

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

**Larissa da Silva Alves**

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAFÉ  
VERDE EMPREGANDO QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

**Santa Maria – RS, Brasil**

**2020**

**Larissa da Silva Alves**

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAFÉ VERDE  
EMPREGANDO QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

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

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, RS

2020

Alves, Larissa  
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAFÉ VERDE  
EMPREGANDO QuEChERS E UHPLC-MS/MS / Larissa Alves.- 2020.  
84 p.; 30 cm

Orientador: Renato Zanella  
Coorientadora: Martha B. Adaime  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Química, RS, 2020

1. QuEChERS 2. café verde 3. UHPLC-MS/MS 4.  
agrotóxicos I. Zanella, Renato II. B. Adaime, Martha  
III. Título.

Larissa da Silva Alves

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAFÉ VERDE  
EMPREGANDO QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

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

Aprovada em 02 de março de 2020



---

**Prof. Dr. Renato Zanella (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



---

**Dra. Aline Lima Hermés Müller**



---

**Prof. Dr. Osmar Damian Prestes (UFSM)**

Santa Maria, RS

2020

Dedico este trabalho à Deus e à minha família.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Renato Zanella, pela orientação na elaboração deste trabalho, assim como ao Prof. Osmar Prestes e a Prof<sup>a</sup>. Martha Adaime pela oportunidade de ingressar no LARP.

Aos meus pais por sempre priorizarem a minha educação e o constante apoio.

Aos meus amigos Állisson e Paulo pela amizade. Aos colegas do LARP agradeço à Herliana e Adriane pelo auxílio na parte experimental, Lucila e Pimperelli pelas conversas sobre o trabalho e Gabriel e Rômulo pela ajuda em questões técnicas no laboratório durante a execução da parte experimental.

À banca de defesa de dissertação, Dr<sup>a</sup> Aline Lima Hermes Müller e Prof. Dr. Osmar Damian Prestes pela disponibilidade de avaliar este trabalho e pelas contribuições.

À CAPES pela bolsa e auxílio financeiro e a UFSM pelo ensino de qualidade durante o mestrado.

## RESUMO

### DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAFÉ VERDE EMPREGANDO QuEChERS E UHPLC-MS/MS

Autora: Larissa da Silva Alves  
Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo e, devido à diversidade de clima, relevos, altitudes e latitudes, o Brasil produz grãos de café de boa qualidade. Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador de café e o segundo maior consumidor. Durante o processo de produção, diferentes tipos de agrotóxicos são usados em várias etapas para prevenir ou eliminar pragas que podem prejudicar a produtividade. No entanto, devido aos efeitos colaterais causados por esses agrotóxicos, é necessário um controle da quantidade de resíduos de agrotóxicos presentes nos grãos de café verde para garantir a exportação e a saúde do consumidor. Neste trabalho foi desenvolvido um método de preparo de amostra no qual foram avaliados o método QuEChERS (versões citrato, acetato e original) para a extração dos compostos e as técnicas d-SPE e LLE para a limpeza do extrato. Foram avaliados os sorventes C18, PSA, GCB, Z-Sep<sup>+</sup> e MgSO<sub>4</sub> na técnica d-SPE e os solventes diclorometano e hexano na LLE. O método multirresíduo desenvolvido determinou resíduos de 31 agrotóxicos em grãos de café verde, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS). O preparo de amostra foi realizado com 5 g de amostra, adição de 5 mL de água ultrapura, extração com 10 mL de acetonitrila, partição com sais (4 g de MgSO<sub>4</sub> e 1 g NaCl) e limpeza com C18, PSA, GCB e MgSO<sub>4</sub>. O método foi validado avaliando-se parâmetros como linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e efeito matriz. A determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de café verde se mostrou simples, rápida e eficaz. Os resultados da validação foram avaliados a partir de ensaios de recuperação em três níveis de fortificação, com recuperações entre 70-120%, RSD ≤ 20%, linearidade entre 0,5 a 20 µg L<sup>-1</sup>, coeficiente de determinação  $r^2 > 0,99$ , LOD de 0,003 a 0,015 mg kg<sup>-1</sup> e LOQ de 0,01 a 0,05 mg kg<sup>-1</sup>. O método proposto foi aplicado em amostras de grãos de café verde produzidas no Brasil e resíduos de carbofurano foram encontrados em 71% das amostras analisadas. A robustez e eficiência do método proposto permitem que o mesmo seja aplicado em análises de rotina.

**Palavras-chave:** QuEChERS, café verde, agrotóxicos, UHPLC-MS/MS.

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN GREEN COFFEE EMPLOYING QuEChERS AND UHPLC-MS/MS

Author: Larissa da Silva Alves

Advisor: Prof. Dr. Renato Zanella

Coffee is one of the most consumed beverages in the world and due to climatic diversity, reliefs, altitudes and latitudes Brazil is able to produce good quality coffee beans. Brazil is currently the largest producer and exporter of coffee and the second largest consumer. During the production process, different types of pesticides are used in several stages to prevent or eliminate pests that may impair productivity. However, due to the side effects caused by these pesticides, there should be a control of the amount of pesticide residues present in green coffee beans to ensure consumer health and export of coffee beans. In this work, a sample preparation method was developed evaluating QuEChERS method (citrate, acetate and original versions) for extraction of compounds and the d-SPE and LLE techniques for clean-up of the extract. The sorbents C18, PSA, GCB, Z-Sep<sup>+</sup> and MgSO<sub>4</sub> were evaluated using the d-SPE technique and the solvents dichloromethane and hexane in the LLE. The multiresidue method developed determined residues of 31 pesticides in green coffee beans, using high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Sample preparation was performed with 5 g of sample, addition of 5 mL of ultrapure water, extraction with 10 mL of acetonitrile, partition with salts (4 g of MgSO<sub>4</sub> and 1 g NaCl) and clean-up with C18, PSA, GCB and MgSO<sub>4</sub>. The method was validated evaluating the parameters linearity, accuracy, precision, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and matrix effect. The determination of pesticide residues on green coffee samples presented to be simple, fast and effective. The validation results, evaluated by recovery assays at 3 spiked levels, were satisfactory, with recoveries from 70 to 120%, RSD ≤ 20%, linearity from 0.5 to 20 µg L<sup>-1</sup>, determination coefficient  $r^2 > 0.99$ , LOD from 0.003 to 0.015 mg kg<sup>-1</sup> and LOQ from 0.01 to 0.05 mg kg<sup>-1</sup>. The proposed method was applied to green coffee bean samples produced in Brazil and carbofuran residues were found in 71% of the analyzed samples. The robustness and efficiency of the proposed method allows it to be applied in routine analyzes.

**Keywords:** QuEChERS, green coffee, pesticides, UHPLC-MS/MS



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Etapas de transformação do café, da flor à bebida final.....	20
<b>Figura 2</b> – Cromatograma de íon total obtido a partir dos íons selecionados no modo por UHPLC-MS/MS a partir de soluções preparadas no extrato da matriz café verde na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ .....	53
<b>Figura 3</b> - Testes gravimétricos dos QuEChERS original, QuEChERS acetato e QuEChERS citrato .....	58
<b>Figura 4</b> – Número de compostos que apresentaram recuperações entre 70 e 120%, com valores de $\text{RSD} \leq 20\%$ , nos testes de limpeza na matriz café verde por UHPLC-MS/MS. ....	59
<b>Figura 5</b> – Gráfico de recuperação versus RSD obtidos nos testes de limpeza de extrato T4 e T5 para os 31 compostos avaliados inicialmente .....	60
<b>Figura 6</b> - Gráfico da massa (mg) de coextrativos em relação aos testes T4 e T5	61
<b>Figura 7</b> – Gráfico dos testes T6a e T7a empregando a técnica LLE para a remoção de cafeína.....	63
<b>Figura 8</b> – Gráfico da massa (mg) de coextrativos em relação aos testes T6a e T7a .....	64
<b>Figura 9</b> – Procedimento do método de extração validado.....	65
<b>Figura 10</b> – Cromatograma de íon total obtido por UHPLC-MS/MS do composto acetamiprido, obtidos para o branco dos reagentes (em preto), “branco” da amostra café verde (em roxo) e solução analítica no extrato da matriz café verde (em vermelho), contendo os analitos na concentração de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ .....	66
<b>Figura 11</b> – Cromatograma de íon total obtido por UHPLC-MS/MS do composto carbofurano obtidos para o LOQ (em verde), amostra A7 na concentração de $0,016 \text{ mg kg}^{-1}$ (em vermelho) e amostra A5 na concentração de $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$ (em preto).	73

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Reclassificação toxicológica de agrotóxicos definida pela ANVISA.....	21
<b>Quadro 2</b> – Solventes, sais de partição e sorventes empregados no método QuEChERS e suas etapas. ....	32
<b>Quadro 3</b> – Parâmetros a serem abordados no procedimento de validação de um método analítico .....	39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Composição centesimal do café das espécies arábica e robusta, nos estágios: verde, torrado e bebida instantânea.....	19
<b>Tabela 2</b> – Limites Máximos de Resíduos de agrotóxicos permitidos para o café ...	24
<b>Tabela 3</b> – Revisão bibliográfica de técnicas de preparo de amostra para determinação multirresíduo em café e outras matrizes que possuem compostos semelhantes em sua composição .....	34
<b>Tabela 4</b> – Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido e propriedades físico-químicas. ....	43
<b>Tabela 5</b> – Relação dos testes preliminares realizados para avaliar a etapa de extração .....	47
<b>Tabela 6</b> – Relação dos testes empregando a técnica d-SPE avaliados em relação a extração de coextrativos e ensaios de recuperação dos compostos em amostra de café verde.....	48
<b>Tabela 7</b> – Relação dos testes empregando a técnica LLE avaliados em relação a extração de coextrativos e ensaios de recuperação dos compostos em amostra de café verde.....	49
<b>Tabela 8</b> – Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de agrotóxicos em café verde, empregado ao sistema UHPLC-MS/MS. ....	53
<b>Tabela 9</b> – Agrotóxicos analisados por UHPLC-MS/MS, utilizando o modo de ionização ESI +, no modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ), íons precursores e produtos para a quantificação e confirmação .....	55
<b>Tabela 10</b> – Curvas analíticas no solvente e na matriz “branco” de café verde e coeficientes de determinação e valores de faixa linear. ....	67
<b>Tabela 11</b> – Efeito matriz dos agrotóxicos estudados na matriz café verde determinados por UHPLC-MS/MS. ....	68
<b>Tabela 12</b> – Recuperação e RSD dos agrotóxicos com o emprego do método QuEChERS proposto .....	70
<b>Tabela 13</b> – Valores de LOD e LOQ do método para os analitos validados no estudo .....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIC	Associação Brasileira da Indústria de Café
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química à pressão atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
API	Ionização em pressão atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Ionization</i>
APPI	Ionização por fótons à pressão atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Photon Ionization</i>
$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	Citrato de sódio di-hidratado
$C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1,5H_2O$	Hidrogenocitrato sesqui-hidratado
C8	Octilsilano
C18	Octadecilsilano
CID	Dissociação induzida por colisão, do inglês <i>Collision-Induced Dissociation</i>
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DC	Corrente Contínua, do inglês <i>Direct Current</i>
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva, do inglês <i>dispersive Solid Phase Extraction</i>
ECD	Detector de captura de elétrons, do inglês <i>Electron Capture Detection</i>
EI	Ionização eletrônica, do inglês <i>Electron Ionization</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI	Ionização por eletronebulização, do inglês <i>Electrospray Ionization</i>
EU	União Europeia, do inglês <i>European Union</i>
FAO	Organização da Nações Unidas para Agricultura e Saúde, do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FID	Ionização em chama, do inglês <i>Flame Ionization Detector</i>
FM	Fase Móvel
GC	Cromatografia Gasosa, do inglês <i>Gas Chromatography</i>
GCB	Carvão grafitizado, do inglês <i>Graphitized Carbon Black</i>
GHS	Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, do inglês <i>Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals</i>
HAc	Ácido acético
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ITD	Armadilha de íons, do inglês <i>Ion Trap Detection</i>
LLE	Extração líquido-líquido, do inglês <i>Liquid Liquid Extraction</i>
LMR	Limites Máximos de Resíduos
LOD	Limite de Detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>
LOQ	Limite de Quantificação, do inglês <i>Limit of Quantification</i>

