pela avaliação de três órgãos do Governo Federal: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

O registro total de agrotóxicos, componentes e afins no Brasil, variou de 104 no ano 2010, para 405 no ano de 2020, o que representa um crescimento de 389,4% na quantidade total de agrotóxicos, componentes e afins registrados na última década. Dentre os agrotóxicos autorizados, dez ingredientes responderam por cerca de 70% do total consumido (BRASIL, 2020).

Conforme a Tabela 5, os ingredientes ativos comercializados no Brasil, entre os anos de 2009 a 2020, foram o glifosato, 2,4-D, mancozebe, atrazina, acefato, dicloreto de paraquate, clorpirifós, imidacloprido, diurom e o clorotolanil.

Tabela 5 – Ingredientes ativos comercializados no Brasil, entre os anos de 2009 a 2020, por tonelada.

<b>Ranking</b>	<b>Ingrediente ativo (IA)</b>	<b>Vendas (ton)</b>
1º	Glifosato	2.146.175
2º	2,4-D	478.287
3º	Mancozebe	274.722
4º	Atrazina	271.296
5º	Acefato	234.769
6º	Dicloreto de paraquate	101.726
7º	Clorpirifós	95.465
8º	Imidacloprido	86.192
9º	Diurom	82.263
10º	Clorotolanil	81.316

Fonte: Adaptação IBAMA (2020). Legenda: IA: ingrediente ativo.

Entre os dez ingredientes ativos mais utilizados no Brasil, três são proibidos na União Europeia (acefato, atrazina e paraquate), porém são de uso autorizado nos Estados Unidos, Japão, China e nos demais países do Mercosul. Contudo, há variações nos LMRs permitidos nos alimentos.

Muito se discute sobre a estipulação de limites máximos por ingrediente ativo e não para o total de agrotóxicos, tanto em alimentos como na água, pois facilita a formação de coquetéis de agrotóxicos, com efeitos que apenas recentemente estão sendo investigados.

O uso de agrotóxicos no Brasil cresceu substancialmente a partir do início dos anos 1990, em proporção relativamente próxima à dos demais países do Mercosul, mas superior à de outros grandes produtores de alimentos, devido ao aumento da produção agrícola (AENDA,2019).

## 2.3 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO

A etapa de preparo de amostra tem como intuito além da homogeneização da amostra, o isolamento dos analitos de interesse de seus respectivos interferentes e ainda, torna a concentração dos analitos a um nível adequado para sua determinação (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015, p. 9). Para a determinação de matrizes complexas, como os alimentos, a etapa de preparo de amostra, se tornou imprescindível e crucial. Considera-se esta etapa o ponto chave em uma análise, sendo assim, há a necessidade de minimizar o número de etapas para reduzir as fontes de erro e o tempo de emissão dos resultados. De forma resumida, podemos dizer que, o preparo de amostras inclui etapas como a amostragem, homogeneização, extração, limpeza e em algumas situações concentração do extrato (RIDGWAY et al., 2007).

Entre os mais vários métodos de preparo de amostra baseados na utilização de diferentes técnicas de extração que podem ser realizadas para diversos tipos de amostras, podemos mencionar a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) que pode ser utilizada como uma etapa de limpeza, o método QuEChERS (do inglês, *quick, easy, cheap, easy, rugged and safe*) e a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês, *matrix solid phase dispersion*), etc. Além destas, citam-se as técnicas de microextração, como por exemplo, microextração em fase sólida (SPME, do inglês, *solid phase microextraction*), extração sortiva com barra de agitação (SBSE, do inglês, *stir bar sorptive extraction*) (BARCHANSKA et al., 2018).

### 2.3.1 Método QuEChERS

Com o objetivo de superar as limitações dos métodos multiresíduos tradicionais, em 2003, Anastassiades e colaboradores introduziram um novo método de preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais. Esse método, foi denominado QuEChERS e possui como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro (WILKOWSKA e BIZIUK, 2011).

O método QuEChERS atende as características necessárias para um método multiresíduo, pois além de garantir resultados com excelente exatidão e precisão, garante baixos limites de detecção para um amplo espectro de analitos. Além disso,

caracteriza-se por sua flexibilidade e pela utilização de pequenas quantidades de solventes e reagentes (WILKOWSKA e BIZIUK, 2011).

O método QuEChERS é atualmente o método de extração mais aplicado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos, proporcionando recuperações aceitáveis para agrotóxicos de diferentes características físico-químicas (ácidos, básicos e neutros) (PRESTES *et al.*, 2009). Os extratos obtidos a partir do método QuEChERS podem ser avaliados tanto por cromatografia a líquido como por cromatografia gasosa (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Na versão original do método QuEChERS utilizam-se 10 g de amostra e 10 mL de acetonitrila na etapa de extração. A acetonitrila foi o solvente que melhor se adequou a esta etapa devido a sua capacidade de extrair uma menor quantidade de coextrativos provenientes das amostras de alimentos. Após adicionam-se 4 g de sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) e 1 g de cloreto de sódio (NaCl). Estes sais são responsáveis por promover o “efeito *salting-out*”, que consiste em diminuir a solubilidade dos compostos polares na fase aquosa e a quantidade de água na fase orgânica, melhorando, assim, a recuperação dos analitos, além de provocar uma reação exotérmica, com a liberação de calor ao meio (PRESTES *et al.*, 2009; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Na etapa de limpeza ou clean-up, 1 mL do sobrenadante do extrato resultante das etapas anteriores é transferido para um tubo contendo 150 mg de  $MgSO_4$  e 25 mg de amina primária-secundária (PSA). Esta etapa é essencial para garantir a robustez e confiabilidade dos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico (PRESTES *et al.*, 2009). O PSA é responsável por reter ácidos graxos e compostos polares, presentes na matriz, devido ao seu efeito quelante. Enquanto o  $MgSO_4$  remove a água presente no extrato e auxilia na partição da matriz (BRUZZONITI *et al.*, 2014). Após, o extrato final é filtrado com filtro de membrana, para assegurar que qualquer material particulado presente não irá para o cromatógrafo e na sequência o mesmo é injetado no equipamento.

### **2.3.1.1 Modificações no método QuEChERS**

Pelo fato de alguns compostos (tiabendazol, imazalil, carbendazina, entre outros) apresentarem problemas com a estabilidade e ou recuperação devido ao pH

da matriz, foram necessárias algumas modificações no método original para melhorar a recuperação desses compostos (PRESTES *et al.*, 2009; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Lehotay e colaboradores (2005) acrescentaram ao método original uma etapa de tamponamento e denominaram de método QuEChERS acetato. Esta versão, utiliza acetonitrila acidificada com 1% (v/v) de ácido acético e acetato de sódio (CH<sub>3</sub>COONa) como sal de partição, formando um tampão em pH 4,8. Este método, foi reconhecido como procedimento oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PRESTES *et al.*, 2009; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011). Por outro lado, Anastassiades e colaboradores (2007) desenvolveram o método QuEChERS citrato. Este método utiliza uma mistura de citrato de sódio diidratado (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O) e hidrogenocitrato sesquihidratado (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·1,5H<sub>2</sub>O) que formam um tampão em pH 5,0-5,5 (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011). A Figura 2, representa de forma esquemática as versões original, acetato e citrato.

Figura 2 – Método QuEChERS, original, acetato e citrato.

QuEChERS	Original	Acetato	Citrato
<b>Extração</b> Agitação 1 min	10g de amostra + 10mL de MeCN	10g de amostra + 10mL MeCN 1% Ác. Acético	10g de amostra + 10mL de MeCN
<b>Partição</b> Agitação 1 min Centrif 6000 rpm 8 min -10C	4g MgSO <sub>4</sub> + 1g NaCl	4g MgSO <sub>4</sub> + 1,7g de Acetato de sódio	4g MgSO <sub>4</sub> + 1g NaCl 1g C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0,5g C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ·1,5H <sub>2</sub> O
<b>Limpeza</b> Agitação 1 min Centrif 6000 rpm 8 min -10C	1mL do extrato + 150mg de MgSO <sub>4</sub> 25mg de PSA	1mL do extrato + 150mg de MgSO <sub>4</sub> 25mg de PSA	1mL do extrato + 150mg de MgSO <sub>4</sub> 25mg de PSA

A Tabela 6 apresenta diferentes aplicações do método QuEChERS para determinação de resíduos de agrotóxicos em feijão e outros tipos de amostras.



Tabela 6 – Revisão dos métodos de preparo de amostra e condições cromatográficas empregadas na determinação de resíduos de agrotóxicos em feijão e outras matrizes de origem vegetal.

Agrotóxicos	Matriz	Preparo de amostra		Técnica	Referência
		Extração	Limpeza		
Avermectinas	Feijão, soja e milho	Slurry, QuEChERS: 10 g de amostra + 10 mL de ACN -> agitação (vortex/1min) -> 4 g de MgSO <sub>4</sub> + 1 g de NaCl -> agitação (manual/1 min) -> centrifugação (3600 rpm/8 min)			
		QueChERS Citrato: 10 g de amostra + 10 mL de ACN -> agitação (manual/1min) -> 4 g de MgSO <sub>4</sub> + 1 g de NaCl + 1 g C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> . 2H <sub>2</sub> O + 0,5 g C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> . 1,5H <sub>2</sub> O -> agitação (vórtex/1 min) -> centrifugação (3600 rpm/8 min)	2 mL sobrenadante + 300 mg MgSO <sub>4</sub> + 50 mg PSA+ 250 mg de C18 -> agitação (vortex/30s) -> centrifugação (3400 rpm/8 min) -> 1 mL extrato -> filtração (0,2 µm)	UHPLC-MS/MS	UCZAY, 2019
		QueChERS Acetato: 15 g de amostra + 15 mL de ACN 1% H Ac.-> agitação (manual/1min) -> 6 g de MgSO <sub>4</sub> + 1,5 g de CH <sub>3</sub> COONa -> agitação (vórtex/1 min) -> centrifugação (3600 rpm/8 min)			
127 compostos (multiclasse)	Hortaliças, vegetais e leguminosas	QuEChERS: 2 g de amostra + 2 mL de ACN -> agitação (vortex/1min) -> 1,2 g de MgSO <sub>4</sub> + 0,3 g de NaCl + 10 mg Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -PSA + 10 mg GCB -> agitação (1 min) -> separação sob campo magnético externo/30s (ímã fora do tubo) 0,6 mL sobrenadante + 0,6 mL água -> filtração (0,2 µm)	d-SPE: 1 mL sobrenadante + 150 mg MgSO <sub>4</sub> + 50 mg PSA + 50 mg C18 -> agitação (1min) -> centrifugação (5000 rpm/3 min) 0,5 mL sobrenadante + 0,5 mL água -> filtração (0,2 µm)	GC-MS	RAHMAN <i>et al.</i> , 2021
		QuEChERS: 10 g de amostra + 10 mL de ACN -> agitação (vortex/1min) -> 4 g de MgSO <sub>4</sub> + 1 g de NaCl -> agitação (1 min) -> centrifugação (5.000 rpm/3 min)			
17 organoclorados, 5 piretróides e 3 organofosforados	Vegetais, rações de peixes e peixes	QuEChERS: 10 g de amostra + 10 mL de ACN -> agitação (1min) -> 4 g de MgSO <sub>4</sub> + 1 g de NaCl -> agitação (vórtex/1 min) -> centrifugação (5.000 rpm/5 min)	d-SPE: 2 mL sobrenadante + 150 mg MgSO <sub>4</sub> + 50 mg PSA + 50 mg GCB -> agitação -> centrifugação (10000 rpm/5 min) -> 1 mL extrato -> evaporação (N <sub>2</sub> ) -> reconstituição -> 1 mL MePh	LC-MS/MS	PRODHAN <i>et al.</i> , 2018

Tabela 6 – Revisão dos métodos de preparo de amostra e condições cromatográficas empregadas na determinação de resíduos de agrotóxicos em feijão e outras matrizes de origem vegetal.

Número e classe dos agrotóxicos	Matriz	Preparo de amostra		Técnica	(conclusão) Referência
		Extração	Limpeza		
20 compostos, (organofosforados, organoclorados e piretróides)	Feijão, berinjela e choy sum.	QuEChERS: 10 g de amostra + 20 mL de ACN 1% ác. acético -> agitação (manualmente/1min + vortex/1min) -> 5 g de MgSO <sub>4</sub> + 1,5 g de NaCl -> agitação (1 min) -> centrifugação (2500 g/1 min)	SPE: sobrenadante + 3 g de MgSO <sub>4</sub> -> agitação (1min) -> centrifugação (2500 g/1 min) -> sobrenadante -> pipeta com 200 mg PSA -> lavado com solvente SPE: sobrenadante + 3 g de MgSO <sub>4</sub> -> agitação (1min) -> centrifugação (2500 g/1 min) -> sobrenadante -> pipeta com 200 mg gel de sílica -> lavado -> eluição 2 mL de hexano:diclorometano (4:1) e 2 mL de hexano:diclorometano (1:1)	Organofosforados /GC-FPD Organoclorados e piretróides / GC-ECD	CHAI <i>et al.</i> , 2012
10 compostos quirais	feijão-caupi, tomate, berinjela, morango e alho-poró,	QuEChERS: 10 g de amostra + 10 mL de ACN -> homogeneizador cerâmico -> 4 g de MgSO <sub>4</sub> + 1 g de NaCl + 0,5 g C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .1,5H <sub>2</sub> O + 1 g C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> .2H <sub>2</sub> O -> agitação (manual/1 min) -> centrifugação (5.000 rpm/4 min)	Baixo teor de pigmento: d-SPE: 6 mL sobrenadante + 900 mg MgSO <sub>4</sub> + 150 mg PSA -> agitação (vortex/1min) -> centrifugação (4000 rpm/5 min) -> 1 mL extrato -> filtração (0,2 µm) Alto teor de pigmento: d-SPE: 6 mL sobrenadante + 885 mg MgSO <sub>4</sub> + 150 mg PSA + 15 mh GCB -> agitação (vortex/1min) -> centrifugação (4000 rpm/5 min) -> 1 mL extrato -> filtração (0,2 µm)	UHPLC-QqLIT	HE <i>et al.</i> , 2015
18 organoclorados	6 classes de vegetais	QuEChERS: 10 g de amostra + 10 mL de ACN -> agitação -> 6 g de MgSO <sub>4</sub> + 1,5 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -> agitação (vortex/3 min) -> centrifugação (5.000 rpm/10 min)	d-SPE: sobrenadante + 1200 mg MgSO <sub>4</sub> + 400 mg PSA -> agitação (vortex/1 min) -> centrifugação (5000 rpm/10 min) -> extrato + evaporação (N <sub>2</sub> ) -> reconstruído 1 mL ACN	LC-MS/MS	SINHA <i>et al.</i> , 2012

Fonte: A autora (2023). Legenda= OC: organoclorados; OP: organofosforados; ACN: acetonitrila; FM: fase móvel; MePh: tolueno; PSA: amina primária-secundária; d-SPE: extração em fase sólida dispersiva; SPE: extração em fase sólida; ECD: Detecção por captura de elétrons (do inglês *electron capture detection*); FID: Detecção por ionização de chama (do inglês *flame ionization detection*) FTD: Detector termiônico de chama (do inglês *flame thermionic detector*); TID: Detector de ionização termiônica (do inglês *thermionic ionization detector*); QqLIT: Triplo quadrupolo-linear íon trap (do inglês *triple quadrupole-linear ion trap*); FPD: Detecção fotométrica de chama (do inglês *flame photometric detection*);

## 2.4 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

A cromatografia é considerada uma técnica primordial nos procedimentos analíticos (COLLINS *et al.*, 2009). A todo momento, pesquisadores procuram métodos com alta produtividade, que possibilitem análises multirresíduo, que sejam robustos e sensíveis, sendo assim, os métodos cromatográficos merecem destaque (PÉREZ-FERNANDES *et al.*, 2017). Entre as técnicas cromatográficas existentes, as que merecem destaque são a cromatografia líquida (LC, do inglês, *liquid chromatography*) e a cromatografia gasosa (GC, do inglês, *gas chromatography*). A seleção da técnica analítica ocorre em função das características dos analitos de interesse.

Desta forma, utiliza-se a GC para determinação de substâncias voláteis, semi-voláteis e termicamente estáveis. Por outro lado, substâncias não voláteis ou termicamente instáveis devem ser determinadas por LC. Atualmente, a maioria dos agrotóxicos apresentam baixa volatilidade, são instáveis termicamente e apresentam elevada polaridade, portanto, são normalmente determinados por LC (TETTE *et al.*, 2016, QUEIROZ *et al.*, 2012).

A cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*) fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da HPLC, tendo como principal diferença as colunas cromatográficas empregadas comparando-se um sistema de UHPLC com um sistema de HPLC percebe-se uma redução significativa nos diâmetros internos (d.i.) das tubulações, que possuem tipicamente d.i. de 0,175-0,125 mm em um sistema de HPLC para d.i. de 0,125-0,0625 mm em um sistema de UHPLC e, também uma redução significativa na porosidade dos filtros que retêm as partículas da FE dentro das colunas, que é tipicamente de 2,0 ou 0,5  $\mu\text{m}$  para partículas de 5 ou 3  $\mu\text{m}$ , respectivamente, para filtros com porosidade de 0,2  $\mu\text{m}$  para partículas  $\leq 2 \mu\text{m}$ . O desenvolvimento da UHPLC se deu em virtude da introdução das partículas de FE porosas  $\leq 2 \mu\text{m}$  que, associadas às colunas cromatográficas com dimensões reduzidas e às altas velocidades lineares de FM, permitiram que análises mais rápidas fossem possíveis, sem o comprometimento da eficiência e da resolução cromatográfica (MALDANER, JARDIM, 2012, ROCCA *et al.*, 2017).

#### 2.4.1 Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS)

Para a identificação e quantificação de resíduos de agrotóxicos em alimentos é necessário o uso de técnicas analíticas de alta detectabilidade, uma vez que a estas substâncias podem estar presentes nas amostras podem estar em níveis de  $\mu\text{g kg}^{-1}$  ou menos. Dentre as técnicas analíticas, a UHPLC combinada com a espectrometria de massas em série (MS/MS, do inglês, *tandem mass spectrometry*) apresenta nível de detectabilidade adequado ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) para um grande número de moléculas. Além disso, possibilita a identificação simultânea de agrotóxicos, sendo considerada uma ferramenta adequada para determinação de resíduos e contaminantes em alimentos (MASIÁ et al., 2016).

A MS, tem como princípio a geração de íons através da fragmentação de compostos em fase gasosa que, posteriormente, são separados através da razão massa/carga ( $m/z$ ) e então detectados, fornecendo um espectro da abundância relativa de cada fragmento (SKOOG et al. 2014). Para que os íons com  $m/z$  específica atinjam o detector, um campo elétrico é produzido (EKMAN et al., 2009). Um dos fatores que diferem os espectrômetros de massas é o tipo de analisador. Uma das configurações mais utilizadas em análises de compostos orgânicos é sistema triplo quadrupolo operando no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*), pois oferece maior seletividade, especificidade e detectabilidade (WANG et al., 2013; ROCCA et al., 2017).

A fonte de ionização mais utilizada no acoplamento com a UHPLC é a ionização por eletronebulização (ESI, do inglês, *electrospray ionization*), considerada adequada para compostos com elevada polaridade e maior massa molecular. Durante o processo de ionização, o analito passa por um capilar metálico mantido sob alta voltagem antes de atingir a câmara de ionização. Um fluxo de  $\text{N}_2$  aquecido na região do *spray* faz com que ocorra a evaporação do solvente e as gotas reduzem o tamanho até que ocorra a explosão coulombica, que resulta nos íons do analito, os quais são direcionados para o analisador de massas (HO et al., 2003; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

## 2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Com o intuito de garantir que um novo método analítico seja adequado às especificações requeridas pela legislação e produza resultados confiáveis, é necessária a realização da validação do método. Entre os critérios mínimos que devem ser avaliados na etapa de validação, destacam-se a seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão (recuperação), limite de detecção e limite de quantificação (INMETRO, 2020; SANTÉ, 2022).

Durante o processo de validação de um método existem guias de orientação que podem ser seguidas. A ANVISA disponibiliza a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 que dispõe sobre a validação de métodos analíticos, o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) disponibiliza o do DOQ-CGCRE-08 – rev.08 – Abr/2020, que fornece orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020). A União Europeia faz-se uso do guia fornecido pelo órgão de Saúde e Proteção do Consumidor (SANTÉ, do francês *Santé et protection des consommateurs*), para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (SANTÉ, 2022).

Na Tabela 7, é possível observar os parâmetros comumente avaliados na validação de métodos cromatográficos.

Tabela 7 – Parâmetros avaliados para determinação de resíduos de agrotóxicos por cromatografia em um método analítico.

<b>Parâmetro</b>	<b>Definição</b>	<b>Referência</b>
Efeito matriz	Influência dos componentes da matriz na resposta	SANTÉ, 2020
Linearidade	A capacidade de fornecer respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração da substância a ser determinada	ANVISA, 2017
Seletividade	A capacidade que o método tem de distinguir a resposta do analito de interesse da resposta de outros analitos que não se querem quantificar	SANTÉ, 2020
Faixa linear de trabalho	Intervalo de concentrações em que a resposta é linear.	INMETRO, 2020
Limite de detecção (LOD)	Concentração limite de distinção entre analito e ruído	INMETRO, 2020; ANVISA, 2017
Limite de quantificação (LOQ)	Menor concentração a partir da qual o analito pode ser quantificado com exatidão e precisão aceitáveis.	INMETRO, 2020
Exatidão	Proximidade de resultado em relação a uma referência	INMETRO, 2020.
Precisão	Proximidade de resultados obtidos por diferentes repetições nos ensaios de repetitividade e precisão intermediária	INMETRO, 2020.