m/z	Razão massa/carga
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio anidro
SRM	Monitoramento de reação selecionada, do inglês <i>Selected Reaction Monitoring</i>
MS/MS	Espectrômetro de massas em série, do inglês <i>tandem mass spectrometry</i>
NaAc	Acetato de sódio anidro
NaCl	Cloreto de sódio
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PC	Padrão de Controle
pH	Potencial hidrogênico
PI	Padrão Interno
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
ppm	Partes por milhão
PSA	Amina Primária Secundária, do inglês <i>Primary Secondary Amine</i>
PTFE	Politetrafluoretileno
Q	Quadrupolo
q ou Q2	Segundo quadrupolo ou cela de colisão
Q1	Primeiro quadrupolo
Q3	Terceiro quadrupolo
QqQ	Triplo quadrupolo
QuEChERS	Rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, do inglês <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
r	Coeficiente de Correlação
r <sup>2</sup>	Coeficiente de Determinação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RF	Radiofrequência
rpm	Rotações por minuto
RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
S/R	Sinal/Ruído
SANTE	Saúde e Proteção do Consumidor, do francês <i>Santé et protection des consommateurs</i>
SIM	Monitoramento do Íon Seletivo, do inglês <i>Selected Ion Monitoring</i>
SRM	Monitoramento Seletivo de Reações, do inglês <i>Selected Reaction Monitoring</i>
t <sub>R</sub>	Tempo de retenção
TCD	Detector de Condutividade Térmica, do inglês <i>Thermal Conductivity Detector</i>
TIC	Cromatograma de íon total, do inglês <i>Total Ion Chromatogram</i>
ToF	Tempo de voo, do inglês <i>Time of Flight</i>
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Performance, do inglês <i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography</i>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
1.1 OBJETIVO.....	16
1.1.1 Objetivos Gerais.....	16
1.1.2 Objetivos Específicos .....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1 CAFÉ.....	17
2.1.1 Plantio, processamento pós-colheita e torrefação do café .....	18
2.1.2 Composição do grão de café verde.....	19
2.2 AGROTÓXICOS.....	20
2.3 RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAFÉ .....	22
2.4 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAFÉ.....	25
2.4.1 Técnicas cromatográficas para determinação multirresíduo de agrotóxicos em café 25	
2.5 TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM CAFÉ .....	30
2.5.1 Método QuEChERS .....	31
2.5.2 Extração líquido-líquido (LLE) .....	33
2.6 VALIDAÇÃO.....	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	40
3.2 REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS UTILIZADOS .....	41
3.3 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO E DO PADRÃO DE CONTROLE.....	42
3.4 AGROTÓXICOS SELECIONADOS .....	42
3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS DOS COMPOSTOS SELECIONADOS .....	45
3.6 PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA.....	45
3.7 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAFÉ VERDE .....	45
3.7.1 Teste gravimétrico.....	49
3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE RESÍDUOS EM CAFÉ VERDE ...	50
3.8.1 Seletividade.....	50

3.8.2 Curva analítica e linearidade .....	50
3.8.3. Efeito matriz .....	50
3.8.4. Exatidão e precisão .....	51
3.8.5. LOQ e LOD do método.....	51
3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO A AMOSTRAS REAIS .....	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	53
4.1 CONDIÇÃO DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM CAFÉ VERDE .....	53
4.1.2 Condições utilizadas no sistema UHPLC-MS/MS .....	53
4.2 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM CAFÉ VERDE .....	57
4.2.1 Escolha do método QuEChERS.....	57
4.2.2 Avaliação da etapa de limpeza.....	59
4.2.3 Método de extração otimizado.....	64
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO .....	66
4.3.1 Seletividade.....	66
4.3.2 Curva analítica e linearidade .....	67
4.3.3 Efeito matriz .....	68
4.3.4 Exatidão (Ensaio de recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária) .....	69
4.3.5 Determinação dos valores de LOD e LOQ do método e do instrumento.....	71
4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO A AMOSTRAS REAIS.....	73
5 CONCLUSÃO.....	75
6 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS.....	76
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	76
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	77

## 1 INTRODUÇÃO

O café (*Coffea*) é um fruto pertencente à família *Rubiaceae* que possui mais de 100 espécies, onde as espécies Arábica (*Coffea arabica*) e Robusta (*Coffea canephora*) apresentam maior demanda comercial (HERRERA; LAMBOT, 2016). A bebida, feita a partir da infusão dos grãos torrados e moídos, é uma das mais consumidas no país (CeCafé, 2019).

Originalmente, o cultivo era restrito às regiões úmidas tropicais da África e às ilhas no Oceano Índico Ocidental. Porém, atualmente seu plantio é encontrado em vários países localizados na região entre os trópicos, como Brasil, Vietnã, Colômbia, México, Etiópia, Nicarágua, entre outros (HERRERA; LAMBOT, 2016).

Considerado um commodity, é produzido e consumido em larga escala. São exportados em grande parte na forma de grãos verdes para diversos países, onde é realizada a torrefação de acordo com as preferências locais e o produto final é vendido com um maior valor agregado.

O Brasil exporta café para diversos países, como Alemanha, Itália, EUA e para países da União Europeia, que possuem controles rígidos acerca da presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

Devido a importância dessa cultura no âmbito mundial é necessário o emprego de agrotóxicos para que se elimine e/ou controle as pragas que possam prejudicar na cadeia de produção desse fruto. Porém, deve-se ter um controle da quantidade e dos tipos de agrotóxicos utilizados, uma vez que na literatura são relatados os efeitos colaterais que os mesmos podem causar à saúde humana.

Para o controle da quantidade de resíduos de agrotóxicos presentes nos grãos de café verde é necessário o emprego de técnicas de preparo de amostra para que analitos sejam isolados/concentrados e os interferentes sejam removidos da matriz permitindo assim a determinação dos analitos.

Diversas técnicas podem ser empregadas no preparo de amostra para a matriz café verde, dentre elas a técnica clássica de extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid Liquid Extraction*), na qual os analitos são extraídos de amostras líquidas ou dos extratos das amostras, com o emprego de solventes apolares e água.

O método QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust and Safe*) em conjunto com a extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) são também utilizados e empregam a extração com acetonitrila (com ajuste de pH se necessário),



partição com sais e limpeza do extrato com uma mistura de sorventes, sendo utilizada para determinação simultânea de diferentes classes de agrotóxicos com uma eficiente remoção de interferentes é a mais empregada para a matriz café verde.

## 1.1 OBJETIVO

### 1.1.1 Objetivos Gerais

Desenvolver e validar um método multirresíduo para determinação de agrotóxicos em grãos de café verde, empregando o método QuEChERS e a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar diferentes versões do método QuEChERS na etapa de preparo de amostra para extração dos agrotóxicos em estudo;
- Avaliar na etapa de limpeza os sorventes carvão grafitizado (GCB, do inglês *Graphitized Carbon Black*), Supel™ QuE Z-Sep+, PSA, C18 e MgSO<sub>4</sub> na técnica de extração em fase sólida dispersiva na etapa de limpeza em relação à remoção de coextrativos do extrato de café verde;
- Avaliar a utilização de diclorometano e o hexano como solventes na técnica de extração líquido-líquido na etapa de limpeza em relação à remoção de cafeína do extrato de café verde;
- Validar o método desenvolvido para a matriz café verde de acordo com os parâmetros estabelecidos pela SANTE (2019) e INMETRO (2018) considerando-se os LMR estabelecidos no Brasil e pela União Europeia;
- Aplicar o método desenvolvido em amostras reais de café verde.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CAFÉ

O cultivo do café no Brasil teve início no século XVIII no estado do Pará, porém somente ao fim deste século, no estado do Rio de Janeiro é que a produção em maior escala teve início. Através do Vale do Paraíba chegou em terras paulistas, onde a cultura se estabeleceu e o estado de São Paulo se tornou o principal produtor. Ao fim do século XIX já era o principal produto de exportação do país, alçando o Brasil a posição de maior produtor mundial (ABIC, 2019).

O ciclo do café (1850-1930) foi um período de profundas transformações políticas, econômicas e sociais para o país, possibilitadas graças a riqueza oriunda do comércio do café (ABIC, 2019). Menos de um século após o fim do ciclo do café, essa cultura não é mais o principal motor da economia do país, entretanto o Brasil continua sendo o principal produtor de café, sendo responsável por cerca de 33% da produção mundial (EMBRAPA, 2019a) e é também o maior exportador desse produto seguido pelo Vietnã e Colômbia, que ocupam o segundo e terceiro lugar, respectivamente (CONAB, 2020). Em 2019 o consumo mundial de café foi de aproximadamente 168 milhões de sacas de 60 kg (EMBRAPA, 2020a), enquanto a produção mundial foi de um pouco mais de 174 milhões de sacas de 60 kg, desse montante 60% corresponde ao café arábica, enquanto 40% ao café robusta (EMBRAPA, 2019b).