Fonte: ANVISA (2017); INMETRO (2020); SANTÉ (2020)

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

#### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Durante a realização dos ensaios deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Agitador do tipo vórtex multi tubos (Fisher Scientific, Reino Unido);
- Agitador vórtex - Biomixer QL-901 (Microtécnica, Brasil) e Phoenix, modelo AP56 (Brasil);
- Balança analítica, modelo APX-200 (Denver Instruments, EUA), modelo AUW 220D (Shimadzu, Japão) e modelo UX-420H (Shimadzu, Japão);
- Centrífuga (Centribio, Brasil) e centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand – Alemanha e Eppendorf - Canadá);
- Moinho analítico básico A 11- IKA, batelada (Campinas- SP, Brasil);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct 3UV® (Millipore, França);
- Sistema GC-MS/MS Agilent Intuvo 9000 GC equipado com autosampler 7693 B e Triplo Quadrupolo 7010 B Series;
- Sistema UHPLC-MS/MS Waters (EUA) equipado com:
  - Cromatógrafo a líquido ACQUITY com sistema binário de bombeamento para operação de gradientes de alta pressão;
  - Coluna analítica ACQUITY UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm d.i., 1,7 µm) Waters (EUA);
  - Detector MS do tipo triplo quadrupolo, modelo Xevo TQ;
  - Interface/fonte de ionização por eletronebulização (ESI);
  - Compressor de ar Atlas Copco (Bélgica);
  - Gerador de nitrogênio PEAK NM30L-MS (Peak Scientific, Escócia);
  - Sistema de aquisição de dados através do *software MassLynx 4.2* (Waters, EUA).

### 3.2 REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS

Os solventes, reagentes e demais materiais utilizados no desenvolvimento deste estudo estão listados abaixo:

- Acetato de etila para análises EMSURE<sup>®</sup> (Merck, Alemanha)
- Acetato de sódio anidro p.a. (J. T. Baker, EUA);
- Acetonitrila, grau HPLC (J.T.Baker, México);
- Ácido acético glacial 100% (J. T. Baker, EUA);
- Ácido fórmico  $\geq 98\%$  (Sigma Aldrich, EUA);
- Água ultrapurificada em sistema Milli-Q Direct 3UV<sup>®</sup> resistividade de 18,2 M $\Omega$  cm (Millipore, França);
- Amina primária e secundária (PSA), partícula de 50  $\mu\text{m}$  (Supelco, Alemanha);
- Argônio grau de pureza 5.0 (Air Liquide, Brasil);
- Bondesil C18 (octadecilsilano) com tamanho de partícula de 40  $\mu\text{m}$  (Supelco, EUA)
- Bondesil PSA com tamanho de partícula de 40  $\mu\text{m}$  (Supelco, EUA);
- Carvão grafitizado (GCB), Supelclean ENVI-Carb, não poroso, área superficial 100 m<sup>2</sup>/g; tamanho de partícula 120/400 mesh (Supelco, EUA);
- Citrato de sódio diidratado, pureza  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich, EUA);
- Cloreto de sódio (Sigma-Aldrich, EUA);
- Extran<sup>®</sup> neutro (Merck, Brasil);
- Filtros de nylon de 13 mm e porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$  (Nova Analítica, Brasil);
- Formiato de amônio, pureza  $\geq 99\%$  (Sigma Aldrich, EUA);
- Frascos de vidro (vial), capacidade de 2 mL (Analítica, Brasil);
- Frascos de vidro, capacidade de 4 mL (Agilent Technologies, EUA)
- Hidrogenocitrato de sódio sesquidratado, pureza  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich, EUA);
- Metanol, grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Microtubos tipo Eppendorf, capacidade de 2 mL (Labcon, EUA);
- Nitrogênio grau de pureza 5.0 (analítico) (Air Liquide, Brasil);
- Sulfato de magnésio anidro p.a. (J. T. Baker, EUA);
- Tubos de polipropileno, com tampas de rosca, de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- Vidraria comum de laboratório;



### 3.3 AMOSTRAS

A amostra “branco” de feijão preto, ou seja, livre de agrotóxicos, foi adquirida na feira de produtores do município de Santa Maria e foi mantida em geladeira até o seu processamento. Na etapa de processamento, os feijões foram homogeneizados utilizando um moinho, o material resultante foi acondicionado em frascos plásticos e armazenado em freezer com temperatura em torno de – 20 °C.

A aplicação do método desenvolvido neste trabalho foi realizada em 15 amostras de feijão preto de diferentes cidades do estado do Rio Grande do Sul. Na Tabela 8 encontra-se a identificação das amostras, bem como o a cidade de ensacamento.

Tabela 8 – Amostras de feijão preto avaliadas neste estudo, bem como a cidade de ensacamento.

<b>Amostra</b>	<b>Local de origem</b>
A 1	Santa Rosa
A 2	Seberi
A 3	Esteio
A 4	Faxinal do Soturno
A 5	Frederico Westphalen
A 6	Erechim
A 7	Cacapava do Sul
A 8	Ivoti
A 9	Bagé
A 10	Iraí
A 11	Vicete Dutra
A 12	Capão do Leão
A 13	Camaquã
A 14	Pelotas
A 15	Arroio do Tigre

Fonte: A autora (2023).

### 3.4 COMPOSTOS SELECIONADOS E PREPARO DE SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Para a realização deste estudo foram selecionados 85 agrotóxicos de diferentes classes agronômicas. A escolha foi baseada em compostos permitidos para a cultura do feijão preto no Brasil e também substâncias detectadas com maior frequência nas análises de rotina do LARP.

Os padrões analíticos dos agrotóxicos em estudo foram adquiridos das empresas Agilent Technologies (EUA), Sigma-Aldrich (EUA), LGC Standards (Alemanha), ChemService (EUA) e SPEX CertiPrep (EUA), e estão listados na Tabela 9, juntamente com algumas informações pertinentes, tais como: classe agronômica, grupo químico, pureza e suas características físico-químicas.

Inicialmente, foram preparados 10 mL de solução estoque individual dos analitos, na concentração aproximada de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ . Para o preparo das soluções, fez-se os cálculos, considerando sempre a pureza de cada padrão. Para sua solubilização, utilizou-se solventes como acetonitrila ou metanol. A partir dessas soluções, preparou-se uma solução mistura (*mix*), contendo todos os compostos do estudo (conforme Tabela 9), na concentração de  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , diluída em acetonitrila, armazenada em frascos âmbar e sob refrigeração ( $\leq -20 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Este “mix” foi utilizado para a etapa de fortificação das amostras “branco” e também para a construção das curvas analíticas preparadas no extrato da matriz e no solvente. Para injeção no sistema UHPLC-MS/MS as concentrações finais da curva analítica foram 0,5; 1,25; 2,5; 5; 10; 25 e  $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .

Tabela 9 – Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido e propriedades físico-químicas.

(continua)

Nº	Compostos	Classe (s)	Grupo Químico	Pureza (%)	Fórmula Molecular	pKa	log Kow	Koc (mg L <sup>-1</sup> )	Solubilidade (mg L <sup>-1</sup> )
1	Acefato	Inseticida	Organofosforado	99	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>3</sub> PS	8,35	-0,85	302	790000
2	Acetamiprido	Insecticida	Nicotenoide	99	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>4</sub>	0,7	0,8	20	29,50
3	Aldicarbe	Insecticida	Carbamato	99	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	-	1,15	36	4930
4	Ametrina	Herbicida	Triazina	98,2	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> S	4,1	2,63	96	1,8 10 <sup>3</sup>
5	Atrazina	Herbicida	Triazina	98,1	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub>	1,7	2,61	122	30
6	Azinfós metílico	Inseticida	Organofosforado	99	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	5	2,53	69,7	43,54
7	Azoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	99,2	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	0,94	2,5	740,2	11,61
8	Bitertanol	Fungicida	Triazol	99	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> NaO <sub>8</sub>	3,35	1,03	302	64000
9	Boscalida	Fungicida	Anilida	99	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	-	4,11	-	3,8
10	Bromuconazol	Fungicida	Triazol	99,5	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	10,7	4	3,74 10 <sup>7</sup>	2,61
11	Buprofezina	Inseticida e acaricida	Tiadiazinona	99,3	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> OS	0,38	4,3	5741	2,43
12	Carbaril	Inseticida	Metilcarbamato de naftila	100	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	10,4	2,36	241,7	416,2
13	Carbendazim	Fungicida	Benzimidazol	98,5	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	4,2	1,55	175,8	2441
14	Carbofurano	Inseticida, cupinicida, acaricida e nematocida	Metilcarbamato de benzofuranila	99	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	3,78	2,32	70,85	353,9
15	Carbofurano-3OH	Metabolito do carbofurano	Carbamato	97	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>	3,6	0,76	10	62000
16	Carboxim	Fungicida	Oxatina	99,5	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> S	0,5	2,14	79,96	423,7
17	Ciantraniliprole	Insecticida	Carboxamida	97,5	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> BrClN <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	-	3,18	-	-
18	Cianazina	Herbicida	Triazina	99	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>6</sub>	12,9	2,22	123,8	183,8
19	Ciprodinil	Fungicida	Anilnopirimidina	99,9	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub>	4,44	4	-	13
20	Cletodim	Herbicida	Oxima ciclohexanodiona	96,1	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> ClNO <sub>3</sub> S	4,47	4,14	-	5450
21	Clomazone	Herbicida	Isoxazolidinona	98,5	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> ClNO <sub>2</sub>	-	2,5	4770	197,5
22	Clorantranilipole	Inseticida	Antranilamida	97,8	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> BrCl <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	10,8	3,98	2724	0,37
23	Clorimurom etílico	Herbicida	Sulfonilureia	99,5	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S	4,2	2,5	78,19	18,15
24	Clorpirifós	Inseticida	Organofosforado	99,9	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	4,55	4,96	6829	0,36
25	Clorpirifós metílico	Acaricida e inseticida	Organofosforado	99,9	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	-	4,31	2008	1,89

Tabela 9 – Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido e propriedades físico-químicas.

(continuação)

Nº	Compostos	Classe (s)	Grupo Químico	Pureza (%)	Fórmula Molecular	pKa	log Kow	Koc (mg L <sup>-1</sup> )	Solubilidade (mg L <sup>-1</sup> )
26	Clorprofam	Herbicida	Carbamato	99,5	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> ClNO <sub>2</sub>	14,5	3,79	470	110
27	Cresoxim metílico	Fungicida	Estrobilurina	98	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	-	3,4	3,8	2
28	Diazinona	Inseticida	Organofosforado	97,5	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	2,6	3,81	1337	6,45
29	Difenoconazol	Fungicida	Triazol	99	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	1,07	4,3	2,43 1	0,6
30	Dimetoato	Inseticida e acaricida	Organofosforado	99,4	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	2	0,28	24,52	66000
31	Dimetomorfe	Fungicida	Morfolina	99	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>4</sub>	1,30	2,63	1,36	41,8
32	Diuron	Herbicida	Uréia	97,5	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	7,8	-	-	0,42
33	Epoxiconazol	Fungicida	Triazol	99,0	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> ClFN <sub>3</sub> O	-	-	3,30	-
34	Etefon	Regulador de crescimento	Gerador de etileno	96	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> ClO <sub>3</sub> P	2,5	-0,22	608	1 10 <sup>6</sup>
35	Etofemproxi	Inseticida	Piretróide	98	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	-	6,9	-	0,0225
36	Fenamidona	Fungicida	Imidazol	99,6	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> OS	-	2,8	2352	7,8
37	Fenamifós	Inseticida	Organofosforado	98,8	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>3</sub> PS	10,5	3,23	1686	400
38	Fenarimol	Fungicida	Pirimidinil carbinol	99	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	-	3,62	3786	14
39	Fenozaprope P.etílic	Herbicida	Ácidos Ariloxifenoxipropiônicos	99	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> ClNO <sub>5</sub>	0,18	4,12	-	275,80
40	Fipronil	Pirazol	Inseticida, formicida e cupinicida	96,7	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>6</sub> N <sub>4</sub> OS	-	4	-	3,78
41	Fluopicolida	Fungicida	Benzamida piridina	98,5	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>3</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O	-	3,26	373	2,8
42	Flupiradifurona	Inseticida	Butenolida	99,8	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> ClF <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	1,2	-	3200
43	Fluquinconazol	Fungicida	Triazol	98,5	C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>5</sub> O	0,9	3,24	870	1,15
44	Flutolanil	Fungicida	Carboxamida	99,5	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	-	3,7	680	6,53
45	Flutriafol	Fungicida	Triazol	99,5	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O	2,3	23	292	95,0
46	Fluxaproxade	Fungicida	Carboxamida	99,9	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> F <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O	12,58	3,06	1240	2,44
47	Fostiazato	Inseticida e nematocida	Organofosforado	99,2	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	-	1,68	71	9850
48	Hexitiazoxi	Acaricida	Tiazolidinacarboxamida	99	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	-	5,57	6200	0,5
49	Imidacloprido	Inseticida	Neonicotinóide	98,5	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	11,1	0,76	300	580
50	Indoxacarbe	Insecticida e formicida	Oxadiazina	97,4	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	-	4,65	8100	0,20
51	Iprovalicarbe	Fungicida	Carbamato	98	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	3,18	106	17,8

Tabela 9 – Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido e propriedades físico-químicas.

(continuação)

Nº	Compostos	Classe (s)	Grupo Químico	Pureza (%)	Fórmula Molecular	pKa	log Kow	Koc (mg L <sup>-1</sup> )	Solubilidade (mg L <sup>-1</sup> )
52	Linuron	Herbicida	Uréia	99,4	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	12,1	3,2	860	75
53	Malationa	Acaricida e inseticida	Organofosforado	99	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> PS <sub>2</sub>	6,8	2,7	1800	143
54	Mandipropamida	Fungicida	Éter mandelamida	99,3	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>4</sub>	-	3,2	1294	4,2
55	Mecarbam	Acaricida e inseticida	Organofosforado	98	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>5</sub> PS <sub>2</sub>	-	-	2,31	-
56	Mepronil	Fungicida	Carboxamida	99	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>2</sub>	-	3,66	974	12,7
57	Metalaxil	Fungicida	Acilalaninato	99,5	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	-	1,71	163	8,41
58	Metconazol	Acaricida e inseticida	Itraconazol	99,5	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O	11,3	3,85	1,71	30,4
59	Metiocarbe	Inseticida, moluscicida e repelente de pássaros	Metilcarbamato de fenila	99	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub> S	-	3,1	655	27
60	Metsulfurom metílico	Herbicida	Sulfolinuréia	99	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S	3,3	0,02	57	172
61	Monocrotofós	Inseticida	Organofosforado	98	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>11</sub>	6,6	5,43	-	3,0x10 <sup>-3</sup>
62	Monolinuron	Herbicida	Uréia	99,5	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>5</sub> P	-	0,22	19	8,1x10 <sup>5</sup>
63	Oxamil	Acaricida, inseticida e nematocida.	Carbamato	99	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	12,4	0,44	17	1,5x10 <sup>5</sup>
64	Picoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	98,5	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	-	3,6	898	3,1
65	Piraclostrobina	Fungicida	Estrobilurina	97,5	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-	3,99	9300	20
66	Pirazofós	Fungicida e inseticida	Fosforotioato de heterociclo	97	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> PS	-	3,8	646	4,2
67	Piridafentiona	Inseticida e acaricida	Organofosforado	99	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> PS	-	3,1	7211	100
68	Pirimetaniil	Fungicida	Anilopirimidina	99,5	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub>	3,52	2,84	301	121
69	Pirimifós metílico	Inseticida e acaricida	Organofosforado	97,6	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS	4,3	4,2	1100	11
70	Piriproxifem	Inseticida	Éter piridiloxipropílico	99,9	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	6,87	5,37	-	0,37
71	Propoxur	Inseticida	Carbamato	99,9	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	-	1,56	30	18000
72	Saflufenacil	Herbicida	Uracila	94,2	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> ClF <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S	4,41	2,57	368,2	2100
73	Simazina	Herbicida	Triazina	98	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>5</sub>	1,62	2,1	340	6
74	Tebufenozida	Inseticida	Diacilhidrazina	97	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	4,25	35000	0,83
75	Teflubezurom	Inseticida	Benzoiluréia	98,5	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	8,16	-	26062	0,02
76	Terbufós	Inseticida e nematocida	Organofosforado	99	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> O <sub>2</sub> PS <sub>3</sub>	-	4,48	500	4,5

Tabela 9 – Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido e propriedades físico-químicas.

(conclusão)

Nº	Compostos	Classe (s)	Grupo Químico	Pureza (%)	Fórmula Molecular	pKa	log Kow	Koc (mg L <sup>-1</sup> )	Solubilidade (mg L <sup>-1</sup> )
77	Terbutilazina	Herbicida	Triazina	99,5	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub>	2	3,21	219	6,6
78	Tiabendazol	Fungicida	Benzimidazol	99	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> S	-	2,39	2500	30
79	Tiacloprido	Inseticida	Neonicotinóide	98	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub> S	-	-	615	184
80	Tiametoxam	Inseticida	Neonicotinóide	99,5	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	-	0,13	64	41000
81	Tolcofós metílico	Fungicida	Organofosforado	99	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	-	4,56	-	0,708
82	Triadimenol	Fungicida	Triazol	98,5	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	-	3,08	273	72
83	Trifloxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	98,8	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-	4,5	2377	0,61
84	Vamidationa	Inseticida	Organofosforado	98	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>	-	-	70	4 10 <sup>6</sup>
85	Zoxamida	Inseticida	Organofosforado	99	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>3</sub> ON <sub>2</sub>	3,76	5,06	1240	18

Fonte: adaptado (2023). Legenda: pKa - logaritmo negativo da constante de acidez do composto (Ka); log Kow - coeficiente de partição octanol/água; Koc - constante de sorção - teor de carbono orgânico; Solubilidade: em água a 20 °C.

### 3.5 PREPARO E UTILIZAÇÃO DO PADRÃO INTERNO (PI) E PADRÃO DE CONTROLE (PC)

Segundo a SANTE (2022), padrão interno (PI) e padrão de controle (PC) são substâncias adicionadas nas amostras em concentrações conhecidas com o intuito de verificar a execução correta do método analítico e a estabilidade da análise cromatográfica.

Neste trabalho, empregou-se uma solução de atrazina-d5 (10 mg L<sup>-1</sup>, preparada em acetonitrila) como PC. O uso do PC avalia a eficiência do procedimento de extração na obtenção de resultados adequados (70-120% e RSD ≤ 20%).

A solução do PC foi adicionada previamente a etapa de extração dos analitos, na mesma concentração empregada para avaliação dos ensaios de recuperação (10, 25, 50 e 100 µg kg<sup>-1</sup>) e nas amostras reais.

Como PI empregou-se o composto trifenilfosfato (TPP), na concentração de 5 µg L<sup>-1</sup>, o qual foi adicionado aos brancos fortificados, amostras e soluções de trabalho no solvente e na matriz fortificada, para posterior relação das áreas obtidas do pico de interesse com a do PI. O padrão interno tem por objetivo verificar a execução correta da análise, sendo considerado aceitável valores de variação de área de até 20% em termos de RSD (SANTE, 2020).

### 3.6 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO PRETO

#### 3.6.1 Escolha da fase móvel

A escolha da fase móvel é considerada uma das etapas mais importantes do processo cromatográfico, visto que tem influência significativa na separação adequada dos analitos e no sinal analítico. Tendo por base os compostos selecionados para este estudo, foram empregadas, como fase móvel, as seguintes soluções: água:metanol (98:2, v/v) como fase móvel A e metanol:água (98:2, v/v) como fase móvel B, ambas contendo 5 mmol L<sup>-1</sup> de formiato de amônio e ácido fórmico 0,1% (v/v), de acordo com a Tabela 10.

Tabela 10 – Gradiente de fase móvel utilizado na determinação de resíduos de agrotóxicos em feijão preto por UHPLC-MS/MS.

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

Fonte: A autora (2023).

### 3.6.2 Condições utilizadas no sistema UHPLC-MS/MS para determinação multirresíduo de agrotóxicos

Os parâmetros utilizados no sistema UHPLC-MS/MS foram selecionados a partir de avaliação de solução padrão de cada agrotóxico estudado. Além disso, baseou-se em estudos prévios (KEMMERICH *et al.*, 2014) e nos dados da biblioteca do software MassLynx®, com a finalidade de conseguir um melhor resultado na avaliação das massas dos íons precursores e produtos. A Tabela 10 apresenta as condições do sistema de análise.



Tabela 11 – Condições cromatográficas do sistema UHPLC-MS/MS

<b>Parâmetro</b>	<b>Condição</b>
Temperatura da coluna	40 °C
Voltagem do capilar (ESI+)	0,5 k V
Voltagem do capilar (ESI-)	2,5 k V
Temperatura de dessolvatação (N <sub>2</sub> )	500 °C
Temperatura da fonte	150 °C
Fluxo de gás – Dessolvatação	600 mL min <sup>-1</sup>
Fluxo de gás – Cone	80 mL min <sup>-1</sup>
Vazão do gás de colisão	0,15 mL min <sup>-1</sup>
Volume de injeção	10 µL
Tempo de residência ( <i>dwel time</i> )	0,01 s
Tempo de aquisição	30 s

Fonte: A autora (2023).

### 3.7 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO PRETO UTILIZANDO UHPLC-MS/MS

#### 3.7.1 Testes de extração

Os métodos de preparo de amostra para determinação de resíduos de agrotóxicos propostos neste trabalho foram avaliados considerando trabalhos da literatura para determinação multirresíduo em cereais, leguminosas, vegetais e frutas. Foram realizados testes utilizando as três versões do método QuEChERS: original (ANASTASSIADES, *et al.*, 2003); acetato (LEHOTAY; MASTOVSKA; LIGHTFIELD; 2005) e citrato (ANASTASSIADES, *et al.*, 2007), com a adição de diferentes sorventes na etapa de limpeza. Além disso, para cada método avaliado foram realizados testes com e sem a realização da etapa de limpeza. Estes testes foram baseados nos trabalhos desenvolvidos por MIELE e colaboradores (2015) e ROMERO-GONZÁLEZ e colaboradores (2008).

A fim de avaliar o método de maior eficiência de extração para o preparo de amostra, avaliou-se o número de compostos que apresentaram resultados aceitáveis de recuperação, entre 70 e 120% e com RSD ≤ 20%. A Tabela 12 apresenta um resumo de cada procedimento avaliado.

Tabela 12 – Testes de extração realizados para análise de resíduos de agrotóxico em feijão.

Teste	Método	Extração	Partição	Limpeza de extrato (1 mL de sobrenadante)	Diluição (água ultrapura)
T1	QuEChERS Original	10 g de amostra + 10 mL de ACN	4 g MgSO <sub>4</sub> + 1 g NaCl		
T2	QuEChERS Acetado	15 g de amostra + 15 mL de ACN 1% ác. Acético	4 g MgSO <sub>4</sub> + 1,7 g CH <sub>3</sub> COONa	150 mg MgSO <sub>4</sub> + 25 mg PSA + 125 mg C <sub>18</sub>	5x
T3	QuEChERS Citrato	10 g de amostra + 10 mL de ACN	4 g MgSO <sub>4</sub> + 1 g NaCl + 1 g C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> .2H <sub>2</sub> O + 0,5 g C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .1,5H <sub>2</sub> O		

Fonte: A autora (2023).

Após a realização dos ensaios com as diferentes versões do método QuEChERS, os extratos obtidos foram submetidos a testes gravimétricos. Esta avaliação teve o intuito de quantificar a quantidade de coextrativos provenientes da matriz (SAPOZHNIKOVA; LEHOTAY, 2013). Todos os testes foram realizados em triplicata. De maneira inicial, 6 tubos de vidro foram lavados e secos em estufa à 120 °C por 1 hora. Após, estes foram colocados em dessecador até atingirem a temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C), cada tubo foi pesado 6 vezes e as massas foram anotadas. Após, transferiram-se 5 mL dos extratos obtidos nos testes T1, T2 e T3, para cada tubo, respectivamente. Os tubos foram colocados em estufa e o solvente foi evaporado. Na sequência, o tubo foi colocado no dessecador até atingir a temperatura ambiente e foi novamente pesado 6 vezes para obter-se a massa média de coextrativos restantes.

### 3.7.1.1 Avaliação da eficiência de extração de cada uma das versões do método QuEChERS

Os testes (T1, T2 e T3) descritos na Tabela 12 foram avaliados em relação as melhores condições de extração para os agrotóxicos em estudo. Fez-se ensaios de fortificação (n=6) em “amostra branco” de feijão preto, na concentração de 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Em um primeiro momento foi realizado o *slurry* (na proporção 1:3 m/v), onde pesou-se 2,5 g de amostra de feijão preto e 7,5 mL de água Milli-Q, agitou-se com auxílio do vortex e após aguardou-se um tempo de contato de 1 hora. Este tempo foi necessário para promover a hidratação da amostra e possibilitar uma maior interação entre o solvente e a amostra. Após a realização da etapa de extração e limpeza, transferiu-se 200  $\mu\text{L}$  de extrato e diluiu-se com 800  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de trifenilfosfato 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Antes da injeção no equipamento, a solução diluída foi filtrada empregando filtro de nylon de 13 mm e porosidade de 0,2  $\mu\text{m}$ .

Os testes de extração foram avaliados em relação ao número de compostos que apresentaram resultados aceitáveis (recuperação 70-120% e  $\text{RSD} \leq 20\%$ ). Além disso, avaliou-se o efeito matriz para cada uma das versões do método QuEChERS.

### 3.7.1.2 Avaliação de diferentes sorventes na etapa de limpeza do método QuEChERS

Após a definição do melhor procedimento de extração, avaliou-se a utilização de diferentes sorventes (C18, PSA e GCB) na etapa de limpeza do método de preparo de amostra. A Tabela 13 apresenta os diferentes testes, tipos e quantidades de sorventes avaliados. A seleção da etapa de limpeza, foi baseada no número de compostos recuperados e, também, na avaliação do efeito matriz de cada teste. Para isso, utilizou-se o nível de fortificação de 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , em triplicata, utilizando a amostra “branco” de feijão preto. Avaliou-se o número de compostos que apresentaram resultados aceitáveis de recuperação (70-120%) e precisão ( $\text{RSD} \leq 20\%$ ).

Tabela 13 – Diferentes sorventes (C18, PSA, GCB) avaliados na etapa de limpeza por QuEChERS.

Teste de limpeza	Sorventes
T4	1 mL de extrato + sem limpeza.
T5	1 mL de extrato + 150 mg de MgSO <sub>4</sub> + 25 mg de PSA
T6	1 mL de extrato + 150 mg de MgSO <sub>4</sub> + 125 mg de C18
T7	1 mL de extrato + 150 mg de MgSO <sub>4</sub> + 25 mg de GCB
T8	1 mL de extrato + 150 mg de MgSO <sub>4</sub> + 25 mg de PSA + 25 mg de GCB + 125 mg de C18

Fonte: A autora, 2023.

A eficiência da remoção de coextrativos, proporcionada por cada um dos testes realizados, foi avaliada através do modo varredura (*full scan*) em sistema GC-MS/MS.

### 3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO PRETO

O método QuEChERS avaliado neste trabalho foi validado a partir da avaliação dos parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, efeito matriz, exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária) (BRASIL, 2017; INMETRO, 2018).

A validação de métodos analíticos é de suma importância, tanto por razões comerciais, sendo um pré-requisito para a certificação de análises, quanto por razões científicas, visto que produzem resultados confiáveis na transferência entre laboratórios (CUNHA FILHO *et al.*, 2005).

No Brasil, o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e a ANVISA estabelecem guias para a validação de métodos analíticos. A validação deve garantir que o método forneça resultados confiáveis (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020; SANTÉ, 2019; ZANELLA *et al.*, 2015).

Esses parâmetros são descritos na Tabela 14, juntamente com suas definições e aplicações.

Tabela 14 – Parâmetros de validação avaliados no desenvolvimento do método analítico proposto.

Parâmetro	Aplicação	Definição e equação	Critério	Referência
<b>Seletividade</b>	Extração da matriz isenta dos analitos (matriz branco).	Distinção entre as respostas do analito.	Ausência de picos de interferentes nos tempos de retenção dos analitos de interesse.	SANTÉ, 2020
<b>Linearidade</b>	Injeção em triplicata da curva analítica. Avaliação do coeficiente de determinação ( $r^2$ )	Correção entre resposta analítica e concentração.  Equação 3: $y = ax + b$  Onde: $y$ = resposta medida (área do pico); $x$ = concentração; $a$ = coeficiente angular - inclinação da curva analítica = sensibilidade; $b$ = coeficiente linear - intersecção com o eixo $y$ , quando $x = 0$	$r^2 \geq 0,99$	INMETRO, 2020
<b>Efeito Matriz</b>	Comparação entre as inclinações das curvas analíticas preparadas no solvente (acetonitrila) e na matriz (extrato da amostra "branco")	Alterações na resposta analítica em função dos compostos da matriz  Equação 4: $EM (\%) = \left(\frac{X_1}{X_2} - 1\right) \times 100$  Onde: $X_1$ = Coeficiente angular da curva na matriz. $X_2$ = Coeficiente Angular da curva no solvente	$\geq \pm 20\%$	SANTÉ, 2020
<b>Limite de quantificação (LOQ)</b>	Menor concentração que, fortificada na matriz ( $n=6$ ), apresente resultados aceitáveis de exatidão e precisão	Menor nível em que o analito pode ser quantificado com exatidão e precisão aceitáveis em um método validado.		INMETRO, 2020 ANVISA, 2017
<b>Limite de detecção (LOD)</b>	Menor concentração do analito que pode ser detectada	$LOD = \frac{LOQ}{3,33}$ LOD 3,33 vezes menor que o valor de LOQ	-	INMETRO, 2020
<b>Exatidão</b>	Ensaio de recuperação, fortificando as amostras "branco" em 4 níveis de concentração (5, 10, 25, 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) ( $n=6$ ). Avaliada em termos de recuperação (%)	Grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro.	70 – 120%	INMETRO, 2020 ANVISA, 2017
<b>Precisão e precisão intermediária</b>	Ensaio de recuperação, fortificando as amostras "branco analítico" em 4 níveis de fortificação (10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) ( $n=7$ ). Avaliada em termos de RSD (%)	Dispersão dos resultados entre ensaios diferentes, repetidos de uma mesma amostra	$RSD \leq 20\%$	INMETRO, 2020 ANVISA, 2017

Fonte: Adaptado de (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020; SANTÉ, 2019; ZANELLA *et al.*, 2015).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

A utilização do sistema UHPLC-MS/MS proporcionou alta seletividade e eficiência de separação. Bem como informações estruturais dos compostos analisados. Desta forma, foi possível a quantificação e identificação de 85 agrotóxicos, com um tempo total de análise cromatográfica de 10 minutos.

A escolha das condições cromatográficas empregadas foi avaliada baseando-se nas condições utilizadas com maior frequência no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas – LARP, pelo fato de oferecerem sinais analíticos apropriados, bom formato de picos e boa resolução para os compostos em estudo.

A Tabela 15 apresenta os compostos analisados pelo sistema UHPLC-MS/MS, utilizando o modo de ionização ESI<sup>+</sup> e ESI<sup>-</sup>, o modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ), voltagens do capilar (VC), energias de colisão (EC) e os íons precursores e íons produtos para quantificação e identificação de cada analito em estudo.

Tabela 15 – Compostos determinados por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ), voltagem do cone (VC), íons precursores e produto, e energias de colisão (EC) utilizados.

(continua)

Nº	Analito	$t_R$ (min)	VC (V)	Íon Precursor (m/z)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
					Íon produto (m/z)	EC (eV)	Íon produto (m/z)	EC (eV)
1	Acefato	1,72	8	184,1	125,1	18	143	8
2	Acetamiprido	3,69	23	223	56,1	15	126	20
3	Aldicarbe	4,34	7	208	89	7	116	7
4	Ametrina	5,65	32	228,1	68,1	36	186,1	18
5	Atrazina	5,51	30	216,1	96,1	23	174,1	18
6	Azinfós-metil	5,82	12	318	261	8	160	8
7	Azoxistrobina	5,97	17	404	329	30	372	15
8	Bitertanol	7,10	12	338,1	70,1	8	99,1	16
9	Boscalida	6,18	32	342,9	139,9	20	307	20

Tabela 15 - Compostos determinados por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ), voltagem do cone (VC), íons precursores e produto, e energias de colisão (EC) utilizados.

(continuação)

Nº	Analito	$t_R$ (min)	VC (V)	Íon Precursor (m/z)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
					Íon produto (m/z)	EC (eV)	Íon produto (m/z)	EC (eV)
10	Bromoconazol	6,40	32	376	70,1	25	158,9	35
11	Buprofezina	7,51	22	306,1	57,4	20	201	12
12	Carbaril	5,14	19	202	117	28	145	22
13	Carbendazim	2,76	24	192,1	132,1	28	160,1	18
14	Carbofurano	4,94	25	222,1	123	16	165,1	16
15	Carbofurano-3-hidroxi	3,67	25	238	181	10	163	16
16	Carboxina	5,08	25	236	87	22	143	16
17	Ciantraniliprole	4,65	20	475	444	17	286	13
18	Cianazina	5,25	28	241	96	25	241	17
19	Ciprodinil	6,68	46	226	108	25	93	33
20	Cletodim	7,35	25	360	164	20	268,1	10
21	Clomazone	5,90	23	240	89	46	125	18
22	Clorantraniprole	5,82	20	481,6	451,1	22	283,9	14
23	Clorimuron etil	6,22	25	415,1	213	17	186	15
24	Clorpirifós	7,73	27	349,9	198	20	97	32
25	Clorpirifós-metil	7,24	23	321,8	125	20	289,9	16
26	Clorprofam	6,35	49	214,1	154	18	172	8
27	Cresoxim-metil	6,83	15	314,1	116	12	206	7
28	Diazinona	6,96	20	305,1	96,9	35	169	22
29	Difenoconazol	7,21	37	406	111,1	60	251,1	25
30	Dimetoato	3,63	12	230,1	199	10	125	20
31	Dimetomorfe	6,28	30	388,1	300,9	20	165	30
32	Diurum	5,69	27	233	46,3	14	72,1	18
33	Epoconazol	6,58	25	330	101	50	121	22
34	Etefon	7,27	25	409	145	40	186	16
35	Etofenproxi	8,40	17	394,3	106,9	43	177	15
36	Fenamidona	6,15	22	312,1	236,1	14	92	25
37	Fenamifós	6,72	27	304,1	202,1	36	217,1	24
38	Fenarimol	6,56	17	331	81	34	268	22
39	Fenoxaprop- P etílico	7,43	35,25	362,13	288,08	20	121,01	33
40	Fipronil	6,77	25	435,3	250,1	26	330,2	16
41	Fluopicolida	6,30	40	383	365	15	172,9	20
42	Flupiradifurona	3,72	20	289	90	40	126,1	25
43	Fluquiconazol	6,46	37	376	348,8	18	306,9	30
44	Flutolanil	6,27	23	324,1	65	40	262,1	18
45	Flutriafol	5,56	23	302,1	123,1	29	70,2	18

Tabela 15- Compostos determinados por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ), voltagem do cone (VC), íons precursores e produto, e energias de colisão (EC) utilizados,

(continuação)

Nº	Analito	$t_R$ (min)	VC (V)	Íon Precursor (m/z)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
					Íon produto (m/z)	EC (eV)	Íon produto (m/z)	EC (eV)
46	Fluxapiraxade	6,30	44	380	248	21	131	24
47	Fostiazato	5,33	19	284	228	10	104	22
48	Hexitiazoxi	7,72	21	353	168,1	26	228,1	14
49	Imidacloprido	3,33	23	256,1	175,1	20	209,1	15
50	Indoxicarbe	7,24	25	528	150	22	203	40
51	Iprovalicarbe	6,46	19	321,1	203,1	10	119,1	16
52	Linuron	6,07	25	249,1	181,1	16	160,1	18
53	Malationa	6,27	12	331	99	24	127	12
54	Mandipropamida	6,20	16	412	328	16	125	34
55	Mecarban	6,54	12	330	97	35	227,1	8
56	Mepronil	6,29	27	270,1	91	44	119	28
57	Metalaxil	5,62	15	280,1	192,1	17	220,1	13
58	Metconazol	7,08	29	320,1	125	36	70	22
59	Metiocarbe	6,15	19	226	121	22	169	10
60	Metsulfuron metil	4,88	22	382	198,9	22	167	16
61	Monocrotofós	2,97	15	224,1	98,1	12	127,1	16
62	Monolinuron	5,24	23	215	99	34	126	22
63	Oxamil	2,46	12	237	90	10	72	10
64	Picoxistrobina	6,75	10	368	205,1	10	145,1	22
65	Piraclostrobina	7,02	20	388,1	193,9	12	163	25
66	Pirazofós	7,05	33	374	194	32	222,1	22
67	Piridafentiona	6,38	31	341	92	34	189	22
68	Pirimetanil	5,83	42	200	107	24	82	24
69	Pirimifós metil	7,06	25	306,1	108,1	32	164,1	22
70	Piriproxifeno	7,66	23	322,1	227,1	14	96	14
71	Propoxur	4,88	12	210	168	10	111	16
72	Saflufenacil	5,89	30	501,1	349	30	198	49
73	Simazina	4,87	34	202	96	22	124	16
74	Tebufenozida	6,73	12	353,1	297,1	8	133	20
75	Teflubezurom	7,66	17	380,9	158	20	140,9	40
76	Terbufós	7,54	12	289	57,2	2	103	8
77	Terbutilazina	6,15	28	230	96	28	174	16
78	Tiabendazol	3,14	42	202	131	30	175	25
79	Tiacloprido	4,02	32	253	90,1	40	126	20
80	Tiametoxam	2,81	19	292	132	22	211,2	12
81	Tolclofós-metil	7,09	30	301,1	174,9	29	125	17



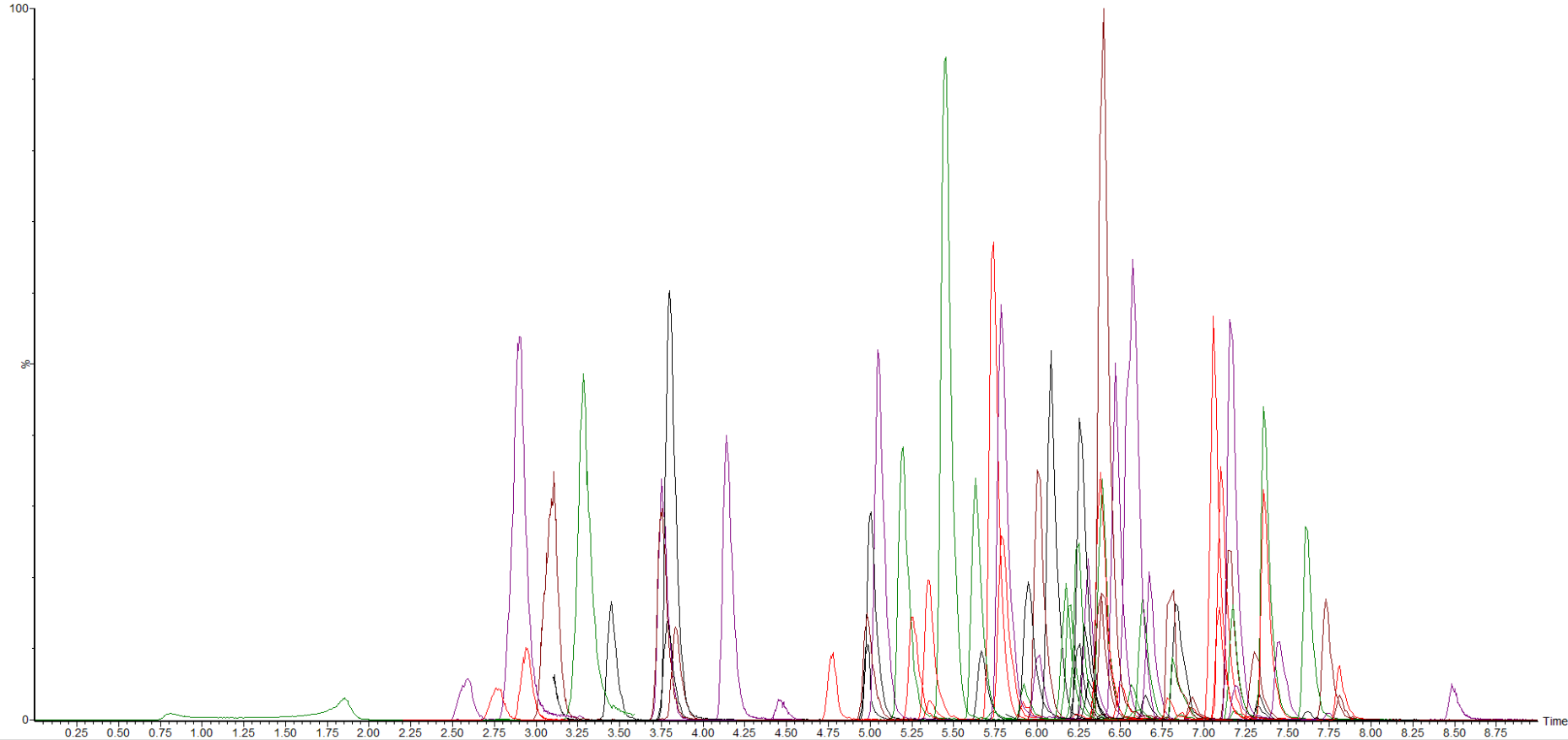
Tabela 15- Compostos determinados por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ), voltagem do cone (VC), íons precursores e produto, e energias de colisão (EC) utilizados.

Nº	Analito	$t_R$ (min)	VC (V)	Íon Precursor (m/z)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
					Íon produto (m/z)	EC (eV)	Íon produto (m/z)	EC (eV)
82	Triadimenol	6,49	12	296,1	99,1	15	70,2	10
83	Trifloxistrobina	7,27	25	409	145	40	186	16
84	Vamidotiona	3,64	17	288	148	10	188	28
85	Zoxamida	7,00	15	336	159	35	187,1	20

Fonte: A autora (2023). PC: padrão de controle; PI: padrão interno

Na Figura 3 é apresentado o cromatograma SRM, obtido a partir de uma solução padrão utilizando o extrato “branco” da matriz, na concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , contendo todos os agrotóxicos avaliados neste estudo.

Figura 3 - Cromatograma SRM obtido por UHPLC-MS/MS a partir de uma solução padrão 10 µg L<sup>-1</sup> preparada no extrato da matriz.



Fonte: A autora (2023)

## 4.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO PRETO

### 4.2.1 Avaliação da extração pelo método QuEChERS

De acordo com a Tabela 16, para os 85 agrotóxicos avaliados nos ensaios de fortificação de 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , verificou-se resultados considerados satisfatórios (recuperação 70-120%, com  $\text{RSD} \leq 20\%$ ) para 58 compostos para o método QuEChERS original, 66 compostos para o método QuEChERS acetato e 71 compostos para o método QuEChERS citrato.

Tabela 16 – Resumo dos resultados dos ensaios de fortificação (50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) em cada versão do método QuEChERS, para 85 agrotóxicos avaliados.

Recuperação (%)	Número de compostos		
	T1: QuEChERS original	T2: QuEChERS acetato	T3: QuEChERS citrato
70-120%	<b>58</b>	<b>66</b>	<b>71</b>
60-70 / 120-130%	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>3</b>
50-60 / 130-140%	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>5</b>
50< / <140%	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2</b>
RSD > 20%	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>4</b>

Fonte: A autora (2023).