A safra brasileira de 2018-2019 produziu 49,31 milhões de sacas de 60 kg beneficiadas (EMBRAPA, 2020b) seguindo a tendência mundial de maior produção da espécie arábica, que correspondeu a 70% da produção nacional, enquanto a variedade Conilon (robusta) compreendeu 30% (Consórcio Pesquisa Café, 2019). Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia, Rondônia, Paraná, Goiás e Mato Grosso são estados produtores de café, sendo o primeiro e o segundo responsáveis pela maior parte da produção do país. Nas lavouras mineiras são produzidos majoritariamente grãos da espécie arábica, enquanto nas capixabas a variedade Conilon domina a produção estadual (CONAB, 2019).

No período de janeiro a novembro de 2019 o Brasil exportou um total de 37,4 milhões de sacas de 60 kg, que compreendiam café verde, torrado, moído e solúvel, para países como Estados Unidos da América, Alemanha, Itália, Japão, Bélgica, entre outros (EMBRAPA, 2019c).

### 2.1.1 Plantio, processamento pós-colheita e torrefação do café

Das lavouras à bebida consumida, o grão de café passa por profundas transformações físicas e químicas. O tipo de espécie cultivada, conjuntamente com as práticas empregadas, o clima e o solo, o processamento pós-colheita e o tipo de torrefação são fatores que influenciam no produto final (LAMBOT, *et al.*, 2016).

As espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* são melhores cultivadas nas regiões entre os trópicos. O *C. arabica* é melhor cultivado em regiões com temperaturas amenas, entre 18 e 21 °C, altitudes elevadas entre 1200 e 1950 m, e com um volume anual de chuva entre 1100 e 2000 mm. Enquanto *C. canephora* prefere ambientes com temperaturas um pouco mais elevadas, entre 22 e 26 °C, baixas a médias altitudes, 250 a 1500 m, e temporadas de estiagem curtas com um volume anual de chuva entre 1200 e 2500 mm (LAMBOT, *et al.*, 2016).

No processamento pós-colheita ocorrem mudanças que afetam a qualidade do grão e deve-se reduzir o teor de umidade a um nível de 10 a 12% para evitar a danificação dos mesmos pela ação de fungos e bactérias. Para isso, os métodos seco e úmido podem ser empregados. No primeiro, os frutos são secos juntamente com a pele e a mucilagem, que serão removidas somente ao fim do processo. No segundo, a pele e a mucilagem são previamente removidas. Os grãos de café obtidos ao fim desses processos obterão características salientadas, como acidez, aroma e doçura (SANZ-URIBE, *et al.*, 2016).

Na etapa de torrefação o grão de café verde adquire coloração escura, estrutura porosa e umidade de 2,5%. Diversas reações ocorrem causando degradação e formação de componentes que impactarão diretamente no sabor e aroma da bebida final. Nessa etapa os grãos de uma mesma espécie ou de espécies diferentes são misturados e são expostos ao ar a temperaturas maiores que 90 °C, num processo que pode durar entre 3 e 20 minutos, com a temperatura final podendo chegar a 200-250 °C. O grau de torra é considerado o critério de qualidade mais importante e a coloração do grão obtida ao final do processo está diretamente relacionada ao sabor (SCHENKER; ROTHGEB, 2016).

## 2.1.2 Composição do grão de café verde

A composição centesimal do café (Tabela 1) varia de acordo com a espécie e também do estágio no qual o mesmo se encontra, pois, os grãos passam por variadas transformações desde o plantio à bebida final, conforme ilustrado na Figura 1.

**Tabela 1** - Composição centesimal do café das espécies arábica e robusta, nos estágios: verde, torrado e bebida instantânea.

Componentes	Arábica verde (%MS)	Robusta verde (%MS)	Arábica torrado (%MS)	Robusta torrado (%MS)	Arábica instantâneo (%MS)	Robusta instantâneo (%MS)
Cafeína	1,3	2,3	1,3	2,4	2,5	3,8
Trigonelina	0,8	0,7	0,3	0,3	0,7	0,4
Carboidratos	53,7	50,7	38	42	46,6	44,7
Ácidos clorogênicos	8,1	9,9	2,5	3,8	2,6	1,6
Lipídios	15,2	9,4	17,0	11,0	0,11	0,26
Aminoácidos	11,1	11,8	7,5	7,5	6,2	6,0
Ácidos Orgânicos	2,3	1,7	2,4	2,6	8,1	7,9
Melanoidinas	-	-	25,4	25,9	25,1	28,6
Aromas voláteis	Traços	Traços	0,1	0,1	-	-
Cinzas (minerais)	3,9	4,4	4,5	4,7	8,0	7,4

MS: Matéria seca.

Fonte: OESTREICH-JANZEN (2013)

**Figura 1** – Etapas de transformação do café, da flor à bebida final.



Fonte: Adaptado de Pinterest.

Na Figura 1 se observa as etapas de amadurecimento do fruto, fermentação, lavagem, secagem, torrefação, moagem dos grãos e a bebida final. A partir da composição centesimal apresentada na Tabela 1, observa-se que a quantidade de ácido clorogênico é alterado pelo processo de torrefação, sendo maior para o café verde. Enquanto a quantidade de cafeína não sofre alterações com a torra, mas seu valor aumenta no preparo do café instantâneo. Para as melanoidinas a etapa de torrefação é essencial, pois, é nesta que as mesmas são formadas (OESTREICH-JANZEN, 2013).

## 2.2 AGROTÓXICOS

No Brasil o decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002 que regulamenta a lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 define agrotóxicos, como:

Produtos e 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; bem como substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002).

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com a toxicidade, o modo de ação e a composição química. A classificação toxicológica considera os componentes e as impurezas presentes no produto e seu dano quando ocorrer ingestão por via oral, dérmica e inalatória. O Ministério da Saúde através da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) recentemente alterou a classificação toxicológica adotando padrões do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS, do inglês *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*) visando o fortalecimento dos produtos nacionais no mercado internacional. De acordo com Resolução-RE nº 2.080, de 31 de julho de 2019 a nova classificação toxicológica apresenta cinco categorias, sendo a de menor número a que apresenta maior toxicidade até a categoria mais alta de menor toxicidade e a inclusão da categoria Não classificado, conforme apresentado no Quadro 1 (BRASIL, 2019; ANVISA, 2019).

**Quadro 1** - Reclassificação toxicológica de agrotóxicos definida pela ANVISA.

<b>Categoria</b>	<b>Classificação</b>
1	Produto Extremamente Tóxico
2	Produto Altamente Tóxico
3	Produto Moderadamente Tóxico
4	Produto Pouco Tóxico.
5	Produto Improvável de Causar Dano Agudo
Não classificado	Produto Não Classificado

Fonte: ANVISA, 2019.

Em relação ao modo de ação, que se refere ao organismo alvo, são nomeados: acaricidas (ácaros), algicidas (algas), avicidas (aves), bactericidas (bactérias), fungicidas (fungos), inseticidas (insetos), nematocidas (nematoides), rodenticidas (roedores) e reguladores de plantas (TSIPI; BOTITSI; ECONOMOU, 2015).

De acordo com a estrutura química das moléculas do princípio ativo são classificadas como: organofosforados, sulfonados, nitrogenados, organoclorados, triazol, carbamatos, piretroides, entre outros (GARCIA *et al.*, 2012).

Os agrotóxicos são empregados com o intuito de prevenir, destruir, repelir ou mitigar pestes, considerados quaisquer animais, plantas ou micro-organismo que comprometam a produção de alimentos; aumentar o rendimento e produção das plantações. Sem o uso desses insumos agrícolas a produção de alimentos para atender a demanda da população mundial como é realizada atualmente não seria possível (CARVALHO, 2017; SABARWAL; KUMAR; SINGH, 2018).

Porém diversos tipos de câncer estão associados à exposição humana a agrotóxicos, como doença de Hodgkin, mal de Parkinson, tumores, entre outras. O meio ambiente e a fauna também são afetados, uma vez que esses compostos podem permanecer no solo por anos, serem transportados para o ambiente aquático e assim, serem bioacumulados pela fauna e também podem formar metabólitos mais perigosos que o produto de origem (SABARWAL, KUMAR, SINGH, 2018; TSIPI; BOTITSI; ECONOMOU, 2015; CARVALHO, 2017).

### **2.3 RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAFÉ**

O registro dos agrotóxicos em território nacional é avaliado pelo MAPA, pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e pela ANVISA, que são os responsáveis pela elaboração de dossiês agrônomo, ambiental e toxicológico, respectivamente (ANVISA, 2020a). É atribuição da ANVISA “avaliar os agrotóxicos e afins destinados ao uso em ambientes urbanos, industriais, domiciliares, públicos ou coletivos, ao tratamento de água e ao uso em campanhas de saúde pública, quanto à eficiência do produto; monitorar os resíduos de agrotóxicos e afins em produtos de origem animal”, entre outras, conforme estabelecido no Decreto nº 4.074/2002 (ANVISA, 2020a).

No Código Internacional de Conduta sobre Manejo de Agrotóxicos (do inglês *The International Code of Conduct on Pesticide Management*) a FAO (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) define resíduos como quaisquer substâncias resultantes do uso de agrotóxicos presente em alimentos, produtos agrícolas, rações, *commodities*, água, ar e solo. Essas substâncias são os

derivados de agrotóxicos, como: metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas (FAO, 2014).

A partir da Monografia de Agrotóxicos, a ANVISA estabelece os Limites Máximos de Resíduos (LMR) e as culturas para quais determinados compostos ativos são permitidos. O LMR é definido de acordo com a Resolução - RDC nº 4, de 18 de janeiro de 2012, como sendo “a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico ou afim oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expressa em partes (em peso) do agrotóxico, afim ou seus resíduos, por milhão de partes de alimento (em peso) (ppm ou mg/kg)” (ANVISA, 2012).

No Brasil existem dois programas de monitoramento de resíduo de agrotóxicos em alimentos. Coordenado pela ANVISA, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) monitora resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal adquiridos no mercado interno pela população.

Segundo a ANVISA (2020d) seus resultados auxiliam na adoção de medidas educativas e coercitivas na utilização de agrotóxicos que sigam as Boas Práticas Agrícolas (BPA), avaliação do risco de saúde a partir do consumo de alimentos contendo resíduos de agrotóxicos, e reavaliação quanto ao uso de agrotóxicos que possam apresentar perigo à saúde. Enquanto o MAPA através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) monitora a qualidade dos produtos de origem animal e vegetal produzidos no país para consumo interno e externo, com relação a presença de contaminantes químicos e biológicos, além da presença de resíduos de agrotóxicos (MAPA, 2020).

A Tabela 2 apresenta os LMRs para café, estabelecidos no Brasil pela ANVISA, assim como os limites estabelecidos pela União Europeia (EU).