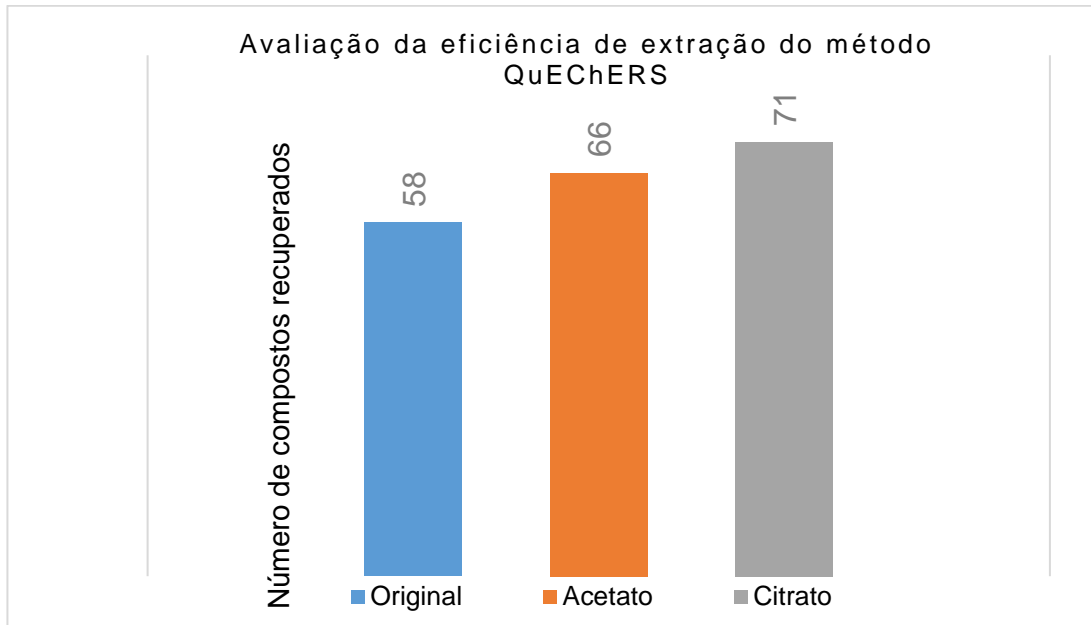
A possível razão para as diferenças encontradas nos resultados de recuperação de cada um dos métodos testados, estão associadas às influências do pH sobre a estabilidade de cada composto na solução ou ainda devido as particularidades de cada composto como solubilidade, pKa, grau de pureza e demais características mencionadas na Tabela 9. A grande maioria dos agrotóxicos são estáveis em pH ácido, contudo, alguns apresentam baixa recuperação, por estarem protonados ou ainda solubilizados na fase aquosa na etapa de partição (PRESTES *et al.*, 2009).

A proporção de *slurry* (2,5 g de amostra + 7,5 g de água) empregada neste trabalho foi baseada em trabalho previamente publicado (VIEIRA *et al.*, 2017).

Conforme a Figura 4, o método QuEChERS Original mostrou-se o menos adequado para a recuperação dos agrotóxicos no extrato da matriz feijão. Dentre os agrotóxicos que tiveram baixos percentuais de recuperação (<70%), estão o

bromuconazol, clorpirifos, clorpropam, cresoxim metílico, difeconazol, fluxapiroxade, piriproxifeno

Figura 4 - Comparação da eficiência de extração das diferentes versões do método QuEChERS (original, acetato e citrato).



Fonte: A autora (2023).

A Tabela 17 mostra o comportamento dos agrotóxicos em relação ao efeito matriz para cada versão do método QuEChERS (T1, T2 e T3) avaliada. Observa-se que para o método QuEChERS original (T1), dos 85 agrotóxicos avaliados, 75 apresentaram resultados de efeito matriz de  $\pm 20\%$  (SANTÉ, 2022). Outros 7 agrotóxicos apresentaram valores de efeito matriz de -20 a -50%, estes valores indicam um efeito matriz brando. Por outro lado, 3 agrotóxicos apresentaram valores de efeito matriz considerados altos, de  $< -50\%$  ou  $> 50\%$ . Para o método QuEChERS citrato (T3), 73 agrotóxicos apresentaram valores de efeito matriz de  $\pm 20\%$ , 11 agrotóxicos apresentaram valores brandos (-20 a -50%) e 1 apresentou valor considerado alto ( $< -50\%$  ou  $> 50\%$ ). Quando utilizado o método QuEChERS acetato (T2), 62 agrotóxicos apresentaram resultados de efeito matriz de  $\pm 20\%$ , outros 17 agrotóxicos apresentam efeito matriz brando entre as faixas de -20 a -50% e 6 agrotóxicos apresentam valores de efeito matriz de  $< -50\%$  ou  $> 50\%$ .

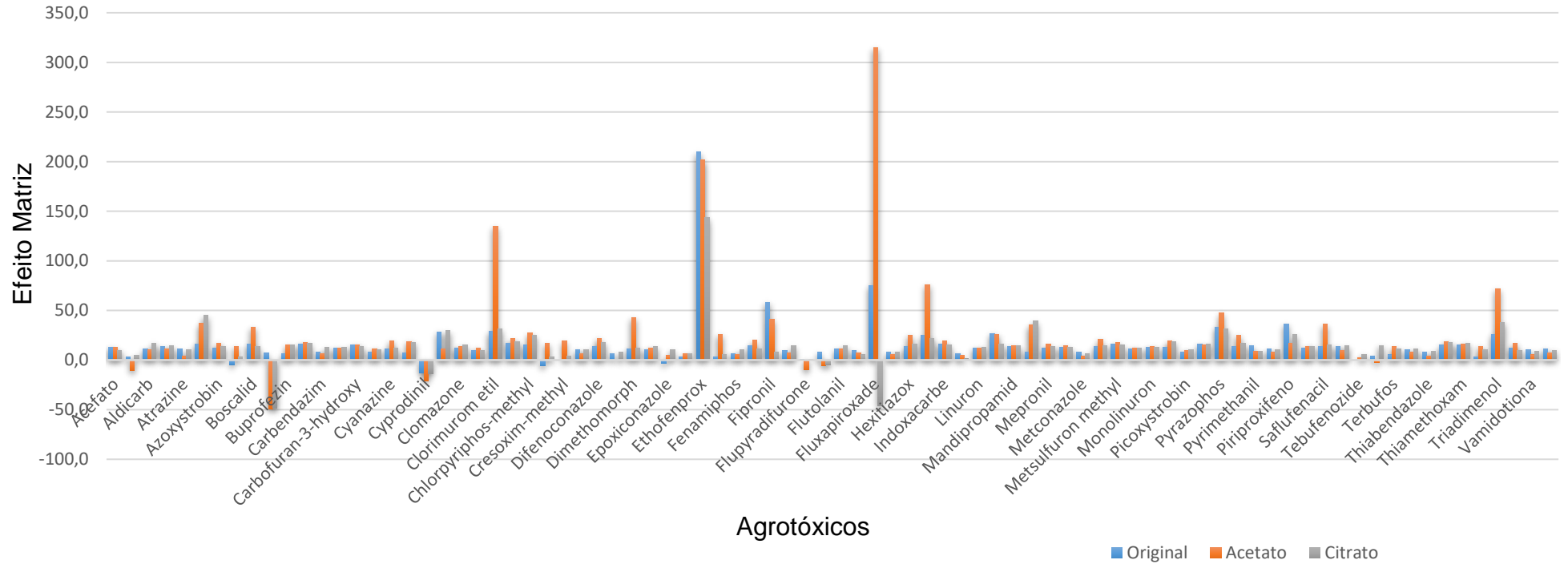
Tabela 17 – Comparação do efeito matriz (%), por faixa percentual e calculado nos métodos QuEChERS (T1: original, T2: acetato e T3: citrato), para os 85 agrotóxicos avaliados.

Efeito Matriz	Número de compostos		
	T1: QuEChERS Original	T2: QuEChERS Acetato	T3: QuEChERS Citrato
-20 a +20%	75	62	73
+/- 20 a +/-50%	7	17	11
>50%	3	6	1

Fonte: A autora (2023).

Na Figura 5, são apresentados os resultados do efeito matriz. Percebe-se as diferenças no comportamento dos compostos em relação ao método utilizado. Para alguns dos compostos foi observada uma supressão no sinal, levando a valores de efeito matriz negativo. Alguns agrotóxicos, como clorpropam, fluquiconazol, teflubezurom, fluxaproxade, flupyradifurone, epoxiconazole, apresentam efeito matriz >100% (observa-se efeito mais acentuado de incremento de sinal para o método QuEChERS acetato). Assim, fica evidente a necessidade de se realizar a etapa de quantificação dos agrotóxicos avaliados neste estudo empregando soluções analíticas preparadas no extrato da matriz. Desta forma, o efeito matriz é minimizado, garantindo uma correta quantificação dos analitos.

Figura 5 - Efeito matriz resultante para cada versão do método QuEChERS testado (T1: original, T2: acetato e T3: citrato).



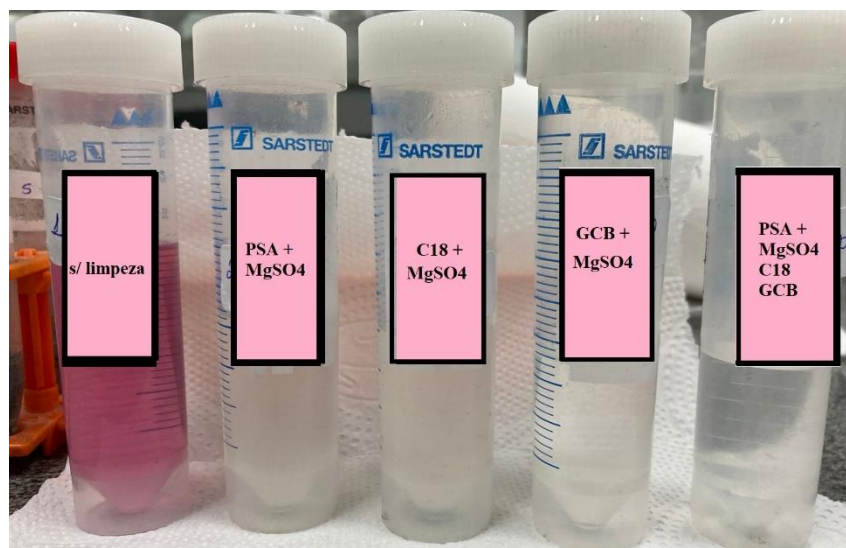
Fonte: A autora, 2023.

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

Após a realização dos ensaios preliminares, definiu-se o método QuEChERS citrato como método de extração para a determinação dos agrotóxicos alvo deste estudo. Após, avaliou-se a utilização de diferentes sorventes na etapa de limpeza dos extratos. Embora a etapa de limpeza empregando a técnica de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid phase extraction*) possa resultar na perda de alguns compostos, aumentar o tempo e o custo das análises, ela representa a alternativa mais recomendada para reduzir o efeito matriz (HAJSLOVÁ et al., 1998).

Como alternativas para a etapa de limpeza, utilizou-se os seguintes sorventes: PSA + MgSO<sub>4</sub> (T5), C<sub>18</sub> + MgSO<sub>4</sub> (T6), GCB + MgSO<sub>4</sub> (T7) e PSA + GCB + C<sub>18</sub> + MgSO<sub>4</sub> (T8). A Figura 10 apresenta os extratos obtidos após a realização de cada um dos testes de limpeza descritos na Tabela 12 (item 3.7.1). Visualmente, é possível comparar o efeito das etapas de limpeza (T5 a T8) na eliminação da coloração dos extratos em relação ao extrato sem etapa de limpeza (T4).

Figura 6 - Extratos obtidos após utilização de diferentes sorventes na etapa de limpeza, em ordem visual de remoção dos pigmentos.



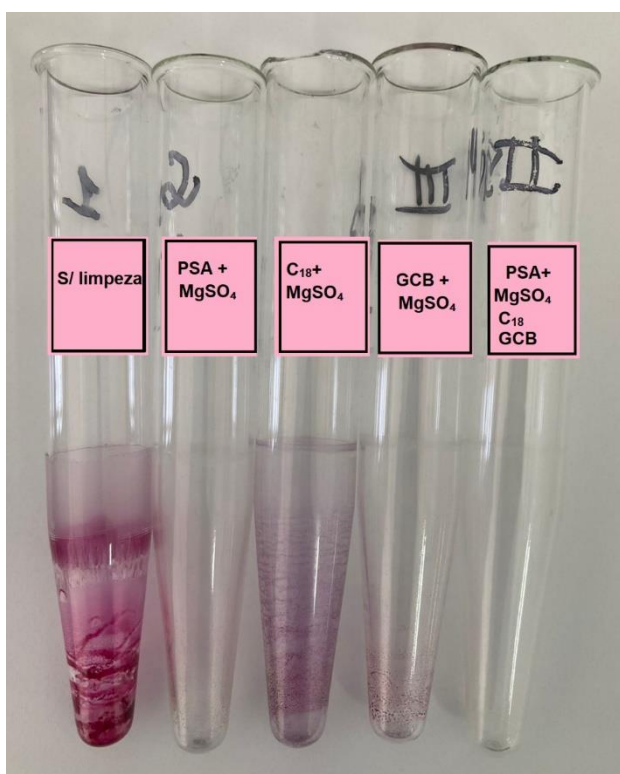
Legenda: sem limpeza (T4); PSA+MgSO<sub>4</sub> (T5); C<sub>18</sub>+MgSO<sub>4</sub> (T6), GCB, PSA + C<sub>18</sub> + GCB + MgSO<sub>4</sub> (T8).

Fonte: A autora (2023).

#### 4.2.2.1 Avaliação gravimétrica dos coextrativos obtidos após realização da etapa de limpeza

A avaliação visual da quantidade remanescente de coextrativos não-voláteis foi realizada nos extratos obtidos pelo método QuEChERS citrato após a realização da etapa de limpeza com diferentes sorventes (testes T5, T6, T7 e T8). Estes testes foram realizados em triplicata. A Figura 8 mostra a aparência visual de cada um dos testes. Visualmente, quando comparados com o teste sem etapa de limpeza (T4), a eficiência de limpeza dos extratos apresentou a seguinte ordem T8>T5>T7>T6.

Figura 7 – Avaliação visual do extrato final obtido após a realização da etapa de evaporação dos extratos obtidos pelo método QuEChERS citrato com diferentes sorventes de limpeza PSA (T5), C18 (T6), GCB (T7), PSA+C18+GCB (T8) na etapa de limpeza.



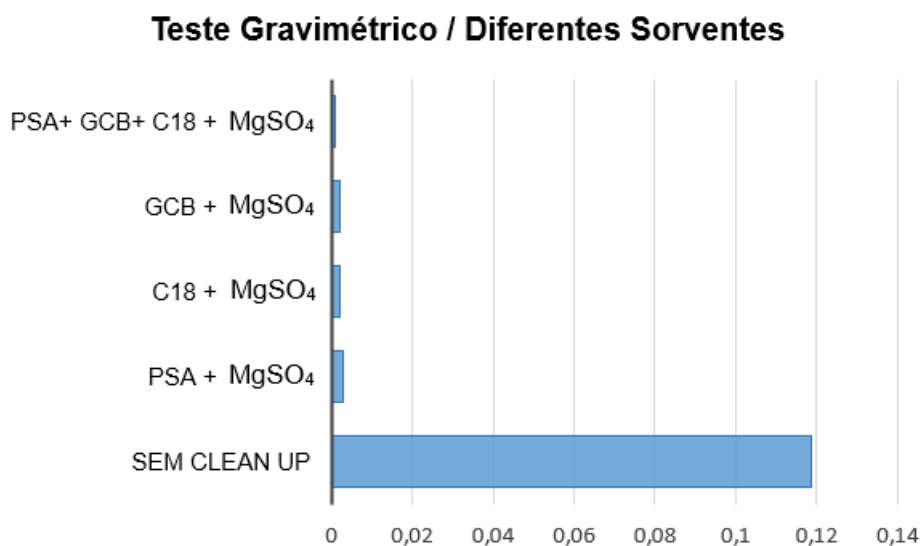
Fonte: A autora, 2023

A presença de coextrativos não voláteis está associada a ocorrência de efeito matriz, o qual pode ser prejudicial na ionização dos compostos de interesse quando da utilização da técnica de UHPLC-MS/MS.



Na Figura 8, é possível observar a eficiência de remoção de coextrativos não voláteis promovida pela utilização dos diferentes sorventes (T5, T6, T7 e T8). A mistura de sorventes GCB, C<sub>18</sub>, PSA e MgSO<sub>4</sub> (T8), demonstrou uma maior eficiência de remoção de coextrativos não voláteis quando comparado as demais sorventes. Quantitativamente, quando comparados com o teste sem etapa de limpeza (T4), a eficiência de limpeza dos extratos apresentou a seguinte ordem T8>T7>T6>T5.

Figura 8 - Gráfico da eficiência de remoção de coextrativos obtidos a partir dos testes gravimétricos utilizando o QueChERS citrato com diferentes sorventes PSA (T5), C<sub>18</sub> (T6), GCB (T7), PSA+C<sub>18</sub>+GCB (T8) na etapa de limpeza.

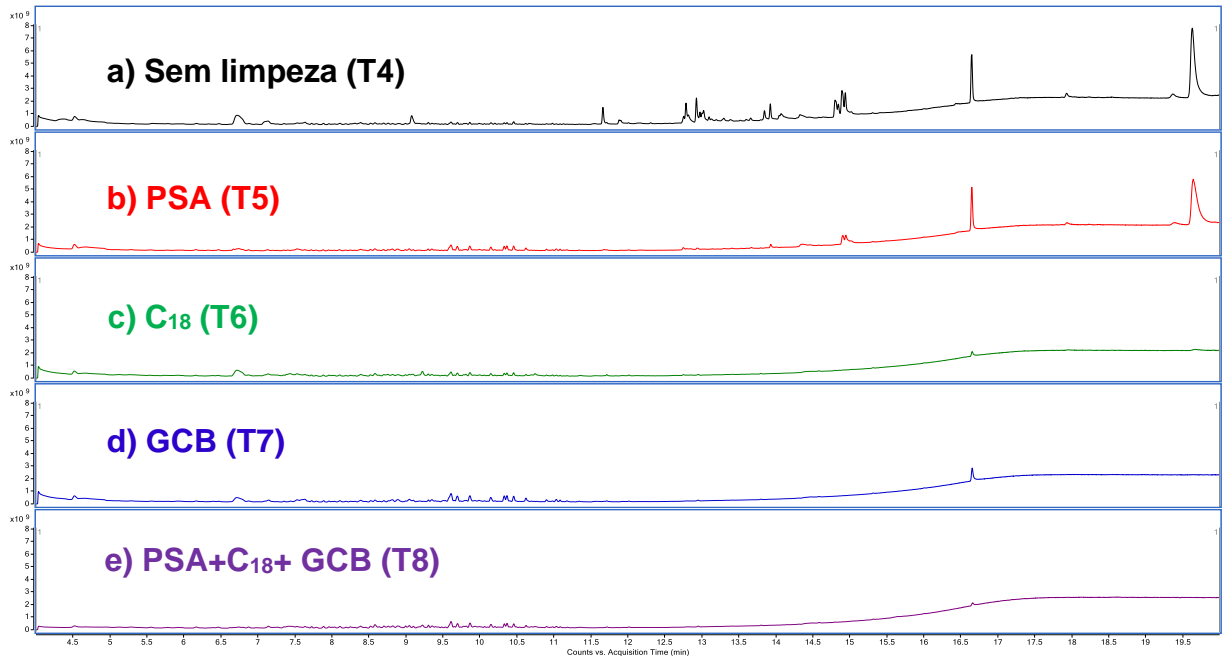


Fonte: A autora, 2023.

#### 4.2.2.1 Avaliação da presença de coextrativos empregando GC-MS/MS no modo varredura (full scan)

A Figura 9, apresenta cromatograma obtido no modo varredura (*full scan*) obtido por GC-MS/MS do extrato da matriz “branco” sem a etapa de limpeza (T4), e também com o uso dos sorventes PSA (T5), C<sub>18</sub> (T6), GCB (T7) e a combinação PSA+C<sub>18</sub>+ GCB (T8). Observa-se que os testes de limpeza utilizando C<sub>18</sub> (T6) e PSA+C<sub>18</sub>+ GCB (T8) foram os que apresentaram uma melhor remoção de interferentes da matriz.

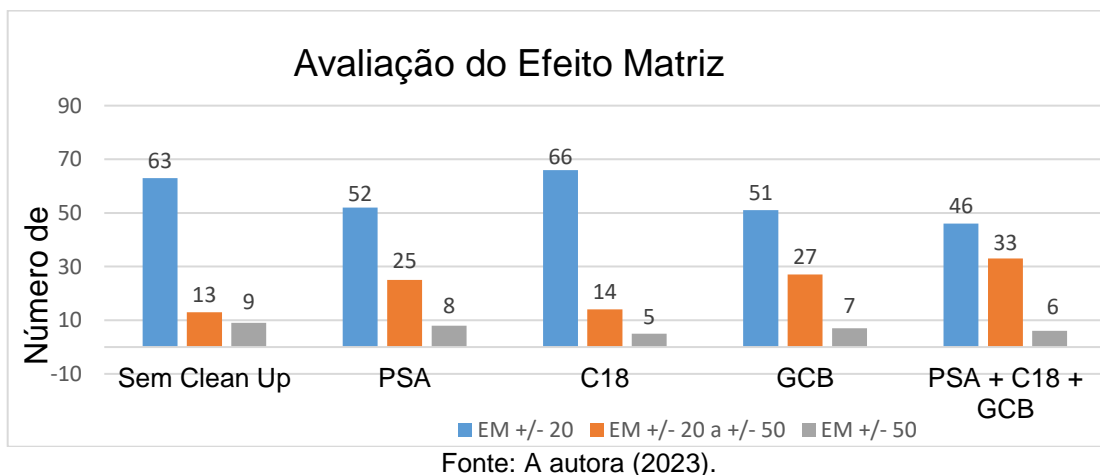
Figura 9 - Cromatogramas obtidos a partir de injeções no sistema GC-MS/MS no modo *full scan*, do extrato “branco” de feijão a) sem a etapa de limpeza (preto) e extratos obtidos após a etapa de limpeza utilizando os sorventes: b) PSA (vermelho) c) C18 (verde) d) GCB (azul) e e) combinação dos sorventes PSA+C18+ GCB (roxo)



#### 4.2.2.2 Avaliação do efeito matriz nos extratos obtidos após etapa de limpeza

Os resultados de efeito matriz são apresentados na Figura 10, com base nestes dados podemos afirmar que dos 85 compostos em estudo, 39 apresentam efeito matriz considerado insatisfatório ( $\geq 20\%$ ).

Figura 10 - Resultado do efeito matriz para os 85 agrotóxicos avaliados na etapa de limpeza, empregando diferentes sorventes.

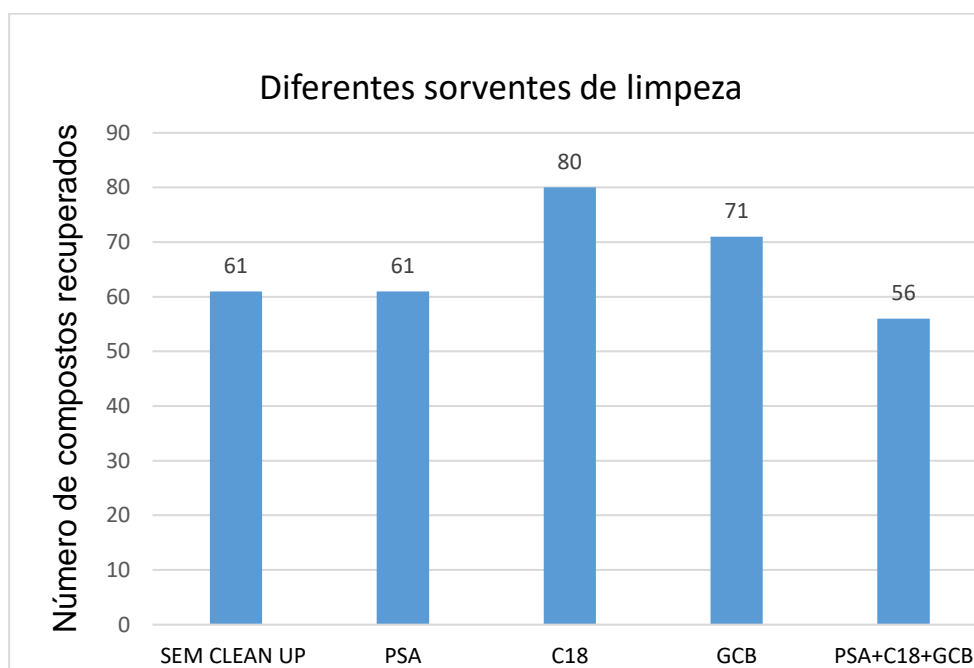


### 4.2.2.3 Avaliação dos percentuais de recuperação nos extratos obtidos após etapa de limpeza

Os resultados de recuperação são apresentados na Figura 11. O número de compostos com resultados considerados satisfatórios (recuperação 70-120% e RSD  $\leq 20\%$ ), foram avaliados em triplicata, com ensaios de fortificação no nível de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$

Ao verificarmos os resultados de recuperação, percebe-se que o método QuEChERS citrato com a etapa de limpeza C<sub>18</sub> e MgSO<sub>4</sub> (T6) foi o que apresentou maior número de compostos recuperados. Dos 85 compostos presentes no método, 80 deles apresentaram percentuais de recuperação e RSD satisfatórios.

Figura 11 – Número de compostos com recuperação (70-120% e RSD  $\leq 20\%$ ), dos 85 agrotóxicos avaliados, obtidos através da limpeza de extrato por diversos sorventes.



Fonte: A autora (2022).

Tendo por base os resultados das Figura 11, a combinação PSA+C<sub>18</sub>+ GCB (T8), foi o que apresentou os piores resultados de recuperação para os compostos avaliados, onde um grande número destes compostos não pôde ser recuperado.

No teste T5 empregou-se o sorvente etilenodiamino-N-propil (PSA) que é uma amina primária e secundária. Este material atua na remoção de pigmentos, ácidos

graxos de cadeia curta, açúcares e compostos polares através do seu elevado efeito quelante, fornecido pela estrutura bidentada (CABRERA, 2012). Apesar das diversas vantagens, a utilização de PSA como sorvente na etapa de limpeza deve ser sempre avaliada em função dos analitos de interesse e do pH do meio de extração, uma vez que este sorvente pode atuar na retenção de agrotóxicos com características ácidas (BRUZONITTI, 2014) e apresentar baixos percentuais de recuperação (<70%).

O sorvente GCB (T7), foi empregado na etapa de limpeza como alternativa para remoção de coextrativos, apresentou um desempenho de recuperações um pouco melhor que o PSA, porém o que apresentou melhor resultado foi o C<sub>18</sub>. Visualmente, o sorvente GCB, foi o sorvente que promoveu melhor remoção dos pigmentos do extrato e apresentou baixos valores de efeito matriz, devido a sua grande área superficial e boa remoção de coextrativos apolares. O sorvente GCB é reconhecido por apresentar forte interação com compostos planares.

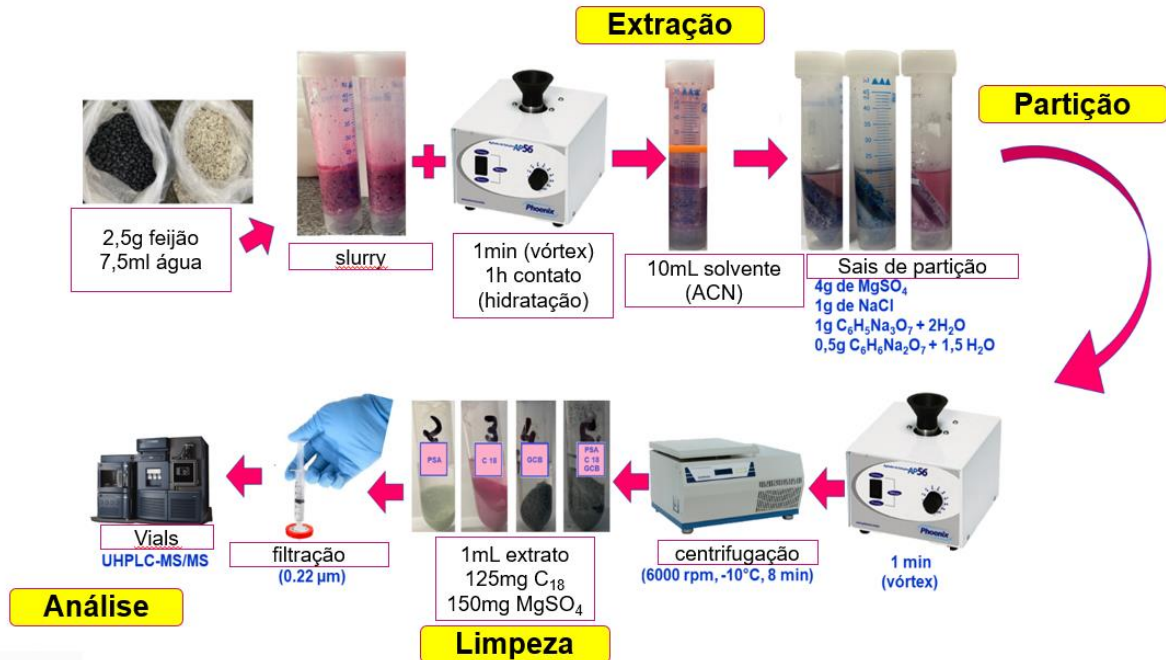
Entre os sorventes de sílica ligado, o octadecilsilano (ou C<sub>18</sub>) é considerado o sorvente que contém o mais alto espectro de retenção de coextrativos. É usualmente empregado para a remoção de interferentes apolares em diversos tipos de matrizes, principalmente com alto teor de gordura (CABRERA *et al.*, 2012). Levando em consideração essas vantagens e observando os bons resultados obtidos na sua utilização como sorvente na etapa de limpeza após extração no método QuEChERS citrato, optou-se por realizar a validação utilizando C<sub>18</sub> como sorvente de limpeza.

#### 4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Segundo a ANVISA, a validação de um método analítico tende a comprovar que ele é adequado à finalidade a que se destina produzindo resultados confiáveis, atendendo aos critérios de aceitação recomendáveis, assegurando a qualidade dos resultados analíticos, com confiabilidade e precisão.

O método proposto (Figura 12), baseia-se no método QuEChERS citrato, com modificação na etapa de limpeza, o qual foi desenvolvido, validado e aplicado no preparo de amostras de feijão preto.

Figura 12 - Procedimento de extração e limpeza de extrato otimizado para determinação de resíduos de agrotóxicos em feijão preto por UHPLC-MS/MS.



Fonte: A autora (2023).

Para a validação do método em um primeiro momento realizou-se a etapa de fortificação da amostra em quatro níveis (10, 25, 50 e 100  $\mu g kg^{-1}$ ). Como padrão de controle foi utilizado a atrazina- d5, a qual tem por finalidade comprovar a eficiência e avaliar se houve ou não perdas durante o processo. Como forma de verificar a manutenção do sinal analítico, foi utilizado como padrão interno o trifenilfosfato (TPP). Após pesou-se 2,5 g de amostra (feijão), preparou-se um slurry adicionando 7,5 mL de água ultrapura, seguido por agitação de 1 min em vortex e após aguardou-se um tempo de contato de 1 hora, para hidratação da amostra e maior interação entre o solvente e a amostra. Após, foi adicionado a este slurry 10mL de acetonitrila, para a realização da extração dos compostos, seguida de agitação por 1 min em vortex.

Para a etapa de partição adicionou-se os sais do método QuEChERS citrato que são 4 g de  $MgSO_4$ , 1 g de  $NaCl$ , 1 g  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$  e 0,5 g  $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1,5 H_2O$ . Após, realizou-se a etapa de agitação (agitador giroscópico MJ 51.3.) por 1 minuto e posterior centrifugação (8 min, 6000 rpm a  $-10^\circ C$ ).

Para a etapa de limpeza do extrato, transferiu-se 1 mL de sobrenadante para tubo eppendorf de 2mL e a este foram adicionados os sorventes 150 mg de  $MgSO_4$  e

125 mg C<sub>18</sub>. Após, agitou-se por 1 minuto e centrifugou-se (8 min, 6000 rpm a -10°C). O extrato foi diluído 5 vezes em uma solução aquosa de trifetilfosfato 20 µg L<sup>-1</sup> (padrão interno). Ressalta-se que a solução aquosa preparada com o PI, não sofre perdas dos analitos no momento da filtração.

A validação do método seguiu os itens relacionados na Tabela 13 e foi realizada de acordo com os guias ANVISA (2017), SANTÉ (2020), INMETRO (2020). As soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato “branco” de feijão.

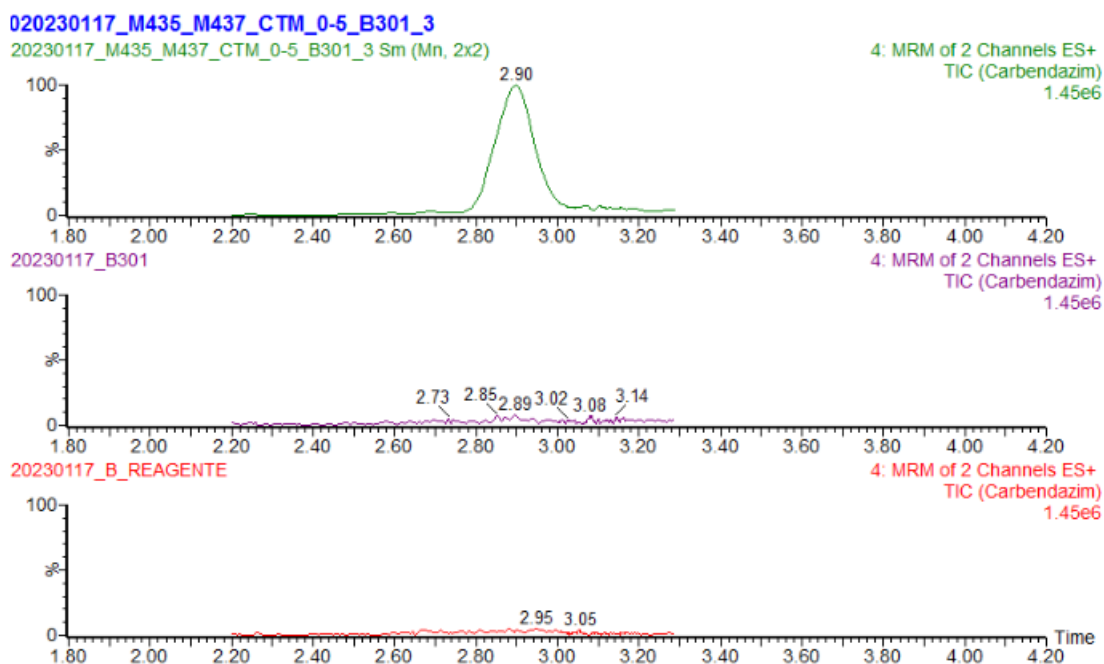
Deste modo, avaliou-se os parâmetros de validação do método analítico para os 85 agrotóxicos em estudo para os seguintes critérios: seletividade, faixa de trabalho, efeito matriz, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária).

#### 4.3.1 Seletividade

A avaliação da seletividade assegura a ausência de interferentes no mesmo tempo de retenção, íons de quantificação e de identificação dos analitos de interesse, em outras palavras, garante que a resposta analítica (pico cromatográfico) seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI et al., 2004). Desta forma, pode-se afirmar que o método proposto apresentou uma boa seletividade, avaliou-se os cromatogramas do extrato “branco” com os cromatogramas do “branco do reagente” e do extrato “branco” de feijão fortificado com uma solução 10 µg L<sup>-1</sup>. Nesta avaliação, não se observou interferentes no mesmo tempo de retenção dos agrotóxicos selecionados, garantindo a seletividade do método proposto.

A figura 13 apresenta os cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para a amostra “branco” de feijão, branco dos reagentes e da solução analítica no extrato da matriz para o composto carbendazim, na concentração de 10 µg L<sup>-1</sup>. Observa-se que não foi verificado a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção do agrotóxico.

Figura 13 – Cromatograma de íon total do composto carbendazim, obtido pela (a) solução analítica no extrato da matriz (em verde) na concentração de 10 µg L<sup>-1</sup>, (b) “branco” da amostra feijão (em roxo) e (c) o branco dos reagentes (em vermelho), obtido por UHPLC – MS/MS.



Fonte: A autora (2023).

### 4.3.2 Linearidade

Como forma de assegurar a linearidade do procedimento avaliou-se o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), obtido em curvas preparadas no extrato da matriz e no solvente (acetonitrila). As concentrações dos pontos da curva avaliados foram: 0,5, 1,25, 2,5, 5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , o que permitiu que cada composto avaliado apresentasse coeficiente de determinação  $r^2$  maior que 0,990. Obteve-se uma faixa linear de 0,5 a 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ , com  $r^2 \geq 0,99$ , para a maioria dos compostos validados por UHPLC-MS/MS (Tabela 18).

### 4.3.3 Efeito Matriz

Como forma de avaliar o efeito matriz foi feito a comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração preparadas no solvente, denominada, neste estudo, de curva de trabalho no solvente (CTS) e no extrato da amostra “branco”, denominada de curva de trabalho na matriz (CTM), através da Equação 4.

A figura 20 nos permite atentar para a faixa de concentração avaliada neste estudo que foi de 0,5 a 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Quando comparado o coeficiente angular das curvas

analíticas preparadas no solvente e na matriz para o composto carbendazim, que apresentou efeito matriz de -72%, conforme a Tabela 18, percebe-se que o coeficiente angular do solvente é maior do que na matriz, sendo assim, podemos constatar que as áreas dos pontos da curva são maiores quando não há interferência da matriz. Por outro lado, para o composto bromuconazol, que apresentou efeito matriz de 94%, o coeficiente angular na matriz é maior do que no solvente, isso ocorre, devido a presença de maior quantidade de coextrativos na fase orgânica e, conseqüentemente, aumento da resposta cromatográfica, por este motivo, optou-se em preparar as curvas analíticas no extrato da matriz.

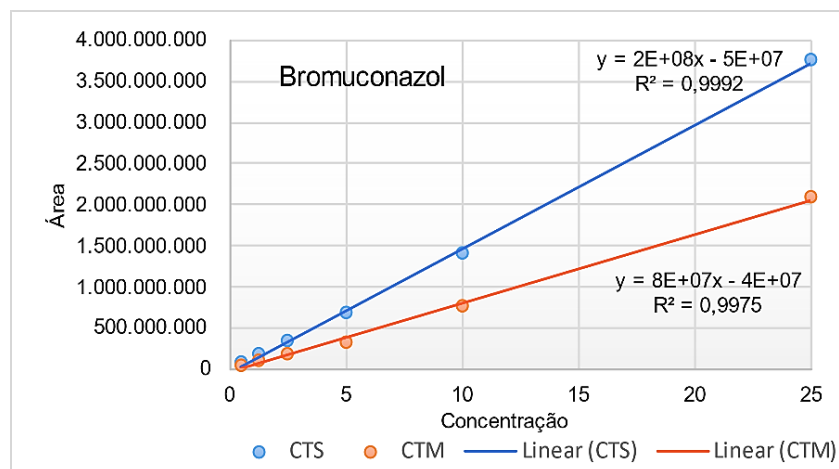
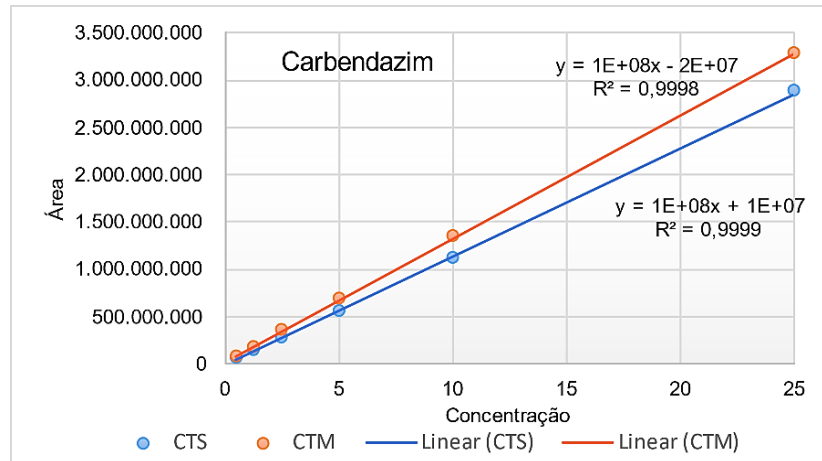
A partir desta comparação, pode-se depreender que o coeficiente angular da CTS é maior do que na CTM, mostrando que as áreas dos pontos da curva são maiores quando não há interferência da matriz. Este efeito sobre os analitos está intimamente ligado a complexidade da matriz, de forma que em amostras complexas, como os alimentos, há uma tendência que este efeito seja crescente (ORSO, 2015).

Mediante os dados, é possível identificar que a matriz exerce influência no sinal analítico, com valores de efeito da matriz bem significantes. Para os 85 dos compostos avaliados, 14 destes compostos apresentaram efeito matriz  $> 20\%$ , podendo-se considerar que o efeito matriz exerce influência na resposta do método. Como referência para esta constatação, cita-se o caso do inseticida ciantraniliprole, que apresentou efeito matriz de 125%, ou seja, um aumento considerável do sinal analítico, causando a superestimação do resultado. Este efeito acontece quando impurezas voláteis são eluídas no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse (HAJSLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2003).

No caso do aparecimento de valores negativos de efeito matriz, há fortes indicativos da ocorrência de efeito de supressão do sinal cromatográfico, e a razão para o pressuposto é a presença compostos coeluídos, oriundos da matriz, que competem com os analitos na ionização favorecendo as moléculas mais ionizáveis e mais concentradas, o que provoca uma diminuição do sinal do composto de interesse (OSHITA; JARDIM, 2015). De acordo com a Tabela 18, 25 dos compostos avaliados apresentaram valores de efeito matriz  $\geq 20\%$ .

Figura -14 - Gráfico representativo do efeito matriz ao comparar as curvas em solvente (acetonitrila) e na matriz (feijão), para os compostos carbendazim e bromuconazol.





Fonte: A autora (2023).

A realização de uma etapa de limpeza mais efetiva ou a diluição do extrato são algumas das estratégias utilizadas para minimizar o efeito matriz, bem como a calibração externa realizada com extrato da matriz. (IZEPPI, 2019).

#### 4.3.5 Exatidão e Precisão

Como forma de avaliar a exatidão e a precisão do método, considerou-se os valores de recuperação e de desvio padrão relativo recomendados pela legislação internacional (SANTÉ, 2020), valores entre 70 e 120% e  $RSD \leq 20\%$ , respectivamente.

Para a exatidão do método foram realizados ensaios de recuperação dos compostos selecionados em 4 níveis de fortificação (10, 25, 50 e  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), cada nível com 6 replicatas. Os resultados mostraram que 55 dos 85 agrotóxicos avaliados apresentaram valores de recuperação aceitáveis a partir do nível de fortificação de 10

$\mu\text{g kg}^{-1}$ ; 29 agrotóxicos apresentaram recuperações adequadas a partir do nível  $25 \mu\text{g kg}^{-1}$  e apenas 1 agrotóxico apresentou dados de recuperação adequados ( $>70\%$ ) a partir do nível  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Por outro lado, para os valores de RSD, observou-se que todos os 85 compostos apresentaram valores adequados para os 4 níveis de concentração selecionados, conforme a Tabela 18.

A precisão intermediária foi avaliada 4 dias após a validação, e os resultados estão descritos na Tabela 18. Através da avaliação do padrão de controle atrazina-d5, percebeu-se que não ocorreram perdas durante a extração. Ademais, o padrão interno trifenílfosfato foi usado apenas para fins de verificação da manutenção do sinal analítico do instrumento, e não foi necessário o seu uso para fins de correção na etapa de quantificação.