**Tabela 2** – Limites Máximos de Resíduos de agrotóxicos permitidos para o café.

Compostos Permitidos	Limites Máximos de Resíduos (mg kg <sup>-1</sup> )	
	ANVISA	União Europeia
Acetamiprido	0,2	0,05
Atrazina	N.R	0,1
Azoxistrobina	0,05	0,03
Boscalida	0,05	0,05
Buprofezina	N.R	0,05
Carbaril	N.R	0,05
Carbofurano	N.R	0,05
Carboxim	N.R	0,1
Clorpirifós	0,05	0,05
Clorpirifós-metílico	0,05	0,05
Difenoconazol	0,5	0,05
Dimetoato	N.R	0,05
Epoxiconazol	0,1	0,05
Fluquiconazol	0,07	0,05
Malationa	0,01	0,02
Metalaxil	N.R	0,05
Metconazol	0,2	0,1
Miclobutanil	0,1	0,05
Pirimicarbe	N.R	0,05
Profenofós	0,03	0,05
Propargito	0,3	0,05
Propiconazol	0,05	0,02
Simazina	0,02	0,05
Tebuconazol	0,2	0,1
Tetraconazol	0,08	0,02
Tiacloprido	N.R	0,05
Tiodicarbe	0,01	0,05
Triadimefom	0,1	0,05
Triazofós	0,01	0,02
Trifloxistrobina	0,05	0,05
Vamidationa	N.R	N.R

N.R.: Não registrado para a cultura café.

Fonte: ANVISA, 2019; EU MRL, 2019.

## 2.4 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAFÉ

### 2.4.1 Técnicas cromatográficas para determinação multirresíduo de agrotóxicos em café

Devido ao grande número de agrotóxicos disponíveis para o uso na produção de alimentos e a crescente preocupação mundial em relação aos riscos dos mesmos à saúde, é primordial o uso de técnicas que possam realizar análises rápidas e confiáveis acerca da quantidade de resíduos de agrotóxicos em matrizes ambientais e alimentícias, onde os analitos se encontram em pequena concentração e os componentes da matriz podem agir como interferentes prejudicando a análise (TSIPI; BOTITSI; ECONOMOU, 2015).

Técnicas cromatográficas são robustas, sensíveis e realizam a separação, identificação e quantificação de misturas complexas, sendo largamente empregada em diversos tipos de análises. O princípio de separação da cromatografia é a partição do analito entre uma fase estacionária e uma fase móvel, que pode ser líquida ou gasosa. A fase móvel que transporta os analitos flui pela coluna cromatográfica através da fase estacionária. Os compostos que possuem uma afinidade maior com a fase estacionária demoram mais tempo para eluir, ou seja, percorrer toda a coluna, ao contrário dos compostos que possuem menor afinidade. Com a eluição de todos os compostos obtém-se a separação dos mesmos de acordo com o tempo permanecido na coluna, chamado de tempo de retenção ( $t_R$ ) (SKOOG *et al.*, 2006).

Na cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) são analisados compostos voláteis, termicamente estáveis. A fase móvel, gás de arraste, deve ser um gás inerte que irá transportar os analitos através da coluna cromatográfica. Hélio, argônio e nitrogênio são os gases de arraste mais utilizados. Em geral são empregadas colunas capilares de diâmetro interno de 0,25 mm cujo comprimento pode chegar até 30 m. O uso de colunas capilares aumenta a capacidade do pico e fornecem sinais mais nítidos com uma largura de pico menor (SKOOG *et al.*, 2006; TSIPI; BOTITSI; ECONOMOU, 2015)

A amostra é vaporizada e injetada na coluna, mantida em um forno termostatizado, com um programa de temperatura. Para tempos de retenção entre 2 e 30 minutos costuma-se ajustar a temperatura de modo que essa seja igual ou um pouco maior que temperatura de ebulição média da amostra. A temperatura ao longo da corrida cromatográfica deve ser controlada cuidadosamente para que se obtenha

uma boa precisão. O aumento da temperatura pode ser feito continuamente ou em etapas (SKOOG *et al.*, 2006).

Os sistemas de detecção por ionização em chama (FID, do inglês *Flame Ionization Detection*), de condutividade térmica (TCD, do inglês *Thermal Conductivity Detection*), de captura de elétrons (ECD, do inglês *Electron Capture Detection*) e por espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) são os mais comuns. O uso de detectores adequados é importante, pois são os responsáveis pela conversão dos sinais químicos ou físicos em sinais elétricos, que serão processados posteriormente obtendo-se assim o resultado da análise (TSIPI; BOTITSI; ECONOMOU, 2015)

Para análise de compostos não voláteis emprega-se a cromatografia líquida, sendo a cromatografia líquida de ultra-alta performance (UHPLC, do inglês *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*) de grande popularidade. Nessa técnica empregam-se pequenas colunas, de 5 a 10 cm de comprimento, empacotadas com partículas de diâmetro interno menores que 2  $\mu\text{m}$  e altas pressões para que a fase móvel flua pela coluna a uma vazão razoável. O tamanho diminuto das partículas melhora a resolução cromatográfica, a separação dos picos, a eficiência e diminui o tempo de análise (TSIPI; BOTITSI; ECONOMOU, 2015)

A maioria das aplicações de UHPLC para determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos utilizam colunas de fase reversa, onde o material de recheio da coluna é não-polar, como o octadecilsilano (C18) ou octilsilano (C8). Solventes de altíssima pureza, como acetonitrila, água e metanol são utilizados como fase móvel, nas quais podem ser adicionados modificadores (ácido fórmico, acetato de amônio ou formiato de amônia) para aumentar a ionização dos analitos, conseqüentemente, aumentando a sensibilidade dos mesmos quando empregada a detecção por espectrometria de massas (TSIPI; BOTITSI; ECONOMOU, 2015).

Após a separação dos analitos pela técnica cromatográfica é necessário identificá-los e quantificá-los. Para isso detectores como UV/Vis, fluorescência, de espalhamento de luz, estão disponíveis comercialmente, sendo o espectrômetro de massas em série (MS/MS, do inglês *tandem mass spectrometry*) o mais utilizado.

O acoplamento da cromatografia à espectrometria de massas alia as vantagens das duas técnicas: alta seletividade, eficiência de separação e obtenção de informação estrutural e de massa molar (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Esse acoplamento é feito a partir de uma interface (fontes de ionização) onde os

analitos líquidos separados pela cromatografia são vaporizados e ionizados, antes de serem introduzidos ao espectrômetro de massas, que opera a alto vácuo (LANÇAS, 2009).

As técnicas que produzem ionização em pressão atmosférica (API, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*), como: eletronebulização (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*), ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e a ionização por fótons à pressão atmosférica (APPI, do inglês *Atmospheric Pressure Photon Ionization*) são as mais adequadas à cromatografia líquida (LANÇAS, 2009). A ionização por eletronebulização é a mais comumente empregada. A amostra dissolvida em solvente é pressurizada em um tubo capilar de aço inox, submetido a voltagens entre 3000 e 5000 V. Ocorre a perda das moléculas do solvente (dessolvatação) e a formação de um aerossol (gotículas do analito suspensas). A formação do aerossol decorre da explosão coulômbica. Nesse processo as gotículas sofrem sucessivas explosões, diminuindo cada vez de tamanho, até a formação do íon do analito em fase gasosa. As gotículas explodem, pois, a tensão da superfície não oferece resistência suficiente às forças de repulsão, originadas da carga que é imposta. Os íons dos analitos passam por um cone extrator que contém um gás nebulizador, N<sub>2</sub> fluindo na direção contrária. O gás nebulizador ajuda na dessolvatação e diminui os íons indesejados que se encontrem aglomerados. O ESI opera no modo positivo ou negativo, dependendo do sinal da tensão aplicada. O ESI positivo gera gotículas com carga positiva e é o mais empregado (LANÇAS, 2009).

O analito ionizado e na fase vapor é direcionado para o MS. O princípio da MS é a separação de íons de acordo com relação entre as massas e cargas (razão  $m/z$ ). Os instrumentos de MS não são detectores universais. A faixa de massas a se determinar, resolução e custo são fatores determinantes na escolha do melhor detector. Os analisadores de massa mais empregados são: quadrupolo (Q), armadilha de íons (ITD, do inglês *ion trap detection*) e tempo de voo (ToF, do inglês *Time of Flight*) (LANÇAS, 2009).

Os analisadores do tipo quadrupolo são os mais utilizados devido à simplicidade, preço relativamente baixo, boa linearidade e a facilidade de ser entendido e operado. É composto de quatro barras de metal cilíndricas, dispostas em dois pares. A um par de barras oposto é aplicado um potencial elétrico positivo e ao outro par um potencial negativo. E ao mesmo tempo é aplicada uma combinação de

corrente contínua e radiofrequência (RF). O par de barras com potencial positivo filtra as massas elevadas, enquanto as de potencial negativo filtra as de menor massas. Somente íons com determinada razão  $m/z$  atravessam o quadrupolo com uma trajetória estável (LANÇAS, 2009).

Analisadores do tipo triplo quadrupolo (QqQ), são constituídos por três quadrupolos em série, onde no primeiro (Q1) e no terceiro quadrupolos (Q3) ocorrem a separação de íons de razão  $m/z$  específica, enquanto o segundo quadrupolo (Q2 ou q) serve como uma cela de colisão. O íon precursor (íon separado no Q1) é direcionado para a cela de colisão, onde será fragmentado através de repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia, que pode ser argônio, hélio ou nitrogênio, num processo conhecido como dissociação induzida por colisão (CID, do inglês *collision-induced dissociation*). Todos os quadrupolos devem ser controlados de modo que somente íons de uma única razão  $m/z$  ou de um intervalo de razões  $m/z$  sejam transmitidos. A aplicação da CID sob energia elevada acarreta em informações estruturais mais relevantes, pois as moléculas são fragmentadas em posições características e pode aumentar a detectabilidade do método (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

As técnicas de varredura para obtenção do espectro de massas em MS/MS são: varredura completa (do inglês, *Full scan*), varredura dos íons produzidos, varredura do íon precursor, Monitoramento Seletivo de Reações (SRM, do inglês *Selected Reaction Monitoring*) e Monitoramento do Íon Seletivo (SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring*).

Na varredura completa uma ampla faixa de razão  $m/z$  é monitorada e o cromatograma obtido a partir da obtenção de todos os íons produzidos é chamado de cromatograma de íon total (TIC, do inglês *Total Ion Chromatogram*) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). No modo SRM os quadrupolos Q1 e Q3 são programados para selecionar uma única razão  $m/z$ , desse modo somente um íon fragmentado em Q2 é detectado. Esse método aumenta a sensibilidade e pode ser empregado para monitorar mais uma razão  $m/z$ . No modo SIM é monitorado os íons de um ou mais valores específicos de  $m/z$  de interesse (VESSECCHI *et al.*, 2011).