#### **4.3.4 Limite de detecção e de quantificação**

O limite de quantificação do método (LOQ) foi considerado como sendo o menor nível de fortificação, com sinal/ruído  $>10$ , no qual a precisão e a exatidão ficaram dentro dos limites aceitáveis (recuperação 70 a 120%;  $\text{RSD} \leq 20\%$ ) (SANTE, 2019). A variação do LOQ foi de 10 a  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ . O limite de detecção foi calculado a partir do valor de LOQ, dividindo-o por 3,33. Dessa forma, o LOD variou de 3,0 a  $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Todos os valores de LOD e LOQ podem ser observados na Tabela 18.

Tabela 18 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS: LOQ, LOD, linearidade (coeficiente de determinação,  $r^2$ ), exatidão e precisão em termos de repetibilidade e precisão intermediária e efeito matriz (EM).

(continua)

Nº	Agrotóxicos	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$r^2$	Nível de Repetitividade ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), n=6				Precisão Intermediária ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), n=6				EM (%)
					Recuperação ( $\pm$ RSD)				Recuperação ( $\pm$ RSD)				
					10	25	50	100	10	25	50	100	
1	Acefato	25	7,5	1,0000	127(14)	100(8)	88(11)	88(4)	129(14)	104(6)	94(4)	90(2)	-1
2	Acetamiprido	25	7,5	0,9960	24(18)	73(10)	86(5)	92(5)	41(20)	79(3)	92(4)	97(3)	-10
3	Aldicarbe	10	3,0	0,9998	120(7)	104(6)	94(7)	90(8)	119(6)	105(8)	92(11)	93(8)	23
4	Ametrina	25	7,5	0,9990	136(2)	95(7)	83(4)	78(6)	141(6)	100(4)	82(4)	77(5)	5
5	Atrazina	10	3,0	1,0000	103(9)	90(12)	90(7)	89(3)	114(10(28))	98(4(19))	92(4)	87(4)	1
6	Azinfós-metil	25	7,5	0,9996	160(13)	113(16)	88(20)	84(18)	141(13)	105(4)	90(20)	91(13)	15
7	Azoxistrobina	10	3,0	0,9999	120(6)	101(7)	96(8)	92(5)	120(24)	102(17)	95(10)	90(8)	-5
8	Bitertanol	25	7,5	0,9994	133(26)	86(13)	80(17)	73(15)	140(24)	82(16)	80(17)	72(18)	-14
9	Boscalida	25	7,5	0,9941	35(44)	70(19)	89(9)	90(6)	29(54)	72(17)	88(12)	93(8)	-56
10	Bromoconazol	50	15,0	0,9938	32(44)	55(15)	75(16)	73(11)	43(26)	50(17)	72(13)	77(13)	-44
11	Buprofezina	25	7,5	0,9982	157(5)	87(9)	72(15)	51(20)	153(9)	83(4)	70(15)	71(12)	60
12	Carbaril	10	3,0	0,9978	103(12)	99(11)	103(6)	102(6)	103(13)	100(4)	91(6)	93(8)	5
13	Carbendazim	10	3,0	1,0000	70(12)	73(8)	73(13)	71(6)	99(15)	91(7)	92(11)	84(11)	14
14	Carbofurano	10	3,0	0,9989	81(9)	90(8)	93(5)	94(5)	85(6)	90(3)	93(4)	95(4)	18
15	Carbofurano-3-hidroxi	10	3,0	0,9968	105(9)	104(7)	101(7)	102(5)	86(15)	92(4)	94(7)	99(7)	-20
16	Carboxina	10	3,0	0,9921	107(16)	86(8)	87(13)	93(12)	41(44)	70(11)	77(12)	70(19)	13
17	Cianazina	10	3,0	0,9998	89(17)	86(8)	89(7)	94(6)	94(10)	95(8)	98(4)	94(7)	2
18	Ciantranilprole	10	3,0	0,9998	109(12)	97(19)	100(11)	99(9)	120(19)	109(10)	95(11)	95(5)	125
19	Ciprodinil	10	3,0	0,9961	108(17)	81(20)	62(22)	64(16)	118(17)	72(9)	72(15)	89(19)	10
20	Cletodim	10	3,0	0,9997	92(16)	74(10)	75(7)	74(9)	70(17)	71(18)	71(14)	70(8)	16
21	Clomazone	10	3,0	0,9999	104(14)	91(11)	92(9)	91(6)	119(8)	96(4)	92(5)	88(6)	-5
22	Clorantranilprole	10	3,0	0,9994	120(11)	95(15)	95(12)	94(12)	105(20)	92(15)	92(12)	91(5)	98
23	Clorimuron etil	10	3,0	0,9994	94(20)	84(16)	88(20)	92(6)	108(29)	96(5)	89(11)	86(13)	-80
24	Clorpirifós	25	7,5	0,9968	187(9)	97(16)	100(19)	63(10)	206(10)	97(4)	78(15)	48(8)	-54

Tabela 18 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS: LOQ, LOD, linearidade (coeficiente de determinação,  $r^2$ ), exatidão e precisão em termos de repetibilidade e precisão intermediária e efeito matriz (EM).

(continuação)

Nº	Agrotóxicos	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$r^2$	Nível de Repetitividade ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), n=7				Precisão Intermediária ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), n=7				EM (%)
					Recuperação ( $\pm$ RSD)				Recuperação ( $\pm$ RSD)				
					10	25	50	100	10	25	50	100	
25	Clorpirifós-metil	25	7,5	0,9994	146(36)	84(19)	97(20)	79(19)	219(21)	106(19)	86(15)	71(10)	-15
26	Clorprofam	25	7,5	0,9977	113(37)	77(17)	78(13)	98(20)	277(35)	150(29)	101(8)	88(14)	10
27	Cresoxim-metil	25	7,5	0,9981	160(13)	102(15)	86(16)	73(19)	109(20)	78(24)	70(12)	73(13)	-15
28	Diazinona	10	3,0	0,9998	116(6)	87(11)	82(10)	77(7)	120(11)	85(12)	80(15)	76(11)	-21
29	Difenoconazol	10	3,0	0,9990	120(6)	81(11)	79(7)	64(8)	128(22)	77(23)	70(14)	71(8)	-17
30	Dimetoato	25	7,5	0,9949	32(15)	75(7)	90(5)	95(3)	41(22)	80(3)	96(4)	101(3)	21
31	Dimetomorfe	25	7,5	0,9975	46(27)	71(8)	75(8)	80(4)	54(38)	70(4)	79(10)	84(7)	-5
32	Diurum	25	7,5	0,9970	60(20)	74(12)	87(6)	85(5)	70(14)	79(7)	84(6)	88(4)	54
33	Epoxiconazol	10	3,0	0,9998	107(9)	86(12)	84(12)	81(6)	134(10)	93(11)	85(14)	82(8)	-91
34	Etefon	25	7,5	0,9996	125(4)	89(12)	94(10)	76(13)	120(13)	82(17)	78(14)	73(18)	-78
35	Etofenproxi	25	7,5	0,9141	287(5)	119(6)	68(18)	30(9)	237(2)	93(3)	48(5)	26(29)	-39
36	Fenamidona	25	7,5	0,9957	25(49)	65(15)	80(9)	86(7)	59(20)	77(8)	86(10)	90(8)	-31
37	Fenamifós	10	3,0	0,9999	96(17)	70(13)	70(13)	73(16)	98(18)	70(14)	70(14)	70(5)	-8
38	Fenarimol	10	3,0	1,0000	100(20)	83(20)	79(16)	85(12)	72(16)	73(19)	79(9)	80(17)	22
39	Fenoxaprop-P et.	25	7,5	0,9994	133(05)	87(20)	97(20)	72(20)	130(10)	85(20)	98(19)	80(18)	25
40	Fipronil	25	7,5	0,9896	332(9)	142(6)	114(10)	80(9)	302(11)	120(2)	86(17)	70(15)	-5
41	Fluopicolida	10	3,0	0,9977	47(14)	81(13)	91(9)	91(3)	72(11)	87(5)	88(7)	95(6)	-1
42	Flupiradifurona	25	7,5	0,9979	58(9)	83(10)	90(5)	94(6)	59(12)	89(4)	97(6)	99(3)	-9
43	Fluquiconazol	10	3,0	0,9918	85(17)	84(20)	95(13)	93(16)	119(18)	93(15)	87(19)	87(19)	2
44	Flutolanil	10	3,0	0,9995	96(11)	90(8)	98(5)	91(5)	120(9)	97(8)	93(8)	94(6)	-96
45	Flutriafol	10	3,0	0,9998	70(18)	82(15)	84(12)	92(8)	76(19)	89(3)	88(12)	88(7)	50
46	Fluxapiroxade	10	3,0	0,9841	172(39)	118(15)	75(14)	74(20)	125(83)	57(80)	94(18)	105(15)	51
47	Fostiazato	10	3,0	0,9890	78(7)	85(8)	90(7)	90(3)	88(10)	91(3)	92(4)	94(3)	5
48	Hexitiazoxi	25	7,5	0,9984	171(8)	92(13)	87(23)	55(22)	195(7)	97(12)	71(11)	73(12)	-40

Tabela 18 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS: LOQ, LOD, linearidade (coeficiente de determinação,  $r^2$ ), exatidão e precisão em termos de repetibilidade e precisão intermediária e efeito matriz (EM).

(continuação)

Nº	Agrotóxicos	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$r^2$	Nível de Repetitividade ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), n=7				Precisão Intermediária ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), n=7				EM (%)
					Recuperação ( $\pm$ RSD)				Recuperação ( $\pm$ RSD)				
					10	25	50	100	10	25	50	100	
49	Imidacloprido	10	3,0	0,9998	99(40)	93(9)	89(11)	93(5)	85(17)	97(7)	103(11)	101(4)	-19
50	Indoxicarbe	10	3,0	0,9989	117(9)	89(14)	100(17)	79(18)	111(12)	88(17)	74(19)	77(17)	78
51	Iprovalicarbe	10	3,0	0,9963	56(12)	77(12)	86(6)	89(4)	80(14)	87(5)	92(7)	93(3)	-29
52	Linuron	10	3,0	0,9995	105(19)	94(15)	96(6)	92(4)	112(19)	97(13)	92(5)	90(6)	1
53	Malationa	10	3,0	0,9998	118(12)	92(13)	83(9)	85(6)	70(18)	77(17)	74(7)	82(7)	-4
54	Mandipropamida	25	7,5	0,9981	49(26)	77(13)	86(14)	89(4)	82(13)	84(8)	86(18)	93(9)	10
55	Mecarban	10	3,0	0,9954	167(8)	116(7)	113(8)	110(10)	113(17)	95(8)	84(15)	91(18)	-3
56	Mepronil	10	3,0	0,9962	97(7)	90(11)	97(6)	89(4)	94(9)	87(4)	89(8)	92(5)	45
57	Metalaxil	10	3,0	1,0000	81(12)	87(9)	89(6)	92(4)	92(13)	94(6)	94(6)	92(3)	-7
58	Metconazol	10	3,0	0,9995	71(16)	70(4)	70(5)	70(4)	90(19)	72(11)	72(18)	70(7)	9
59	Metiocarbe	10	3,0	0,9974	153(11)	111(9)	108(4)	105(7)	114(13)	95(7)	86(8)	89(11)	-94
60	Metsulfuron metil	10	3,0	1,0000	95(9)	93(5)	97(10)	95(8)	114(11)	103(5)	92(8)	86(7)	-67
61	Monocrotófos	10	3,0	0,9997	114(5)	89(7)	83(5)	78(5)	119(8)	95(1)	87(3)	83(2)	-12
62	Monolinuron	10	3,0	0,9999	94(5)	91(11)	92(7)	91(5)	116(6)	102(3)	96(6)	91(3)	11
63	Oxamil	10	3,0	0,9983	104(12)	86(9)	73(16)	90(7)	75(18)	74(5)	72(11)	83(7)	10
64	Picoxistrobina	10	3,0	1,0000	108(11)	76(18)	71(10)	78(16)	113(9)	78(10)	70(19)	70(12)	-89
65	Piraclostrobina	25	7,5	0,9993	142(4)	90(11)	97(20)	75(11)	153(10)	104(20)	88(12)	75(19)	33
66	Pirazofós	25	7,5	0,9995	150(5)	98(12)	97(10)	84(11)	153(10)	92(16)	84(15)	77(18)	-46
67	Piridafentiona	10	3,0	0,9989	93(14)	84(19)	89(8)	87(10)	110(15)	89(15)	85(11)	87(8)	-4
68	Pirimetanol	25	7,5	0,9989	132(6)	90(12)	85(7)	76(6)	162(10)	103(3)	83(5)	73(7)	-81
69	Pirimifós metil	10	3,0	0,9995	120(6)	88(6)	81(6)	70(9)	120(4)	86(10)	73(15)	70(10)	6
70	Piriproxifeno	25	7,5	0,9969	206(10)	102(10)	94(39)	51(25)	224(7)	102(9)	70(14)	57(20)	-56
71	Propoxur	10	3,0	0,9999	107(6)	97(8)	99(8)	97(4)	114(6)	103(5)	98(4)	96(3)	-71

Tabela 18 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS: LOQ, LOD, linearidade (coeficiente de determinação,  $r^2$ ), exatidão e precisão em termos de repetibilidade e precisão intermediária e efeito matriz (EM).

Nº	Agrotóxicos	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$r^2$	Nível de Repetitividade ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), n=				Precisão Intermediária ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), n=7				EM (%)
					Recuperação ( $\pm$ RSD)				Recuperação ( $\pm$ RSD)				
					10	25	50	100	10	25	50	100	
72	Saflufenacil	10	3,0	0,9990	90(12)	96(10)	101(8)	105(5)	94(11)	98(8)	98(11)	97(7)	29
73	Simazina	10	3,0	0,9999	94(14)	91(11)	91(6)	88(5)	106(16)	97(2)	91(4)	89(4)	-66
74	Tebufenozida	10	3,0	0,9998	81(19)	70(17)	70(7)	73(14)	120(4)	76(6)	70(4)	70(6)	30
75	Teflubezurom	10	3,0	0,9979	120(15)	84(18)	95(36)	69(15)	233(12)	117(11)	96(19)	73(15)	10
76	Terbufós	25	7,5	0,9971	179(10)	114(15)	75(20)	70(13)	183(13)	90(16)	70(12)	70(11)	-73
77	Terbutilazina	10	3,0	0,9994	96(19)	89(9)	94(8)	85(4)	99(7)	88(4)	84(3)	79(4)	-68
78	Tiabendazol	10	3,0	0,9992	101(6)	70(5)	60(2)	55(4)	115(29)	70(4)	70(17)	72(18)	-19
79	Tiacloprido	10	3,0	0,9999	94(6)	86(8)	86(5)	82(5)	117(6)	104(3)	98(3)	96(4)	8
80	Tiametoxam	10	3,0	0,9985	71(14)	81(7)	85(6)	86(6)	92(8)	100(7)	100(8)	102(5)	-29
81	Tolclofós-metil	25	7,5	0,9991	140(9)	93(9)	93(14)	75(10)	179(12)	101(17)	83(18)	74(14)	24
82	Triadimenol	10	3,0	0,9993	114(17)	93(15)	86(14)	82(15)	98(18)	85(11)	87(15)	89(19)	-98
83	Trifloxistrobina	25	7,5	0,9991	141(5)	93(15)	95(12)	75(15)	150(8)	86(19)	78(10)	72(17)	39
84	Vamidotiona	10	3,0	0,9999	72(6)	77(6)	80(5)	81(5)	95(14)	87(3)	82(5)	83(4)	-37
85	Zoxamida	25	7,5	0,9898	15(86)	59(21)	85(11)	85(8)	67(19)	75(13)	80(19)	86(9)	-7

Fonte: A autora (2023)

#### 4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO EM AMOSTRAS COMERCIAIS

O método desenvolvido neste trabalho foi aplicado para a análise de 15 amostras de feijão preto de diferentes cidades e regiões do estado do Rio Grande do Sul (Tabela 7). De acordo com a Tabela 19, das amostras avaliadas, 10 delas (66,67%) apresentaram resíduos, de pelo menos, um dos agrotóxicos estudados. Dos 85 agrotóxicos avaliados neste estudo, 6 foram quantificados e/ou detectados nas amostras analisadas, sendo que 3 (clomazona, pirimifosmetílico e atrazina) não são autorizados para a cultura de feijão no Brasil.

Dos agrotóxicos que apareceram com maior frequência, destaca-se o fungicida carbendazim (7 amostras), numa faixa de concentração de < LOQ a 0,032 mg kg<sup>-1</sup>. No Brasil, o carbendazim está entre os 20 agrotóxicos mais comercializados e tem seu uso autorizado para as culturas de algodão, cana de açúcar, cevada, citros, feijão, maçã, milho, soja e trigo (ANVISA, 2022a). A presença do carbendazim e dos seus metabólitos no meio ambiente, principalmente na água está diretamente relacionada com as propriedades físico químicas, como a solubilidade em água, o coeficiente de adsorção da matéria orgânica do solo, a constante da Lei de Henry e o tempo dessas substâncias no solo e na água (PEREIRA, 2018).

Os fungicidas da classe dos benzimidazóis estão entre as classes mais usadas e conhecidas no controle de fitopatógenos. Têm como principais representantes o benomil, o tiofanato-metílico, tiobendazol e carbendazim, os quais são fungicidas sistêmicos e atuam com uma alta seletividade na interrupção do ciclo celular dos fungos. O tiobendazol foi o primeiro fungicida dessa classe a ser desenvolvido e era utilizado como vermífugo humano e veterinário (SILVA et al., 2014).

A ANVISA, de acordo com Resolução - RDC nº 739/2022 do dia 08 de agosto de 2022, baseada na avaliação toxicológica realizada pela sua Gerência-Geral de Toxicologia, decidiu pela proibição do uso do carbendazim no Brasil, devido ao seu potencial de causar mutagenicidade, toxicidade para a fisiologia reprodutiva e toxicidade para o desenvolvimento embrionário e neonatal e, ainda, da impossibilidade de determinação de limites seguros de exposição humana para esses desfechos toxicológicos. A partir de 08 de fevereiro de 2023 fica proibido a sua comercialização, porém o seu uso é permitido até o seu esgotamento, respeitando-se o prazo de validade do produto (ANVISA, 2022b).

É possível observar uma grande discrepância quanto aos LMR estabelecidos por certos órgãos internacionais com aqueles estabelecidos pelo Brasil (BOMBARDI, 2017).

Neste estudo, o agrotóxico pirimifos-metílico, foi encontrado em pequenas quantidades em 5 das amostras analisadas. Este agrotóxico, faz parte do grupo dos organofosforados, é utilizado como inseticida e acaricida, combate o caruncho (*Sitophilus zeamais*), mosquitos adultos e larvas (*Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*). Este tipo de agrotóxico não é autorizado no cultivo de feijão.

O carbaril, outro agrotóxico encontrado em uma das amostras analisadas, mesmo que em níveis considerados desprezíveis, faz parte do grupo químico do metilcarbamato de naftila, é um inseticida e regulador de crescimento, tem seu uso autorizado no cultivo de feijão, segundo a ANVISA com um LMR de 0,50 mg kg<sup>-1</sup>.

O imidacloprido é um inseticida pertencente ao grupo químico dos neonicotinoides e também foi detectado em uma das amostras analisadas, na concentração de 0,0105 mg kg<sup>-1</sup>. Esse agrotóxico possui o uso autorizado no Brasil para a cultura de feijão com LMR de 0,07mg kg<sup>-1</sup>. É um inseticida sistêmico e de contato altamente efetivo. Esta substância é utilizada principalmente em aplicação foliar contra insetos sugadores, como a mosca branca e outros polinizadores (POSPISCHIL, 2002). Está entre os nove ingredientes ativos de agrotóxicos mais comercializados no Brasil no ano de 2020 (IBAMA, 2020). Neste mesmo ano, foram vendidas em território nacional 9.401,65 toneladas do princípio ativo. Estudos apontam que o imidacloprido tem alta capacidade de danificar o fígado, provocando lesões do tipo hepatocelular (BIZERRA, 2018).

A Tabela 19 apresenta os resultados para a análises das 15 amostras em que foi possível identificar alguns resíduos de agrotóxicos avaliado neste estudo.



Tabela 19 – Resíduos de agrotóxicos encontrados nas amostras de feijão preto, empregando o método desenvolvido neste trabalho.

Agrotóxicos	Concentração nas amostras (mg kg <sup>-1</sup> ) dos agrotóxicos detectados														
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15
Atrazina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d	n.d	<LOQ	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Carbendazim	n.d.	0,0173.	<LOQ	n.d.	n.d.	0,0197	0,0319	n.d.	0,0105.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ
Carbaril	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0133	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Clomazona	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d.	n.d.	n. d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d
Imidacloprido	n.d	n.d	n.d	n.d.	n.d.	0,0105	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pirimifos metílico	n.d	0,0170	<LOQ	<LOQ	<LOQ.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0115

Fonte: A autora (2023).

A atrazina, foi um dos agrotóxicos encontrados nas amostras, porém em concentrações < LOQ, ressalta-se que a mesma tem seu uso não autorizado para este tipo de cultivo (feijão). As características físico-químicas da atrazina, a tornam um herbicida persistente no ambiente, devido sua baixa capacidade de biodegradabilidade, pode ser comumente detectada em água tanto superficial e de profundidade. O tempo de meia vida da atrazina varia conforme o meio em que se encontra, depende principalmente do tipo de solo e condição climática, onde em baixas temperaturas (20 °C), pode persistir por um tempo maior (COLLA et al., 2008, CARMO et al., 2013, ROSTAMI et al., 2021).

Tabela 20 – Resultados da análise das amostras reais de feijão, em relação a concentração encontrada, limite de quantificação do método (LOQ) e o limite máximo de resíduos (LMR) permitidos pela ANVISA, UE e Codex Alimentarius.