Na literatura são relatados diversos estudos relacionados a determinação de resíduos de agrotóxicos em café verde que empregam a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, como o trabalho desenvolvido por De Oliveira, Pacheco e Scherer (2016), no qual resíduos de flutriafol e piraclostrobina foram

determinados em grãos de café verde brasileiros. No preparo de amostra foram utilizados 5 g de amostra de café verde, com adição de 10 mL de água ultrapura e 15 mL de acetonitrila acidificada 1% ácido acético (v/v). Os sais de partição utilizados foram  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NaCl}$  e  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ . Na etapa de limpeza, utilizando a técnica d-SPE, GCB, C18, PSA e  $\text{MgSO}_4$  foram utilizados como sorventes. Após a limpeza 3 mL do sobrenadante foi evaporado até a secura e reconstituído em 1 mL de acetonitrila. A análise foi realizada empregando uma coluna de C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 de tamanho de partícula) e duas fases móvel, uma solução aquosa 0,1% v/v ácido fórmico (fase móvel A) e metanol 0,1% v/v ácido fórmico (fase móvel B).

Outros estudos buscando a determinação de um maior número de resíduos de agrotóxicos foram desenvolvidos, como, por exemplo, o trabalho realizado por Dias e colegas (2013) para determinação de 123 agrotóxicos em grãos de café verde e análise por LC-MS/MS, empregando uma coluna de C18 (100 x 2,0 mm; 2,2 de tamanho de partícula) e fase móvel I, contendo  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de acetato de amônio (contendo 0,01 % de ácido fórmico) e fase móvel II do solvente metanol. Foram utilizados 2,5 g de amostra e 7,5 mL de água ultrapura e 10 mL de acetonitrila acidificada 1% ácido acético (v/v). Sais de partição 4 g de  $\text{MgSO}_4$  e 1 g de NaAc. Na limpeza foi empregada a técnica d-SPE, 1 mL de sobrenadante, 150 mg de  $\text{MgSO}_4$  e 125 mg de C18. Esse método apresentou resultados de recuperação entre 70,7 e 108,8%, limite de detecção com valores entre 0,05 e  $18,48 \mu\text{g kg}^{-1}$  para os compostos analisados.

Utilizando a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em série, Saito-Shida, Nemoto e Teshima (2015) desenvolveram um método de extração para 162 agrotóxicos, em folhas de chá (*Camellia sinensis*), empregando uma coluna de 30 m e diâmetro interno de 0,25 mm na qual o aumento de temperatura foi realizado em etapas, iniciando-se em  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  e chegando à temperatura final de  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ . Utilizando água ultrapura e acetonitrila para extração dos analitos e diferentes cartuchos de SPE (extração em fase sólida, do inglês Solid Phase Extraction), devido à complexidade da matriz, foram empregados na etapa de limpeza. Cartuchos de C18, GCB/PSA e sílica em gel, foram empregados para remoção de polifenóis, compostos ácidos e pigmentos e por último a cafeína, respectivamente. Recuperações satisfatórias, com valores entre 70 e 120% foram obtidos para o grande número de compostos determinados em um nível de concentração de  $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Outro estudo empregando análise por GC-MS/MS em amostras de chá foi desenvolvido, dessa vez por Cajka e colaboradores (2012). Nesse estudo, após a extração do extrato a técnica de extração líquido-líquido foi empregada na limpeza. Foram empregados 2 g de amostra e 10 mL de água ultrapura que permaneceram em repouso por 30 minutos. Após esse tempo, foi realizada a extração com o método QuEChERS. E na limpeza, 1 mL do sobrenadante, 1 mL de n-hexano e 5 mL de solução 20% de NaCl (v/v) e uma alíquota da camada de n-hexano foi analisada em uma coluna de 15 m de comprimento com temperatura inicial de 50 °C e final de 300 °C.

No estudo desenvolvido por Souza e Navickiene (2019) em café torrado, empregando a técnica de extração líquido-líquido, 7 agrotóxicos foram determinados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série, empregando uma coluna de C18 (de dimensões de 50 x 2,1 mm e 1,7 µm de partícula) e um gradiente de duas fases móvel A e B, sendo a fase móvel A, metanol/água (98:2, v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico e 5 mmol L<sup>-1</sup> de formiato de amônio e a fase móvel B, composta por metanol com 0,1% de ácido fórmico e 5 mmol L<sup>-1</sup> de formiato de amônio.

## **2.5 TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM CAFÉ**

O preparo de amostra é uma das etapas dentro do procedimento analítico, que consiste em: amostragem, armazenamento e transporte, preparo de amostra, separação, identificação e quantificação, validação analítica e por último a avaliação estatística e tomada de decisões. Os analitos são extraídos, separados e concentrados de uma matriz resultando em um material livre de compostos interferentes que possam prejudicar na separação, identificação e no funcionamento dos instrumentos analíticos. A técnica empregada deve ser rápida, fácil de se realizar, compatível com o instrumento analítico responsável pelas análises e não ser onerosa (BORGES; PEREIRA; MANO, 2015).

Na Tabela 3 estão descritos diferentes tipos de preparo de amostra para amostras de café e algumas matrizes que possuem compostos semelhantes em sua composição.

### 2.5.1 Método QuEChERS

A metodologia QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust, Safe*) desenvolvida por Anastassiades e colaboradores (2003) é um procedimento de preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos de frutas, vegetais, produtos de origem animal e amostras ambientais e também resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. O acrônimo, do inglês, está diretamente relacionado com as características e vantagens apresentadas pelo método que é rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro (PRESTES *et al.*, 2009).

Essa metodologia consiste em três etapas: extração com solvente, partição como o uso de sais e a limpeza do extrato. Na primeira etapa, acetonitrila é utilizada como solvente de extração, sendo o solvente mais adequado, pois co-extrai uma pequena quantidade de interferentes, como pigmentos, ceras e gorduras; extrai compostos com uma ampla faixa de polaridade e com problemas de estabilidade (quando acidificada) e é adequada a GC-MS/MS e LC-MS/MS. Na segunda etapa, a adição de sais como NaCl promove o efeito *salting out*, que é a diminuição da solubilidade dos analitos na fase aquosa, enquanto a adição de  $MgSO_4$  diminui a quantidade de água na fase orgânica, melhora a recuperação de agrotóxicos polares e a apolares, devido à reação exotérmica da hidratação do  $MgSO_4$  promover um aquecimento da amostra entre 40-45 °C. A terceira etapa, emprega a técnica de extração dispersiva em fase sólida (d-SPE, do inglês *dispersive solid-phase extraction*), que teve seu desenvolvimento simultâneo ao QuEChERS, por Anastassiades e colaboradores (2003). Essa técnica simples consiste na adição de um ou mais sorventes ao extrato, seguido de agitação (para que o sorvente se distribua uniformemente ao extrato) e centrifugação (para separar o sorvente e o extrato).

Na versão original, foram observados problemas de estabilidade e recuperação de compostos, que variavam dependendo do pH da matriz, ocasionando no desenvolvimento das versões acetato e citrato. A versão acetato, foi desenvolvida por Lehotay e colegas com objetivo de se obter recuperações entre 70 e 120%, utiliza acetonitrila 1% (v/v) acidificada com ácido acético como solvente de extração e adição de acetato de sódio, obtendo-se assim um efeito tamponante com pH igual a 4,8. Anastassiades e colegas, desenvolveram a metodologia QuEChERS citrato, onde o efeito tampão é alcançado através da adição de citrato de sódio di-hidratado e hidrogenocitrato sesqui-hidratado (PRESTES *et al.*, 2009). No Quadro 2 está descrito



em etapas o método QuEChERS, assim como a quantidade de solventes, sais e sorventes empregados.

**Quadro 2-** Solventes, sais de partição e sorventes empregados no método QuEChERS e suas etapas.

Etapa	Metodologia		
	QuEChERS original	QuEChERS acetato	QuEChERS citrato
<b>Extração</b>	10 g amostra + 10 mL acetonitrila	15 g amostra + 15 mL acetonitrila (1% HAc, v/v)	10 g amostra + 10 mL acetonitrila
<b>Partição</b>	4 g MgSO <sub>4</sub> + 1 g NaCl	6 g MgSO <sub>4</sub> + 1,5 g CH <sub>3</sub> COONa	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
<b>Limpeza</b>	1 mL sobrenadante + 150 mg MgSO <sub>4</sub> + 25 mg PSA	1 mL sobrenadante + 150 mg MgSO <sub>4</sub> + 50 mg PSA	1 mL sobrenadante + 150 mg MgSO <sub>4</sub> + 25 mg PSA

Fonte: (ZANELLA *et al.*, 2015).

A etapa de limpeza, empregando d-SPE, é versátil, pois a escolha do sorvente, assim como sua quantidade dependem da matriz, dos analitos e do equipamento que será empregado na análise. Pequenos volumes de solvente e sorvente, fazem da d-SPE uma técnica menos custosa. A amina primária secundária (PSA, do inglês *Primary Secondary Amine*) é um trocador aniônico que interage com outros compostos fazendo pontes de hidrogênio ou dipolo-dipolo. A presença de grupos primário e secundário de aminas lhe confere uma estrutura bidentada com forte efeito quelante. Utilizado na remoção de açúcares, ácidos graxos e orgânicos e pigmentos, empregam-se 25 ou 50 mg para cada mL de extrato desse composto junto com C18 ou carbono grafitizado GCB. O sorvente C18

(octadecilsilano) apresenta boa eficiência na remoção de interferentes apolares para matrizes na qual o teor de gordura exceda 2%, sendo tamanho de partícula mais utilizado é o de 40  $\mu\text{m}$ . O carvão grafitizado GCB possui grupamentos altamente polares e grande área superficial, que podem formar pontes de hidrogênio. Utilizado para remoção de pigmentos, esteróis e coextrativos apolares, porém apresenta como desvantagem baixas recuperações para compostos planares (ZANELLA *et al.*, 2015).

O sorvente contendo  $\text{ZrO}_2$ , conhecido como Supel<sup>TM</sup> QuE Z-Sep<sup>+</sup>, consiste em C18 e zircônia ligados à molécula de sílica, é remove gorduras e pigmentos mais efetivamente do que C18 (MERCK, 2020). A interação da gordura com o átomo de zircônia através do mecanismo ácido-base de Lewis. Como essa interação é independente da presença de água no extrato, resulta em limpezas mais eficientes do extrato (HERRERO *et al.*, 2014).