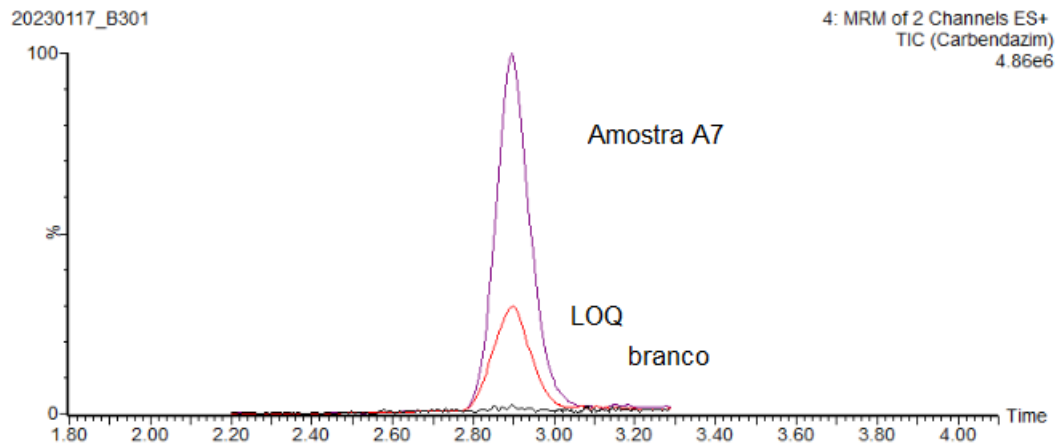
Agrotóxicos	Número de amostras	Concentração encontrada (mg kg <sup>-1</sup> )	LOQ (mg kg <sup>-1</sup> )	ANVISA (mg kg <sup>-1</sup> )	UE (mg kg <sup>-1</sup> )	Codex Alimentarius (mg kg <sup>-1</sup> )
Atrazina	2	<LOQ a 0,0063	0,01	-		
Carbendazim	7	<LOQ a 0,0319	0,01	2,00		0,50
Carbaril	1	0,0133	0,01	0,50		
Clomazone	1	<LOQ 0,0029	0,01			
Imidacloprida	1	0,0105	0,01	0,07		2,00
Pirimifos metílico	5	<LOQ a 0,0170	0,01	-		

Fonte: A autora (2023), adaptado de ANVISA (2023a); EU (2023); FAO (2023).

Legenda: \*Limite mínimo de determinação analítica.

A figura 14 apresenta o cromatograma obtido por UHPLC-MS/MS para a amostra “de feijão (A7), para o composto carbendazim, na concentração de 10 µgL<sup>-1</sup>. Observa-se a confirmação do composto para a amostra real quando comparada com o branco e com o LOQ da amostra.

Figura 14 – Cromatograma de íon total do composto carbendazim, obtido pela (a) solução analítica no extrato da amostra real quando comparada com o branco (em preto) na concentração de  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , (b) LOQ da amostra feijão (em vermelho) e (c) a amostra real A7 (em roxo), obtido por UHPLC – MS/MS.



## 5 CONCLUSÕES

Este estudo possibilitou o desenvolvimento e validação de um método de preparo de amostras para a determinação de resíduos de agrotóxicos em feijão preto empregando método QuEChERS e UHPLC-MS/MS. O procedimento de extração foi avaliado através de diferentes ensaios, utilizando as principais versões do método QuEChERS. Através dos resultados obtidos pode-se perceber que a melhor versão para a extração de agrotóxicos em feijão preto foi o método QuEChERS citrato.

Para a escolha do melhor método de limpeza, foram realizados 5 ensaios diferentes, e o material que apresentou melhores recuperações e limpeza do extrato, foi  $C_{18}+MgSO_4$  e. Em relação ao efeito matriz, conclui-se que é necessário realizar o preparo das curvas analíticas no extrato da matriz, uma vez que o efeito se mostrou pronunciado para mais de 14 dos compostos avaliados com efeito matriz > 20%.

O método foi validado de acordo com os parâmetros do INMETRO e ANVISA, e os resultados se mostraram satisfatórios para a determinação de 85 agrotóxicos em feijão preto.

Referente as 15 amostras comerciais provenientes de diferentes mercados do estado do Rio Grande do Sul analisadas, 10 delas apresentaram resíduos de agrotóxicos. Destes agrotóxicos avaliados no estudo, 6 foram quantificados e/ou detectados nas amostras analisadas, sendo que 3 (clomazona, pirimifosmetílico e atrazina) não são autorizados para a cultura de feijão no Brasil.

Dos agrotóxicos que apareceram com maior frequência, podemos citar o fungicida carbendazim (7 amostras), o agrotóxico pirimifos-metílico, que foi encontrado em pequenas quantidades (5 das amostras), o carbaril,, mesmo que em níveis considerados desprezíveis, o imidacloprido e a atrazina.

Considerando-se os objetivos iniciais e os resultados obtidos, pode-se dizer que os mesmos foram atingidos. O método se mostrou preciso e exato, com limites de quantificação variando de 10 a 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e com recuperações entre 70 e 120%, além de apresentar boa linearidade ( $r^2 > 0,990$ ), com valores de LOQ entre 0,01 e 0,031  $\text{mg kg}^{-1}$ . A detecção dos compostos utilizando equipamentos UHPLC-MS/MS proporcionou satisfatória detectabilidade, seletividade e precisão na etapa de validação do método.

## REFERÊNCIAS

ABUBAKAR, Y. et al. Pesticides, History, and Classification. *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*, p. 29–42, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819304-4.00003-8>

AGILENT, 2022. Disponível em: <https://www.agilent.com/en/product/sample-preparation/solid-phase-extraction-spe/bond-elut-nexus-bond-elut-nexus-wcx>. Acesso em: 28 jul. 2022.

AKANITAPICHAT, P.; PHRAIBUNG, K.; NUCHKLANG, K. 2010. Antioxidant and hepatoprotective activities of five eggplant varieties. **Food and Chemical Toxicology**: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. v. 48, p. 3017-21, 2010

AKTAR, M.A.; KHATUN, R.; PRODHAN, M. D. H. Determination of pesticide residues in eggplant using modified QuEChERS Extraction and Gas chromatography. **International J. Agron. & Agri. Res**, v. 11, n. 2, p. 22-31, 2017.

ALAM, M. M., HASAN, R., RAHMAN, S. M., CHOUDHURY, M. A. R., PRODHAN, M. D. H. Analysis of pesticide residues in vegetables purchased from local markets of Mymensingh district of Bangladesh based on QuEChERS Extraction and Gas Chromatography. **Asian-Australasian Journal of Food Safety and Security**, v. 6, n. 1, p. 10-17, 2022.

ANASTASSIADES M. SCHERBAUM E, TASDELEN B, STAJNBAHER D. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. **Crop protection, public health, environmental safety**, v. 439. Wiley-vch, Weinheim. Germany, 2007.

ANASTASSIADES, M. SCHERBAUM E, TASDELEN B, STAJNBAHER D. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-31, 2003.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxicos em alimentos**. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/perguntasfrequentes/agrotoxicos/agrotoxicos-em-alimentos>. Acessado em: 18 jul 2022.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério da Saúde. RDC nº 166, de 24 de junho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 25 jul. 2017.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA 2017-2018**. 2019a. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3770json-file-1>. Acessado em: 17 mai 2022.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Monografias Autorizadas. 2022a. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias>. Acesso em: 21 jul. 2022a.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério da Saúde. RDC nº 739/2022 do dia 08 de agosto de 2022. Dispõe sobre a proibição do ingrediente ativo Carbendazim em produtos agrotóxicos no país e sobre as medidas transitórias de mitigação de riscos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 08 ago. 2022b.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). 2º Seminário sobre Mercado de Agrotóxicos e Regulação. Brasília, DF, 2012. Disponível em: <http://www4.planalto.gov.br/consea/comunicacao/noticias/2012/abril-2012/anvisa-realizaseminario-sobre-agrotoxicos> acesso em 15 de abril de 2023

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA): relatório de atividades 2001 a 2007. Brasília: Anvisa, 2008. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-deagrotoxicos-para>

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

ARAMENDIZ-TATIS, H.; CARDONA-AYALA, C.; DE ORO, R. Período de interferência de arvenses en el cultivo de berinjela (*Solanum melongena* L.). **Agronomía Colombiana**, Bogotá, v. 28, p.81 - 88, 2010.

ARDREY, R.E. "Liquid chromatography – Mass spectrometry: An introduction." Ed. **John Wiley**. England. 2003.

ARIAS, J. **Emprego da quitosana no método QuEChERS para análise multirresíduo de medicamentos veterinários em leite**. 2016, 74 p. Dissertação (Mestrado em química) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.

ARIAS, J.; SCHNEIDER, A.; ANDRADE, J.; VIEIRA, A.; CALDAS, S.; PRIMEL, E. Chitosan from shrimp shells: a renewable sorbent applied to the clean-up step of the QuEChERS method in order to determine multi-residues of veterinary drugs in different types of milk. **Food Chemistry**. 2017.

ARIAS, J. L. O; ROMBALDI, C.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Alternative sorbents for the dispersive solid-phase extraction step in quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction of pesticides from rice paddy soils with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1360, p. 66–75, 2014.

ARRUDA, M. A. Z.; SANTELLI, R. E. Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 638-646, 1997.

AVIZ, R.O, CASAIS, L.K.N., VASCONCELOS, E.S., BORGES, L.S. **Estufas – Cultivo de berinjela é favorecido pela técnica**. 2019. Disponível em:

<https://revistacampoenegocios.com.br/estufas-cultivo-de-berinjela-e-favorecido-pela-tecnica/>. Acessado em: 28 mai. 2022.

AZEVEDO, C.P. de; CAFÉ FILHO, A.C.; HENZ, G.P.; REIS, A. Recomendações de manejo da antracnose do pimentão e das pimentas. **Embrapa Hortaliças- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2006.

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, n. 5, p. 900-907, 2014.

BARKAI-GOLAN, R. Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control. Amsterdam, 2001.

BARCHANSKA, H. et al. Atrazine, triketone herbicides, and their degradation products in sediment, soil and surface water samples in Poland. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, n. 1, p. 644–658, 2018.

BASUNY, A.M.M; ARAFAT, S.M.; EL-MARZOOQ, M. A. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of anthocyanins from eggplant peels. **Journal of Pharma Research & Reviews**, v. 2, n. 3, p. 50-57, 2012.

BAYER S.A. Correio Agrícola. Editado por Bayer S. A. – Proteção de Plantas. 1 ed. São Paulo, 1997. 23p.

BHANTI, M., TANEJA, A. Monitoring of organochlorine pesticide residues in summer and winter vegetables from Agra, India - **A case study Environmental Monitoring and Assessment**, v. 110, p. 341-346, 2005.

BIZERRA, P.F.V.; **Mecanismos de toxicidade do inseticida imidacloprido no fígado de rato**. 2018.. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal. Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Dracena, 2018.

BOMBARDI, Larissa Mies. Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia. FFLCH-USP, 2017.

BOONJOB, W. *et al.*, Flow-through dispersed carbon nanofiber-based microsolidphase extraction coupled to liquid chromatography for automatic determination of trace levels of priority environmental pollutants. **Analytical Chemistry**. v. 83, n. 13: p. 5237-44, 2011.

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

BOUDINA, A; EMMELIN, C.; BAALIOUAMER, A.; GRENIER-LOUSTALOT, M. F.; CHOVELON, J. M. Photochemical behaviour of carbendazim in aqueous solution. **Chemosphere**, v. 50, p. 649-655, 2003

BRASIL. Lei n. 7.802, de 12 de julho de 1989 (lei federal dos agrotóxicos). Brasília, Diário Oficial da União, 12 jul. 1989.

BRASIL. Decreto n. 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei n. 7.802/89 (lei federal dos agrotóxicos). Brasília, Diário Oficial da União, 8 jan. 2002.

BRASIL. Constituição (1989). Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989. Lei Nº 7.802, de 11 de Julho de 1989. Brasília. Disponível em: <<[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/L7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm)>>. Acesso em: março 2022.

BROUSMICHE, D. W. et al. Functionalization of divinylbenzene/N-vinylpyrrolidone copolymer particles: Ion exchangers for solid phase extraction. **Journal of Chromatography**, v. 1191, p. 108-117, 2012.

BRUZZONITI, M. C. et al. QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: A critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 17, p. 4089–4116, 2014.

BÜCHEL, K. H. Chemistry of pesticides. New York: J. Wiley, 1983. 400 p

CABRERA, L. C. *et al.* Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 227-240. Brasil, 2012.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. Brasília: **EMBRAPA**, 2003.

CAMPOS, D. D. P. **Extração, purificação e isolamento de antocianinas de jambolão e avaliação dos seus efeitos biológicos (Syzygium cuminii)**. Dissertação, Instituto de Química, UNICAMP, SP, 2006.

CANÑAS, A.; RICHTER, P. Solid-Phase Microextraction Using Octadecyl-Bonded Silica Immobilized on the Surface of a Rotating Disk: Determination of Hexachlorobenzene in Water. **Anal. Chim. Acta**, v. 743, p. 75–79, 2012.

CANELLA, K. M. N. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel –influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**. v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001.

CARBO, L., MARTINS, E. L., DORES, E. F., SPADOTTO, C. A., WEBER, O. L., DELAMONICA-FREIRE, E. M. Acetamiprid, carbendazim, diuron and thiamethoxam sorption in two Brazilian tropical soils. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 42, n. 5, p. 499-507, 2007.

CARDOSO, J.M., FREITAS, S.S. Evaluation of the matrix effect on the quantitation of pesticides methyl parathion, folpet and mirex in water using gas chromatography with electron capture detection (GC/ECD). **Brazilian Journal of Development**, 98803, 2020.



CARMO, D. A. DO et al. Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazine. *Revista Ambiente e Agua*, v. 8, n. 1, p. 133–143, 2013.

CECÍLIO FILHO, A. B. Horta em casa: saúde, prazer e economia. **Unesp: Jaboticabal**, 130p., 2009.

CEN, European Committee for Standardization, CEN/TC 275 15662:2008: foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/ partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method. 2008.

CHAI, L. K., ZAIDEL, N. D., HANSEN, H. C. B. A rapid multi-residue method for the determination of pesticide residues in choi sum, yardlong beans and aubergines. **Food chemistry**, v. 131, n. 2, p. 611-616, 2012.

CHEN, X., LIU, X., DONG, B., HU, J. Simultaneous determination of pyridaben, dinotefuran, DN and UF in eggplant ecosystem under open-field conditions: Dissipation behaviour and residue distribution. **Chemosphere**, v. 195, p. 245-251, 2018.

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, n. 3, p. 623-636, 2008.

CODEX ALIMENTARIUS. Method validation, joint FAO/WHO food standards programme. **Codex on Methods of Analysis and Sampling**, Budapeste, 2001.

CODEX ALIMENTARIUS. **Pesticides**. 2010. Disponível em: <<https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/themes/pesticides/es/>>. Acessado em: 01 jun. 2022.

COLLA, L. M. et al. Isolation and screening of fungi to bioremediation from triazine herbicide contaminated soil. *Ciencia e Agrotecnologia*, v. 32, n. 3, p. 809–813, 2008.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia, 2a ed, Campinas, SP: **Ed. UNICAMP**, 2009.

COSTA, J. G. C.; MELO, L. C.; PEREIRA, H. S.; DEL PELOSO, M. J.; FARIA, L. C.; CABRERA DIAZ, J. L.; WENDLAND, A.; RAVA, C. A.; CARVALHO, H. W. L.; COSTA, A. F.; ALMEIDA, V. M.; MELO, C. L. P.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; FARIA, J. C.; SOUZA, J. F.; MARANGON, M. A.; CARGNIN, A.; ABREU, Â. F. B.; MOREIRA, J. A. A.; PEREIRA FILHO, I. A.; GUIMARÃES, C. M.; BASSINELLO, P. Z.; BRONDANI, R. P. V.; MAGALDI, M. C. S. BRS Esplendor: cultivar de feijoeiro comum de grão tipo comercial preto, com arquitetura de planta ereta, alto potencial produtivo e tolerância a doenças. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Goiás, 2009. 4 p. (Embrapa Goiás. Comunicado Técnico, 185).

COVELLO, V.; MERKHOFFER, M. Risk assessment methods: approaches for assessing health and environmental risks. New York: Plenum Press, 1993

CUNHA FILHO, M. *et al.* Beta-lapachona: desenvolvimento e validação de metodologia analítica para nova alternativa terapêutica antineoplásica. **Revista Farmácia Brasileira**. v. 86, n. 1, p. 39-43, 2005.

DARKO, G., AKOTO, O. Dietary intake of organophosphorus pesticide residues through vegetables from Kumasi, Ghana. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 12, p. 3703-3706, 2008.

DE OLIVEIRA SILVA, L., MACHADO, L. G., NETO, C. F., FORTUNATO, E. P. D., DE OLIVEIRA BARBOSA, S. Agrotóxicos: a importância do manejo adequado para a manutenção da saúde. **Nature and conservation**, v. 12 n. 1, p. 10-20, 2019.

DE OLIVEIRA, T. G., FAVARETO, A. P. A., ANTUNES, P. A. Agrotóxicos: levantamento dos mais utilizados no oeste Paulista e seus efeitos como desreguladores endócrinos. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n. 11, 2013.

DE SOUZA FERREIRA, S. V. C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

DOTTO G. L., VIEIRA M. L. G., GONÇALVES J. O., PINTO L. Remoção dos corantes azul brilhante, amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina de soluções aquosas utilizando carvão ativado, terra ativada, terra diatomácea, quitina e quitosana: estudos de equilíbrio e termodinâmica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1193-1199, 2011.

EKMAN, J. *et al.* Transfer of *Bacillus cereus* spores from the packaging paper into food. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 2236-2242, 2009.

ELIAS, R. Feijoada: breve história de uma instituição comestível, revista Textos do Brasil, edição 13, 2007

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO Santo Antônio de Goiás, GO 2013, <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/961699/1/seriesdocumentos287> acesso dia 20/04/2023

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Centro Nacional de Pesquisa Arroz e Feijão. Catálogo de cultivares de feijão comum. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA, 2013. 24p

EMBRAPA, Importância da rotação de culturas para a produção agrícola sustentável no Paraná.,FRANCHINI, J. C., COSTA, J. M. da DEBIASI, H.2022

EMATER – DF. Programa de Olericultura. Disponível em: <https://emater.df.gov.br/programa-de-olericultura/>. Acessado em: 23 mai. 2022.

ERIM, F. B. Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 52, p. 239–247, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.05.018>

EUROPEAN COMMISSION. EU pesticides database. 2020. Disponível em: [https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database\\_en](https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en). Acesso em: 20/05/2022.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). **Pest and Pesticide Management**: - about. 2005. Disponível em: <<https://www.fao.org/pest-and-pesticide-management/about/understanding-the-context/en/>>. Acesso em: 10 jun. 2022.

FAO (2021). Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, site embrapa: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias//noticia/62619259/brasil-e-o-quarto-maior-produtor-de-graos-e-o-maior-exportador-de-carne-bovina-do-mundo-diz-estudo>, acesso dia 10/04/2023.

FAOSTAT 2016. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acessado em: 10 jun. 2022.

FERNANDEZ, M.; RODRIGUEZ, R.; PICO, Y.; MANES, J. Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of post harvest fungicides in citrus fruits. **J. Chromatogr. A**, v. 912, p. 301-310, 2001.

FERRER, C. *et al.* Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7634-7639, 2011.

FIGUEIREDO, E.B.; MALHEIROS, E.B.; BRAZ, L.T. Interação genótipo x ambiente em cultivares de alface na região de Jaboticabal. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, p. 66-71, 2004.

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.

FILGUEIRA, F.A.R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa-MG, 2ª ed., **UFV**, 2003

FILGUEIRA, F.A.R. Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa, **UFV**, 3ª ed. rev. e ampl., 402p., 2008.

GARCIA, E. G., BUSSACOS, M. A., FISCHER, F. M. Harmonização e classificação toxicológica de agrotóxicos em 1992 no Brasil e a necessidade de prever os impactos da futura implantação do GHS. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 2279-2287, 2008.

GERAGE, J. M.; MEIRA, A. P. G.; SILVA, M. V. Food and nutrition security: pesticide residues in food. **Nutrire**, v. 42, p. 01-09, 2017.

GONÇALVES MC, DINIZ MF, BORBA JD, NUNES XP, BARBOSA-FILHO JM. Berinjela (*Solanum melongena L.*) – mito ou realidade no combate as dislipidemias? **Rev Bras Farmacogn.** V. 16, n. 2, p. 252-7, 2006.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á.; SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; HERRERA-HERRERA, A. V.; GONZÁLEZ-SALAMO, J.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZDELGADO, M. A. Evolution and applications of the QuEChERS method. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 169–185, 2015

GROSS, J. H. Mass spectrometry: a textbook. 2nd ed. **Springr Science & Business Media**, 2011.

GÜDÜCÜ, H. E., İNAM, R., & ABOUL-ENEIN, H. Y. Determination of organophosphorus and triazole pesticides by gas chromatography and application to vegetable and commercial samples. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 34, n. 19, p. 2473-2483, 2011.

HAGE, D. S. Chromatography. In: Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry. Elsevier, 3. ed. p. 1–32, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816063-3.00001-3>

HANLON SHANE M; RELYEA RICK, Sublethal Effects of Pesticides on Predator–Prey Interactions in Amphibians, 2013

HAJSLOVÁ J, ZROSTLÍKOVÁ J. Matrix effects in (ultra) trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **J Chromatogr A**, v. 1000 n.1-2, p. 181-97, 2003

HAJSLOVÁ, J.; HOLADOVÁ, K.; KOCOUREK, V.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; CUHRA, P.; KEMPNÝ, M. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **J. Chromatogr. A**, v. 800, p. 283-295, 1998.