### 2.5.2 Extração líquido-líquido (LLE)

O princípio da técnica de extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid Liquid Extraction*) é a partição dos analitos entre dois líquidos imiscíveis, mas nos quais os analitos apresentam diferentes solubilidades. Geralmente se utilizam água e solventes orgânicos como acetona, acetonitrila, etanol, acetato de etila, n-hexano, dentre outros. Essa técnica pode ser empregada em análise de alimentos (mel, água de coco e leite), análise ambiental (águas residuais e potável), análise de farmacêuticas e toxicológicas (plasma humano e urina) (BARTH *et al.*, 2015).

O procedimento de extração líquido-líquido é rápido e simples, consistindo na adição de um solvente orgânico à amostra (ou ao extrato da amostra), vigorosa agitação e recolhimento da alíquota da fase de interesse. Geralmente realizado com sucessivas adições de solvente orgânico à amostra, com a junção das alíquotas ao final, pode também ser realizada em uma única etapa. Porém, para que recuperações satisfatórias sejam obtidas com somente uma etapa de extração, a razão de distribuição dos analitos ( $K_D$ ) nas fases orgânica e aquosa deve ser maior que 10, e a razão entre as fases orgânica e aquosa estar entre 0,1 e 10 (BARTH *et al.*, 2015).

Como os analitos polares migram para a fase aquosa e os analitos apolares para a orgânica, a adição de sais, para promover o efeito *salting out*, também é uma estratégia utilizada nesta técnica para aumentar as concentrações dos analitos na fase orgânica e conseqüentemente aumentar a recuperação (BARTH *et al.*, 2015).

**Tabela 3-**Revisão bibliográfica de técnicas de preparo de amostra para determinação multirresíduo em café e outras matrizes que possuem compostos semelhantes em sua composição.

(continua)

Matriz	Método de extração	Etapa de limpeza	Compostos	Técnica	Referência
<b>Café verde</b>	5 g amostra + 10 mL H <sub>2</sub> O+ 15 mL ACN 1% (v/v) HAc + 6 g MgSO <sub>4</sub> + 1 g NaCl + 1,5 g Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	Sobrenadante + 100 mg GCB + 100 mg C18 + 150 MgSO <sub>4</sub> + 50 mg PSA. 3 mL sobrenadante evaporado até a secura e reconstituído em 1 mL ACN	Flutriafol e piraclostrobina	LC-MS/MS	DE OLIVEIRA, PACHECO e SCHERER, 2016
<b>Café verde</b>	10 g amostra ( <i>slurry</i> 1:3) + 10 mL ACN 1% (v/v) HAc. + 3 g MgSO <sub>4</sub>	-	117 agrotóxicos	LC-ESI- MS/MS	REICHERT <i>et al.</i> , 2018
<b>Café verde</b>	2 g amostra + 10 mL H <sub>2</sub> O, repouso por 15 min à 8 °C. 10 mL ACN + sais de extração QuEChERS citrato	<i>Freezing-out</i> : a fase de ACN foi deixada à -18°C durante a noite. 1 mL de extrato + 150 mg de MgSO <sub>4</sub> + 25 mg de PSA + 25 mg de C18. 100 µL de CS <sub>2</sub> + 0,5 mL de ACN + 0,5 mL de extrato após o clean-up + 5 mL de água deionizada. A camada de CS <sub>2</sub> evaporada à 40°C e reconstituído em 100 µL solução de mistura de protetores.	16 agrotóxicos	GC-MS	BRESIN <i>et al.</i> , 2015
<b>Café verde e café com polpa</b>	10 g amostra + 10 mL H <sub>2</sub> O + 15 mL ACN 1% (v/v) HAc + Sais de extração QuEChERS acetato	8 mL sobrenadante + 300 mg PSA + 900 mg MgSO <sub>4</sub> + 150 mg C18. Extrato evaporado e reconstituído em 2 mL n-hexano/acetona (9:1, v/v)	10 agrotóxicos	GC-ECD	MEKONEN <i>et al.</i> , 2014
<b>Café verde</b>	2,5 g amostra + 7,5 mL H <sub>2</sub> O + 10 mL ACN 1% (v/v) HAc + 4 g MgSO <sub>4</sub> + 1 g NaAc	1 mL extrato + 150 mg MgSO <sub>4</sub> + 125 mg C18	123 agrotóxicos	LC-MS/MS	DIAS <i>et al.</i> , 2013

(continuação)

<b>Matriz</b>	<b>Método de extração</b>	<b>Etapa de limpeza</b>	<b>Compostos</b>	<b>Técnica</b>	<b>Referência</b>
<b>Café torrado</b>	1 g de amostra + 5 mL de ACN + 15 min em ultrassom	1 mL sobrenadante + 1 mL H <sub>2</sub> O + 1 mL de diclorometano. Alíquota do sobrenadante evaporada e dissolvida em 1 mL MeOH/H <sub>2</sub> O (1+1, v/v).	7 agrotóxicos	UPLC-MS/MS	SOUZA e NAVICKIENE, 2019
<b>Café</b>	2 g amostra + 5 mL de H <sub>2</sub> O + 1 g NaCl+ 30 min de repouso. Extração com 5 mL de EtAc por 3 min. Repetir três vezes. Fase orgânica combinada e seca com 1 g MgSO <sub>4</sub> . Volume reduzido para 5 mL a partir da evaporação com N <sub>2</sub> . Extrato residual dissolvido com 10 mL EtAc	<u>GPC</u> : 10 mL extrato diluído e filtrado. Fase móvel: EtAc:n-hexano (1:2, v/v). 1 mL de eluente concentrado para SPE, foi coletado entre 4-15 min. <u>SPE</u> : Cartuchos Envi-Carb (250 mg) acoplado ao NH <sub>2</sub> -LC (250 mg). Condicionamento: 10 mL acetona: acetato de etila (2:5, v/v). Percolação: 1 mL de eluato (GPC) concentrado. Eluição: 10 mL acetona:acetato de etila (2:5, v/v). Eluato evaporado e reconstituído em 0,5 mL acetato de etila	69 agrotóxicos	GC-MS	YANG <i>et al.</i> , 2011
<b>Folhas de café</b>	1 g amostra + 7,5 mL H <sub>2</sub> O e 30 min repouso. 10 mL ACN + 6 g MgSO <sub>4</sub> + 1,5 g NaCl + 1,5 g citrato de sódio tribásico dihidratado+ 0,75 g citrato de sódio sibásico sesqui-hidratado	1 mL sobrenadante + 150 mg MgSO <sub>4</sub> + 50 mg PSA+ 50 mg C18 + 50 mg SupelQuE Z-Sep+	52 agrotóxicos	LC-MS/MS	TREVISAN <i>et al.</i> , 2017
<b>Folhas secas de chá</b>	2 g de amostra + 10 mL de H <sub>2</sub> O+ 30 min repouso. 10 mL de ACN + Sais de extração QuEChERS original	1 mL sobrenadante + 1 mL n-hexano + 5 mL solução 20% NaCl. Alíquota da camada n-hexano foi injetada	-	GC-MS/MS	CAJKA <i>et al.</i> , 2012

(continuação)

<b>Matriz</b>	<b>Método de extração</b>	<b>Etapa de limpeza</b>	<b>Compostos</b>	<b>Técnica</b>	<b>Referência</b>
<b>Folhas secas de chá verde</b>	5 g de amostra + 20 mL de ACN + 4 g de MgSO <sub>4</sub> + 1 g NaCl + 1 g citrato de tri-sódio dihidratado e dissódio hidrogenocitrato sesquihidratado	<u>SPE</u> : Cartucho: PSA/GCB (500 mg) Condicionamento: 5 mL ACN:tolueno (3:1, v/v) Percolação: 5 mL da fase ACN Eluição: 5 mL ACN:tolueno (3:1, v/v) Eluente coletado evaporado e redissolvido em 2,5 mL de n-hexano:acetona (9:1, v/v)	101 agrotóxicos	GC-MS/MS	HOU <i>et al.</i> , 2016
<b>Medicamentos tradicionais chineses</b>	2 g <i>Ophiopogon japonicas</i> ou 2 g <i>Codonopsis pilosula</i> ou 10 g <i>Shengmai Yin</i> + 10 mL H <sub>2</sub> O + 10 mL 0,1% (v/v) HAc em ACN + sais de QuEChERS original	1,5 mL fase ACN + 100 µL CHCl <sub>3</sub> + 5 mL H <sub>2</sub> O + 0,05 g NH <sub>4</sub> OAc + 1 min sonicação. Fase CHCl <sub>3</sub> é evaporada e reconstituída em 1 mL de ACN:H <sub>2</sub> O (4:6, v/v)	19 agrotóxicos	UHPLC-MS/MS	QIN <i>et al.</i> , 2016
<b>Chá</b>	5 g amostra + 15 mL H <sub>2</sub> O +30 min repouso + 15 mL ACN 1% (v/v) HAc + sais de QuEChERS acetato	7 mL sobrenadante + 900 mg MgSO <sub>4</sub> + 150 mg GCB + 300 mg PSA. 3 mL sobrenadante evaporado até 0,1-0,2 mL e reconstituído com MeOH até 0,5 mL. Adição de 0,1 M NH <sub>4</sub> OAc até completar 1 mL	141 agrotóxicos	LC/ESI-MS/MS e UHPLC/Qq-TOF-MS	WANG, CHOW e LEUNG, 2011
<b>Café</b>	10 g amostra + 14 mL ACN 1% (v/v) HAc + 6 g MgSO <sub>4</sub> + 1,5 g NaAc + 4 g NaCl	6 mL sobrenadante + 900 mg MgSO <sub>4</sub> + 150 mg PSA + 45 mg GCB	73 agrotóxicos	LC-MS/MS	CHUNG e CHAN, 2010
<b>Café verde</b>	10 g <i>slurry</i> + 10 mL ACN 1% (v/v) HAc + 1 g citrato de sódio + 0,5 g hidrogenocitrato de sódio + 4 g MgSO <sub>4</sub> + 1 g NaCl	4 mL de sobrenadante + 150 mg PSA + 45 mg GCB + 855 mg MgSO <sub>4</sub>	14 agrotóxicos	LC-ESI-MS/MS	HARMOKO <i>et al.</i> , 2015
<b>Cacau</b>	10 g amostra + 10 mL ACN	2 mL sobrenadante + 4 mL n-hexano. 1 mL da camada ACN ou 1 mL de sobrenadante + 150 mg MgSO <sub>4</sub> + 50 mg C18 + 50 mg PSA	26 agrotóxicos	LC-MS/MS e GC-MS/MS	ZAINUDIN <i>et al.</i> , 2015

(conclusão)