HE, Z., PENG, Y., WANG, L., LUO, M., LIU, X. Unequivocal enantiomeric identification and analysis of 10 chiral pesticides in fruit and vegetables by QuEChERS method combined with liquid chromatography-quadruple/linear ion trap mass spectrometry determination. **Chirality**, v. 27, n. 12, p. 958-964, 2015.

HENNION MC. Graphitized carbons for solid-phase extraction. **J. Chromatogr. A**, v. 885, n. 1-2, p. 73-95, 2000;

HERRERA, J. C.; LAMBOT, C. The coffee tree-Genetic diversity and origin. In: FOLMER, B. (org.). **The Craft and Science of Coffee**, 1ª edição, Academic Press, 2016.

HO, C. S. *et al.* Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 24, no. 1, p. 3-12, Feb 2003

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. “Mass spectrometry. Principles and applications.” **Ed. John Wiley**. England. 2007.

HORTI&FRUTI. Santa Cruz do Sul: Gazeta, 2021. Anual. Disponível em: <[https://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wpcontent/uploads/2021/04/HORTIFRUTI\\_2021.pdf](https://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wpcontent/uploads/2021/04/HORTIFRUTI_2021.pdf)>. Acesso em: 10 ago. 2022.

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Boletins Anuais de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil**. 2020. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acessado em 12 ago. 2022.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário, 2017**. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-agropecuario.html?=&t=resultados> > Acesso em: 04 nov. 2021.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA. Coordenação de Trabalho e Rendimento. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil (POF). Rio de Janeiro: IBGE, 2011. 150 p

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Agrotóxicos**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxico>. Acesso em 01 ago. 2022.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. Norma nº DOQ-CGCRE-008: **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. rev. 09. Rio de Janeiro. Jun. 2020

INTERNATIONAL code of conduct on the distribution and use of pesticides: guidelines for quality control of pesticides. WHO; FAO. 2011

ISLAM, M.S.I; PRODHAN, M.D.H.; UDDIN, M.K. Determination of major organophosphorus pesticide residues in eggplant using QuEChERS extraction and gas chromatography. **Int. J. Innov. Sci. Res. Technol**, v. 4, p. 212-219, 2019.

ISLAM, S., HOSSAIN, M. S., NAHAR, N., MOSIHUZZAMAN, M., MAMUN, M. I. R. Application of high performance liquid chromatography to the analysis of pesticide residues in eggplants. **Journal of Applied Sciences**, v. 9, n. 5, p. 973-977, 2009.

JARDIM, F.H.C. Análise dos riscos ambientais em postos de vendas de combustíveis. Artigo apresentado ao Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão de Presidente Prudente-SP. São Paulo, 2012.

JORGE, P.A.R.; NEYRA, L.C.; OSAKI, R.M.; ALMEIDA, E.; BRAGAGNOLO, N. Efeito da berinjela sobre os lípides plasmáticos, a peroxidação lipídica e a reversão da disfunção endotelial na hipercolesterolemia experimental. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 70, n. 2, p. 87-91, 1998.

KIM, Ki-hyun; KABIR, Ehsanul; JAHAN, Shamin Ara. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science Of The Total Environment*, [s.l.], v. 575, p. 525-535, jan. 2017.

KO, A.Y.; RAHMAN, M.; EL-ATY, A.M.; JANG, J.; PARK, J.H.; CHO, K.; SHIM, J.H. Development of a simple extraction and oxidation procedure for the residue analysis

of imidacloprid and its metabolites in lettuce using gas chromatography. **Food Chemistry**, v.148, p.402-409, 2014.

KOESUKWIWAT U, LEHOTAY SJ, MASTOVSKA K, DORWEILER KJ, LEEPIPATPIBOON N. Extension of the QuEChERS Method for Pesticide Residues in Cereals to Flaxseeds, Peanuts, and Doughs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, p. 5950-8, 2010.

KRYSCZUN, D.K. et al. 2018. Sample size, plot size and number of replications for trials with *Solanum melongena* L. **Scientia Horticulturae**, v. 233, p. 220-224.

KWON, Y.-I.; APOSTOLIDIS, E.; SHETTY, K. In vitro studies of eggplant (*Solanum melongena*) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 2981-2988, 2008.

LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I.; MENEZES, E. W. Qualidade nutricional. In: ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. de O. Cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba: POTAFOS, 1996.

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**, p. 1663-1683, Grécia, 2007.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LEHOTAY SJ, HIEMSTRA M, BODEGRAVEN P, KOK A. Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**; v. 88, n. 595, 2005.

LEHOTAY, S.J. Determination os Pesticide Residues in Food by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborativ Study. **Journal of AOAC International**, v. 90, n. 2, p. 485-520, 2007.

LI, M.; LIU, X.; DONG, F.; XU, J.; KONG, Z.; LI, Y.; ZHENG, Y. Simultaneous determination of cyflumetofen and its main metabolite residues in samples of plant and animal origin using multi-walled carbon nanotubes in dispersive solid-phase extraction and ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**. v. 1300, p. 95–103, 2013.

LIAO, Q.G.; ZHOU, Y.M.; LUO, L.G.; WANG, L.B.; FENG, X, H. Determination of twelve herbicides in tobacco by a combination of solid-liquid-solid dispersive extraction using multi-walled carbon nanotubes, dispersive liquid-liquid micro-extraction, and detection by GC with triple quadrupole mass spectrometry. **Microchimica Acta**. v. 181, n. 1–2, p. 163–169, 2014.

LIMA, M. E.; CARVALHO, D. F.; SOUZA, A. P. S.; ROCHA, H. S.; GUERRA, J. G. M. Desempenho do cultivo da berinjela em plantio direto submetida a diferentes lâminas

de irrigação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.16, n.6, p.604–610, 2012.

LIU, Y., ZHAO, Y., LI, S., & LIU, D. Multi-residue analysis, dissipation behavior, and final residues of four insecticides in supervised eggplant field. **Food Additives & Contaminants: Part A**, p. 1-14, 2022.

LOOSE, R. **Desenvolvimento de método para determinação multirresíduo de agrotóxicos em ovos empregando método QuEChERS e UHPLC-MS/MS**. 2020. dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2020.

LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. Doenças do pimentão: diagnose e controle. Brasília: **Editora Embrapa**, 2003.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, O. et al. Surveillance of fungicidal dithiocarbamate residues in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, v. 134, n. 1, p. 366–374, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.178>

MACHADO, I. et al. Determination of pesticide residues in globe artichoke leaves and fruits by GC–MS and LC–MS/MS using the same QuEChERS procedure. **Food Chemistry**, v. 227, p. 227-236, 2017

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

MALVIYA, R.; BANSAL, V.; PAL, O. P.; SHARMA, P. K. (2010). “High performance liquid chromatography: a short review”. **Journal of Global Pharma Technology**. 2: 2226, 2010

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 2010. Manual de Coleta de Amostras do PNCR/Mapa. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 23 p. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacionalde-controle-de-residuos-econtaminantes/documentos-da-pncrc/Manual\\_COLETA\\_01\\_12.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacionalde-controle-de-residuos-econtaminantes/documentos-da-pncrc/Manual_COLETA_01_12.pdf).

MARQUELLI, W.A., BRAGA, M.B., SILVA, H.R., RIBEIRO, C.S.C. Irrigação na cultura da berinjela, **circular técnica EMBRAPA** 135, ISSN 1415-3033, Brasília, DF Outubro, 2014

MARQUES, D.J.; BROETTO, F.; SILVA, E.C. Efeito do estresse mineral induzido por fontes e doses de potássio na produção de raízes em plantas de berinjela (*Solanum Melongena L.*). **Revista Caatinga**, v. 23, p.7-12, 2010.

MARTIN-ESTEBAN, A.; HERNANDO, P.F. Preparación de la muestra para la determinación de analitos orgánicos. **Toma y Tratamiento de Muestra**, 2004.

MASIÁ, A. *et al.* Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 936, p. 40-61, 2016

MAŠTOVSKÁ K, LEHOTAY SJ. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography**. A 2004; 259:1040.

MERCK, 2022. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/applications/analytical-chemistry/sample-preparation/solid-phase-extraction>. Acesso em: 28 jul. 2022.

MIELE, A. *et al.* Physicochemical composition, minerals, and pesticide residues in organic grape juices. *Food Science and Technology*, v. 35, p. 120-126. Campinas, 2015

MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; PERES, F. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n.2, p.299-311, 2002.

MOREIRA, J.C. *et al.* Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola em Nova Friburgo-RJ, **Ciência e Saúde Coletiva**, 7, 1-22, 2002.

MOTILVA, M.; SERRA, A.; MACIÀ, A. Analysis of food polyphenols by ultra highperformance liquid chromatography coupled to mass spectrometry : An overview. *Journal of Chromatography A*, v. 1292, p. 66–82, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.012>

MÜHLEN, C.V.; LANÇAS, F.M. Cromatografia unificada. **Química Nova** [online], v. 27, n. 5, p. 747-753, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500014>>. Acessado em: 20 jul 2022.

NASCIMENTO, R. F. DO *et al.* Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos. Fortaleza: **Imprensa Universitária**, 2018

NUNES, G. S.; RIBEIRO, M. L. Pesticidas: Uso, Legislação e Controle. **Pesticidas: Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.9, p.31-44, 1999.

OBANA, H., OKIHASHI, M., AKUTSU, K., KITAGAWA, Y., HORI, S. Determination of neonicotinoid pesticide residues in vegetables and fruits with solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2501-2505, 2003.

OBANA, H., OKIHASHI, M., AKUTSU, K., KITAGAWA, Y., HORI, S. Determination of acetamiprid, imidacloprid, and nitenpyram residues in vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 16, p. 4464-4467, 2002.



OPAS. Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. Brasília, 1997.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F.; Evaluation of dispersive and cartridge SPE clean-up procedures using the modified QuEChERS method for the analysis of pesticides in strawberries; **Anal. Methods**, v. 7, p. 982, 2015.

PARVIN, R. A. W. S. H. O. N. A., AL-SUBEIHI, A. A. A., MAHMUD, M. C., CHOWDHURY, M. T. I., PRODHAN, M. D. H., ISLAM, M. A. Determination of pesticide residues and health risk assessment in cucumber and eggplant sold in northern part of Bangladesh. **Poll Res**, v. 40, p. 1180-1187, 2021.

PELOSO, M. J. D.; MELO, L. C. **Potencial de rendimento da cultura do feijoeiro comum** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. 131 p.

PEREIRA et al., 2009; BARBOSA & GONZAGA, 2012, **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014**. Unidade: Embrapa Arroz e Feijão, 2012.

PEREIRA, L. L. S.; SANTOS, C. D.; CORRÊA, A. D.; SOUSA, R. V. Estudo comparativo entre inibidor de  $\alpha$ -amilase (faseolamina) comercial e farinha de feijões branco, preto e carioca. *Infarma*, Araraquara, v. 21, n. 11/12, 2009.

PERESTRELO, R.; SILVA, P.; PORTO-FIGUEIRA, P.; PEREIRA, J.A.M.; SILVA, C.; MEDINA, S.; CAMARA, J.S. QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. **Analytica Chimica Acta**. v. 1070, p. 1-28, 2019.

PERES, F.; MOREIRA, J.C.; DUBOIS, G.S.; Agrotóxicos, Saúde E Ambiente: Uma Introdução Ao Tema; 2003; Disponível em: [http://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/cap\\_01\\_veneno\\_ou\\_remedio.pdf](http://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/cap_01_veneno_ou_remedio.pdf); Acessado em 22 de setembro de 2016.

PICÓ, Y.; FARRÉ, M.; SOLER, C.; BARCELÓ, D. Identification of unknown pesticides in fruits using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry imazalil as a case study of quantification. **Journal of Chromatography A**, v. 1176, p. 123-134, 2007.

PINHO, G. P. *et al.* Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 987–995, 2009.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, p.179-187, 2006.

PIRES VINICIUS MARCOS, Desenvolvimento e emprego de um banco de dados para a condução de estudos de avaliação do risco da exposição crônica a resíduos de agrotóxicos na dieta, 2013

POSPISCHIL, R. Imidacloprid fly bait: a fast acting formulation against flies in livestock. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON URBAN PESTS, 4., 2002, Charleston. Proceedings.. Charleston: Pocahontas Press. 2002. p. 457-458.

PRADO-LU, D.; LEILANIE, J. Insecticide residues in soil, water, and eggplant fruits and farmers' health effects due to exposure to pesticides. **Environmental health and preventive medicine**, v. 20, n. 1, p. 53-62, 2015.

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.

PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidade e tendências no preparo de amostras para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**. v. 3, n. 1, p. 51-64. Brasil, 2011.

PRODHAN, M D.H.; PAPADAKIS, E.N.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Determination of multiple pesticide residues in eggplant with liquid chromatography-mass spectrometry. **Food analytical methods**, v. 8, n. 1, p. 229-235, 2015.

PRODHAN, M. D. H., PAPADAKIS, E. N., PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Variability of pesticide residues in eggplant units collected from a field trial and marketplaces in Greece. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 6, p. 2277-2284, 2018.

QI P., WANG, J., LIU, Z., WANG, Z., XU, H., DI, S, WANG, X. Integrated QuEChERS strategy for high-throughput multi-pesticide residues analysis of vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1659, p. 462589, 2021.

QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; ROSA, M. A. Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando QuEChERS e UPLC-MS/MS. **Química Nova**, v.35, p. 185-192, 2012

RAHMAN, M., HOQUE, M. S., BHOWMIK, S., FERDOUSI, S., KABIRAZ, M. P., VAN BRAKEL, M. L. Monitoring of pesticide residues from fish feed, fish and vegetables in Bangladesh by GC-MS using the QuEChERS method. **Heliyon**, v. 7, n. 3, p. e06390, 2021.

RAMA, E.M.; BORTOLAN, s.; VIEIRA, M.L.; GERARDIN, D.C.C.; MOREIRA, E.G.; Reproductive and possible hormonal effects of carbendazim Regulatory. **Toxicology and Pharmacology**, v. 69, n 3, p. 476-486, 2014.

RAMÍREZ-CÁRDENAS, L.; LEONEL, A. J.; COSTA, N. M. B. Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 200-213, 2008

REIS, A.; BOITEUX, L.S. Murcha-de-Verticillium: um sério problema para o cultivo de hortaliças no Brasil. Brasília: **Embrapa Hortaliças**, 2006. 11p. (Circular Técnica, 40).

REYNOLDS, S.L. Sample handling and clean-up procedures I. in: FERNANDEZ-ALBA, A. Chromatographic-mass spectrometric food analysis for the trace determination of pesticides residues. In. *Comprehensive analytical chemistry*. **The Netherlands: Elsevier**. 2005, 287 p.

RIBANI, M.; BETTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P. D.; SMITH, R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of 116 Chromatography A*, v. 1153, p. 36–53, 2007

RIOS, A. O.; ABREU, C. M. P.; CORRÊA, A. D. Efeito da estocagem e das condições de colheita sobre algumas propriedades físicas, químicas e nutricionais de três cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23 (Supl), p. 39-45, 2003.

ROCCA, L. M. *et al.* Veterinary drugs residues: a review of the latest analytical research on sample preparation and LCMS based methods. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 34, p. 766-784, 2017.

ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A.G.; VIDAL, J.L.M. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, v. 76, p. 211-225. Espanha, 2008.

ROSTAMI, S. *et al.* Current methods and technologies for degradation of atrazine in contaminated soil and water: A review. *Environmental Technology & Innovation*, v. 24, p. 102019, 2021.

SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S.J. Review of recent developments and applications in low-pressure (vacuum outlet) gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, v. 758, p. 80-92. Estados Unidos, 2013.

SANTÉ, EUROPEAN COMMISSION. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. **Document nº SANTE/12682/2019**.

SANTÉ, EUROPEAN COMMISSION. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. **Document nº SANTE/12682/2022**.

SANTOS, C.A., RIBEIRO, C.R., CARMO, M.G.F. Berinjela desperta atenção do mercado. 2021. Disponível em: <https://revistacampoenegocios.com.br/berinjela-desperta-atencao-do-mercado/>. Acessado em: 18 fev. 2022.

SANTOS, H. V.; FONSECA, J. M.; FREITAS, R. F.; ROYO, V. de A. Caracterização laboratorial das dislipidemias e o uso de fitoterápicos. **Revista Multitexto**, v. 3, n. 1, p. 21-28, 2015.

SILVA, C.M.M.S.; MELO, I.S. Biodegradação de fungicidas benzimidazóis. **Microbiologia Ambiental**, cap. 6, p. 142. [s.d.]. Disponível em: <[https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Melo\\_BiodegradacaoFungicidasBenzimidazois\\_000fdqbaqe302wx5eo0a2ndxyjebw1mn.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Melo_BiodegradacaoFungicidasBenzimidazois_000fdqbaqe302wx5eo0a2ndxyjebw1mn.pdf)> Acesso em: 16 jun. 2022.

SILVA, Renato C.; BARROS, Karina A.; PAVÃO, Antonio C. Carcinogenicidade do carbendazim e seus metabólitos. *Química Nova*, v. 37, n. 8, p. 1329-1334, 2014.

SILVA, W. B. da. Os riscos no uso indiscriminado de agrotóxicos: uma contaminação invisível. **INTESA** – Informativo Técnico do Semiárido, v. 11, p. 11-19, 2017

SILVA-BARRETO, F.A. *et al.* Associação de *Rhizoctonia solani* Grupo de Anastomose 4 (AG-4 HGI e HGIII) à espécies de plantas invasoras de área de cultivo de batata. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.36, n.2, p.145-154, 2010.

SIMÕES C.M.O., organizadora. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Florianópolis: **UFRGS**; 2007. 1104 p

SINHA, S. N., RAO, M. V. V., VASUDEV, K. Distribution of pesticides in different commonly used vegetables from Hyderabad, India. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 161-169, 2012.

SINHA, S. N., VASUDEV, K., RAO, M. V. V. Quantification of organophosphate insecticides and herbicides in vegetable samples using the “Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe” (QuEChERS) method and a high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry (LC–MS/MS) technique. **Food chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1574-1584, 2012.

SKOOG, D. A. et al. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

SKOOG, D. A. et al. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 9. ed. USA: Cengage Learning, 2014.

STACHNIUK, A.; FORNAL, E. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food. **Food Analytical Methods**. v. 9, p. 1654–1665, 2016.

STHAN, H. J. Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection: State-of-the-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evaluation. **Journal of Chromatography A**, v.892, p.347 – 377, 2000.

TBCA - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Universidade de São Paulo (USP). **Food Research Center (FoRC)**. Versão 7.1. São Paulo, 2020. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tbca>. Acessado em: 15 mai. 2022.

TAVEIRA, B. L. S., ALBUQUERQUE, G. S. C. D. Análise das notificações de intoxicações agudas, por agrotóxicos, em 38 municípios do estado do Paraná. **Saúde em Debate**, v. 42, p. 211-222, 2018.

TEIXEIRA, L.N.; STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, F.C. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, Viçosa, ano 55, n.4, p.297-304, agosto, 2008.

TETTE, P. A. S. *et al.* Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. **Talanta**. v. 149, p. 124-141, 2016.

THANKI, N., JOSHI, P., JOSHI, H. Effect of household processing on reduction of pesticide residues in Bringal (Eggplant, *Solanum melongena*). **Advances in Applied Science Research**, v. 3, n. 5, p. 2860-2865, 2012.

USDA. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm collection. United States Department of Agriculture: Agricultural Research Service, 2012. Disponível em: [www.ars.usda.gov/Main/site\\_main.htm?docid=9065](http://www.ars.usda.gov/Main/site_main.htm?docid=9065)

UCZAY FERNANDA, Dissertação Determinação de resíduos de avermectina em soja, feijão e milho empregando método QuEChERS modificado e UHPLC MSMS, Santa Maria 2019

VALVERDE-GARCIA, A.; GONZALEZ-PRADAS, E.; AGUILERA-DEL REAL, A. Analysis of buprofezin residues in vegetables. Application to the degradation study on eggplant grown in a greenhouse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 2319-2323, 1993.

VIDAL, J. M., ARREBOLA, F. J., MATEU-SÁNCHEZ, M. Application of gas chromatography–tandem mass spectrometry to the analysis of pesticides in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 959, n.1-2, p. 203-213, 2002.

VIERA, M. S. *et al.* Multiresidue determination of pesticides in crop plants by the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method and ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry using a calibration based on a single level standard addition in the sample. *Journal of Chromatography A*, v. 1526, p. 119-127, 2017

YASHIN, Y. I.; YASHIN, A. Y. Liquid Chromatography. *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*, n. iii, p. 285–310, 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384862-8.00010-8>

YADAV, I. C.; DEVI, N. L. Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment; In: KUMAR, A. *et al.* *Environmental science and engineering*, v. 6: Toxicology, Chapter: 7, Publisher: Studium Press LLC, USA, pp.140-158.

WANDER, A. E.SILVA *et al.* O feijão-comum no Brasil: passado, presente e futuro, 2013.

WANG, X.; WANG, S.; CAI, Z. The latest developments and applications of mass spectrometry in food-safety and quality analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 170-185, 2013

WATANABE, E., KOBARA, Y., BABA, K., EUN, H. Determination of seven neonicotinoid insecticides in cucumber and eggplant by water-based extraction and high-performance liquid chromatography. **Analytical Letters**, v. 48, n. 2, p. 213-220, 2015.

WATERS CORPORATIONS. Solid-Phase Extraction with Oasis® HLB Sorbent: Simple Procedures for Superior Sample Preparation. [s.d.]. Disponível em: [https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/my\\_oas98.pdf](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/my_oas98.pdf). Acesso em: 18 jul. 2022.

WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 803-812, 2011.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. Protein and amino acid requirements in human nutrition. Geneva: WHO, 2007. (WHO Technical Report Series, 935).

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.

ZHOU, Q., LIU, Z., LIU, F., GUO, Y., LI, X. Determination of desmedipham residue in 21 foods by HPLC-MS/MS combined with a modified QuEChERS and mixed-mode SPE clean-up method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 102, p. 104004, 2021.