Matriz	Método de extração	Etapa de limpeza	Compostos	Técnica	Referência
Chá	5 g amostra + 20 mL água e 30 min repouso. Extração com 50 mL ACN e filtração. Repetir com 20 mL ACN. Combinar os extratos e avolumar com ACN até 100 mL. Retirar 20 mL e adicionar 10 g NaCl + 20 mL tampão fosfato 0,5 mol L <sup>-1</sup> (pH 7,0)	<u>SPE</u> : Cartucho C18 (1000 mg): Condicionamento: 10 mL ACN; Percolação: 20 mL ACN; Eluição: 5 mL ACN. Evaporar e redissolver em 3 mL ACN e adicionar 1 mL tolueno (I); Cartuchos GCB/PSA acoplados (500 mg/500 mg): Condicionamento: 10 mL ACN:tolueno (3:1, v/v); Percolação: Adicionar (I) ao cartucho; Eluição: 18 mL ACN:tolueno (3:1, v/v); Evaporar e redissolver em 2 mL acetona:hexano (3:7, v/v) (II); Cartucho sílica gel (1000 mg): Condicionamento: 10 mL acetona:hexano (3:7, v/v); Percolação: Adicionar (II) ao cartucho; Eluição: 13 mL acetona:hexano (3:7, v/v); Evaporar e redissolver em 1 mL acetona:hexano (1:1, v/v)	162 agrotóxicos	GC-MS/MS	SAITO-SHIDA, NEMOTO e TESHIMA, 2015
Chá	5 g amostra e extração com ACN	Cartucho ENVI-Carb/LC-NH <sub>2</sub> : condicionamento: 10 mL tolueno:ACN (25:75, v/v); Percolação: 2mL da amostra reconstituída em tolueno/acetoneitrila (25:75) ; Eluição: 20 mL tolueno:ACN (25:75, v/v) Troca de solvente para hexano Etapa de congelamento (-20 °C, 24 h)	141 agrotóxicos	GC-MS	OKAMURA, 2012.
Chá verde	15 g amostra + 15 mL ACN 1% (v/v) HAc + Sais de QuEChERS acetato	10 mL sobrenadante + 300 mg PSA + 900 mg MgSO <sub>4</sub> + 150 mg C18. 5 mL de sobrenadante evaporado; redissolver em 0,9 mL hexano:acetona (9:1, v/v) + 100 µL dietil-d10-parationa (10 ng/µL em hexano:acetona (9:1, v/v) 50 mg PSA + 150 mg MgSO <sub>4</sub> + 50 mg C18	22 agrotóxicos	GC-MS/MS	STEINIGER <i>et al.</i> , 2009.

## 2.6 VALIDAÇÃO

A validação de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, é “a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos”. Assim, com o objetivo de garantir a qualidade de seus resultados, laboratórios do mundo todo buscam validar seus métodos analíticos.

Na literatura há diversos guias que abordam esse tema. No âmbito nacional, temos a Orientação sobre validação de métodos analíticos, documento de caráter orientativo do INMETRO (revisão 07 de julho de 2018) e a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA.

Internacionalmente a SANTE/12682/2019 através do Documento de orientação sobre controle analítico de qualidade e procedimentos de validação de métodos para resíduos de pesticidas e análises em alimentos e rações (*Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed*) e a Codex Alimentarius através das Recomendações para métodos de análise e amostragem (*Recommendations for methods of analysis and sampling*).

Os parâmetros que devem ser abordados no procedimento de validação de um método analítico são: seletividade, efeito matriz, linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão, estão descritos no Quadro 3.

**Quadro 3** - Parâmetros a serem abordados no procedimento de validação de um método analítico.

<b>Parâmetro</b>	<b>Definição</b>	<b>Referência</b>
Seletividade	Capacidade de um método de distinguir a resposta entre os analitos, de compostos presentes na matriz.	INMETRO, 2018
Efeito Matriz	Acréscimo ou decréscimo no sinal causado pela presença de compostos provenientes da matriz (interferentes).	INMETRO, 2018
Linearidade	Capacidade do método de responder proporcionalmente à concentração do analito presente na amostra.	INMETRO, 2018
Faixa de trabalho	Intervalo que compreende da menor até a maior concentração do analito presente na amostra, que apresenta precisão, exatidão e linearidade em um nível aceitável.	INMETRO, 2018
Sensibilidade	Variação da resposta do instrumento correspondente à variação da concentração do analito. Inclinação da curva analítica $y = a + bx$ .	INMETRO, 2018
Limite de detecção	Menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser detectada pelo instrumento.	INMETRO, 2018
Limite de quantificação	Menor quantidade de analito presente amostra que pode ser quantificada pelo instrumento com valores aceitáveis de precisão e exatidão.	INMETRO, 2018
Precisão	Proximidade dos resultados analíticos obtidos independentemente a partir de um mesmo procedimento experimental.	SANTE, 2019
Exatidão	Proximidade dos resultados analíticos obtidos experimentalmente e um valor verdadeiro ou de referência.	SANTE, 2019



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho consistiu no desenvolvimento e validação de um método para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de grãos de café verde, empregando método QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS. Esse estudo foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

#### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram:

- ✓ Agitador Vortex – Modelo VX-38 (IONLAB, Brasil);
- ✓ Balanças analíticas de precisão UX-420H e APX-200 (Shimadzu, Japão);
- ✓ Banho ultrassônico Sonorex, modelo RK 510 (Bandelin, Alemanha)
- ✓ Centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- ✓ Centrífuga (CentriBio, Brasil);
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha e Eppendorf, Canadá);
- ✓ Concentrador e evaporador TurboVap LV<sup>®</sup> (Biotage, EUA);
- ✓ Moinho IKA, modelo A 11 basic (IKA, Brasil);
- ✓ Moinho de rotor, modelo TE-633 (Tecnal, Brasil);
- ✓ Bomba a vácuo TE-058 (Tecnal, Brasil);
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct 3UV<sup>®</sup> (Millipore, França);
- ✓ Sistema HPLC-UV/Vis Varian ProStar 210 (Varian, EUA);
- ✓ Sistema UHPLC-MS/MS Waters (EUA) equipado com:
  - Cromatógrafo líquido ACQUITY;
  - Coluna ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 x 50 mm; 1,7 µm), Waters (EUA);
  - Detector MS triplo quadrupolo, modelo Xevo TQ;
  - Interface/fonte de ionização por eletronebulização;
  - Sistema controlador de solventes (sistema binário de bombas) para operação de gradientes de alta pressão;
  - Sistema de injeção;
  - Software de aquisição de dados MassLynx 4.1 (Waters, EUA);
  - Gerador de nitrogênio PEAK NM30L-MS (Peak Scientific, Escócia);

### 3.2 REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS UTILIZADOS

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

- ✓ Acetonitrila, grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Metanol, grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Diclorometano (Honeywell, EUA);
- ✓ Hexano (Honeywell, EUA);
- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3R, resistividade de 18,2 MΩ cm (Millipore, França);
- ✓ Ácido acético glacial 100% (J. T. Baker, EUA);
- ✓ Ácido fórmico ≥ 98% (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Formiato de amônio (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Cloreto de sódio p.a. (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- ✓ Acetato de sódio anidro (J. T. Baker, EUA);
- ✓ Citrato de sódio diidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Hidrogenocitrato de sódio sesquiidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Sorvente Bondesil C18 com diâmetro de partícula (d.p.) 40 µm (Agilent, EUA);
- ✓ Sorvente Bondesil PSA com d.p. de 40 µm (Agilent, EUA);
- ✓ Supel™ QuE Z-Sep+ (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ SupelClean™ ENVI-Carb™ (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro p.a. (J.T. Baker, Japão);
- ✓ Filtros de PTFE de 0,22 µm (Analítica, Brasil);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas de rosca de capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ✓ Microtubo, tipo Eppendorf com 2 mL de capacidade (Axygen Scientific, EUA);
- ✓ Frascos de vidro (vial) com capacidade de 2 mL (Agilent, EUA);
- ✓ Extran® neutro (Merck, Brasil);
- ✓ Padrões sólidos (LGC, Alemanha) dos compostos em estudo (Tabela 4);
- ✓ Vidraria comum utilizada em laboratório.

### 3.3 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO E DO PADRÃO DE CONTROLE

Para garantir que um método analítico tenha sido executado corretamente, empregam-se um padrão de controle e um padrão interno. Compostos estáveis e/ou que possuam um comportamento semelhante ao analito, mas que não interajam com o mesmo e que sejam improváveis de se encontrar na amostra, podem ser empregados como um desses padrões (SANTE, 2019).

Adicionado ao extrato final, o Padrão Interno (PI) é utilizado para avaliar o instrumento, como, por exemplo, fazer correções na variação do volume de injeção. O trifenilfosfato escolhido como padrão interno foi adicionado na concentração de 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  aos brancos fortificados, amostras e soluções de trabalho no solvente e na matriz fortificada anteriormente à análise.

A atrazina deuterada (atrazina-d5) empregada como Padrão de Controle (PC) foi adicionada ao branco fortificado e às amostras antes do procedimento de extração, para avaliar as possíveis fontes de erro em todas as etapas do método. Foi adicionada na mesma concentração dos ensaios de fortificação (10, 20 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

### 3.4 AGROTÓXICOS SELECIONADOS

Para o desenvolvimento do método foram selecionados os agrotóxicos autorizados pela ANVISA, através das Monografias Autorizadas e compostos autorizados pela União Europeia para a cultura de café. Essa seleção foi realizada considerando-se a disponibilidade de padrões disponíveis no laboratório.

A Tabela 4 apresenta os compostos utilizados nesse trabalho, assim como suas respectivas classes, grupos químicos, pureza do padrão sólido e propriedades físico-químicas.

**Tabela 4-**Relação dos compostos selecionados para o estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido e propriedades físico-químicas.

(continua)

Composto	Classe	Grupo Químico	Pureza (%)	pKa	Log Kow	Solubilidade (mg L <sup>-1</sup> )
Acetamiprido	Inseticida	Neonicotinóide	99	0,70	0,8	2950
Atrazina	Herbicida	Triazina	99	1,70	2,70	35
Atrazina-d5 (P.C)	-	Triazina	99	-	-	-
Azoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	99	-	2,50	6,7
Boscalida	Fungicida	Carboxamida	99	-	2,96	4,6
Buprofezina	Inseticida e acaricida	-	99	-	4,93	0,46
Carbaril	Inseticida	Carbamato	98	10,4	2,36	9,1
Carbofurano	Inseticida, acaricida e nematicida	Carbamato	98	-	1,80	322
Carboxim	Fungicida	Oxatina	99	0,5	2,30	134
Clorpirifós etílico	Inseticida	Organofosforado	99	-	4,70	1,05
Clorpirifós metílico	Acaricida e inseticida	Organofosforado	97	-	4,00	2,74
Difenoconazol	Fungicida	Triazol	99	1,07	4,36	15,0
Dimetoato	Inseticida e acaricida	Organofosforado	98	-	0,75	25900
Epoxiconazol	Fungicida	Triazol	99	-	3,30	7,1
Fluquiconazol	Fungicida	Triazol	98	0,90	3,24	1,15
Malationa	Inseticida e acaricida	Organofosforado	99	-	2,75	148

(conclusão)

<b>Composto</b>	<b>Classe</b>	<b>Grupo Químico</b>	<b>Pureza (%)</b>	<b>pKa</b>	<b>Log Kow</b>	<b>Solubilidade (mg L<sup>-1</sup>)</b>
Metalaxil	Fungicida	Fenilamida	99	-	1,75	8400
Metconazol	Fungicida	Triazol	98	11,38	3,85	30,4
Miclobutanil	Fungicida	Triazol	99,5	2,30	2,89	132
Pirimicarbe	Inseticida	Carbamato	97	4,40	1,70	3100
Profenofós	Inseticida e acaricida	Organofosforado	98	-	1,70	28
Propargito	Acaricida	Éster de sulfito	91,5	-	5,7	0,22
Propiconazol	Fungicida	Triazol	97	1,09	3,72	150
Simazina	Herbicida	Triazina	98	1,62	2,30	5
Tebuconazol	Fungicida	Triazol	98	5,00	3,70	36
Tetraconazol	Fungicida	Triazol	97	0,65	3,56	156,6
Tiacloprido	Inseticida	Neonicotinóide	99	-	1,26	184
Tiodicarbe	Inseticida	Carbamato	99	-	1,62	22,2
Triadimefom	Fungicida	Triazol	99	-	3,18	70
Triazofós	Inseticida, acaricida e nematocida	Organofosforado	99	-	3,55	35
Trifenilfosfato (P.I)	-	Organofosforado	99,5	-	-	-
Trifloxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	99	-	4,50	0,61
Vamidationa	Acaricida e Inseticida	Organofosforado	98	-	-4,21	4000

P.C: Padrão de Controle P.I : Padrão Interno. Solubilidade em água à 20 °C. Fonte: ANVISA (2020); FOOTPRINT Pesticide Properties Database (2020)

### **3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS DOS COMPOSTOS SELECIONADOS**

Para este estudo foram preparadas soluções estoque individuais na concentração de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  a partir dos padrões sólidos de cada agrotóxico, considerando-se a pureza de cada composto. Os solventes empregados no preparo dessas soluções foram acetonitrila e metanol grau HPLC.

A partir das soluções estoques individuais foi preparada uma mistura na concentração de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  contendo todos os compostos. Essa mistura foi utilizada nos ensaios de fortificação e para avaliar a linearidade do método. A partir da mistura contendo todos os compostos, foram preparadas soluções de trabalho nas concentrações de 0,5, 1, 2, 5, 10 e  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  em solvente e no extrato branco de café verde. As soluções analíticas foram armazenadas em frascos âmbar a  $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **3.6 PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA**

As amostras “branco” de café verde foram produzidas em Carmo de Minas (MG) e as amostras de café verde utilizadas na aplicação do método são provenientes da região de Maringá (PR).

Para o processamento das amostras foram utilizados os moinhos TecMill e IKA. O processamento foi realizado duas vezes para cada amostra para que tamanhos de partículas diminutos fossem obtidos. As amostras processadas foram armazenadas em frascos de polipropileno de 200 mL e acondicionadas em freezer em temperatura abaixo de  $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **3.7 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAFÉ VERDE**

No desenvolvimento de métodos multirresíduos a complexidade de algumas matrizes pode ser prejudicial a análise, devido ao efeito matriz. Para evitar a competição dos analitos com os interferentes, que podem ocasionar em um aumento ou supressão do sinal e alteração no tempo de retenção dos analitos, resultando em uma interpretação errônea dos resultados é necessário um preparo de amostra que consiga remover esses interferentes (TREVISAN *et al.*, 2016; JIAO *et al.*, 2017).

A presença de ácidos, lipídeos, carboidratos, dentre outros compostos, além do baixo teor de água, fazem do grão de café verde uma matriz complexa para se determinar agrotóxicos em baixos níveis de concentração através de métodos multirresíduos. Devido a essa problemática, métodos de preparo de amostra para grãos de café verde têm sido desenvolvidos.

São relatados na literatura, métodos de preparo de amostra empregando extração com o método QuEChERS, e uma etapa de limpeza com a técnica de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE). Porém há poucos estudos relatados na literatura que empregam a extração líquido-líquido (LLE) após extração com o método QuEChERS para posterior determinação multirresíduo de agrotóxicos em café verde.

O método de preparo de amostra desenvolvido neste trabalho teve como base as metodologias que utilizam o método QuEChERS (rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro) como método de extração, em todas as suas variações, QuEChERS original (ANASTASSIADES *et al.*, 2003), QuEChERS acetato (LEHOTAY *et al.*, 2005) e QuEChERS citrato (ANASTASSIADES *et al.*, 2007). Além da técnica de extração líquido-líquido que apresenta um baixo custo, simplicidade de operação e pequenos volumes de solventes. Essa técnica foi empregada na etapa de limpeza de extratos, conforme relatado por Souza e colegas (2019) que utilizaram essa técnica em extrato de café torrado e por Cajka e colaboradores (2012) no estudo empregando folhas de chá, para redução do coextrativo cafeína presente no extrato.

Testes preliminares (Tabela 5) foram realizados para se avaliar na etapa de extração, a versão do método QuEChERS mais adequada para a recuperação de compostos. Os testes T1 (QuEChERS original), T2 (QuEChERS citrato) e T3 (QuEChERS acetato) foram realizados em triplicata na concentração de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

**Tabela 5-**Relação dos testes preliminares realizados para avaliar a etapa de extração.

<b>Etapa</b>	<b>QuEChERS original (T1)</b>	<b>QuEChERS citrato (T2)</b>	<b>QuEChERS acetato (T3)</b>
<b>Amostra</b>	5 g	5 g	5 g
<b>Hidratação</b>	5 mL água + Agitação em vórtex por 1 min + 30 min de contato	5 mL água + Agitação em vórtex por 1 min + 30 min de contato	5 mL água + Agitação em vórtex por 1 min + 30 min de contato
<b>Extração</b>	10 mL acetonitrila	10 mL acetonitrila	10 mL acetonitrila 1% (v/v) ácido acético
<b>Agitação</b>	Manual 1 min	Manual 1 min	Manual 1 min
<b>Etapa</b>	<b>QuEChERS original (T1)</b>	<b>QuEChERS citrato (T2)</b>	<b>QuEChERS acetato (T3)</b>
<b>Partição</b>	4 g MgSO <sub>4</sub> + 1 g NaCl	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	6 g MgSO <sub>4</sub> + 1,5 g CH <sub>3</sub> COONa
<b>Agitação</b>	Vortex 1 min	Vortex 1 min	Vortex 1 min
<b>Separação</b>	Centrifugação a 3500 rpm, 8 min	Centrifugação a 3500 rpm, 8 min	Centrifugação a 3500 rpm, 8 min
<b>Limpeza</b>	2 mL de sobrenadante + 300 mg MgSO <sub>4</sub> + 100 mg PSA	2 mL de sobrenadante + 300 mg MgSO <sub>4</sub> + 100 mg PSA	2 mL de sobrenadante + 300 mg MgSO <sub>4</sub> + 100 mg PSA
<b>Agitação</b>	Vortex 1 min	Vortex 1 min	Vortex 1 min
<b>Separação</b>	Centrifugação a 3400 rpm, 8 min	Centrifugação a 3400 rpm, 8 min	Centrifugação a 3400 rpm, 8 min
<b>Filtração</b>	Filtro PTFE 0,22 µm	Filtro PTFE 0,22 µm	Filtro PTFE 0,22 µm
<b>Diluição</b>	5x em água	5x em água	5x em água
<b>Análise</b>	UHPLC-MS/MS	UHPLC-MS/MS	UHPLC-MS/MS

Após a avaliação do método QuEChERS na etapa de extração, foi avaliada a etapa de limpeza do extrato. Nessa etapa, foram avaliadas algumas combinações de sorventes na d-SPE utilizando 2 mL de extrato (Tabela 6). Os testes foram realizados em triplicata na concentração de 50 µg kg<sup>-1</sup>.



**Tabela 6-** Relação dos testes empregando a técnica d-SPE avaliados em relação a extração de coextrativos e ensaios de recuperação dos compostos em amostra de café verde.

Teste	Etapa de limpeza
T4	300 mg MgSO <sub>4</sub> + 50 mg PSA+ 50 mg C18 + 50 mg GCB
T5	300 mg MgSO <sub>4</sub> + 50 mg PSA+ 50 mg C18 + 50 mg Z-Sep <sup>+</sup>

As proporções dos sorventes empregados na etapa de limpeza, nos testes T4 e T5, foram relatados por TREVISAN e colegas (2017), no seu estudo com folhas de café. Devido ao uso de solventes apolares na técnica de LLE e a presença de ácidos, lipídeos, carboidratos e principalmente a cafeína, os testes T6a, T6b, T7a e T7b, foram avaliados primeiramente em relação ao extrato “branco” fortificado nas concentrações de 2,5 e 5 µg L<sup>-1</sup>, em relação a recuperação dos compostos (Tabela 7) e também com relação a extração de coextrativos a partir de testes gravimétricos.

A cafeína é coextraída na etapa de extração e sua presença no sistema cromatográfico é prejudicial, pois, mais limpezas e manutenções são necessárias no sistema cromatográfico dificultando a análise qualitativa e quantitativa de compostos que coeluem em um tempo de retenção próximo ao da cafeína, devido a mesma apresentar um pico largo e alto (BRESIN, *et al.*, 2015).

Assim, os testes T6a e T7a foram também avaliados com relação a remoção de cafeína do extrato, sendo a análise realizada em um HPLC-UV/Vis ProStar 210, com comprimento de onda variável, ajustado no valor de 273 nm. Os extratos “branco” dos testes T6a e T7a foram diluídos 100 vezes em fase móvel ACN/H<sub>2</sub>O (30:70, v/v) antes da análise, assim como os extratos “branco” de café verde sem a etapa de limpeza que foram utilizados como parâmetro para a avaliação de remoção da cafeína.

A relação dos solventes empregados assim como o volume necessário empregado nos testes T6a e T7a foram relatados por Souza e colaboradores (2019) no seu estudo com café torrado e descritas por Cajka e colaboradores (2012) no estudo em folhas de café, respectivamente. As proporções utilizadas nos testes T6b e T7b foram duplicadas de modo a se avaliar o fator de concentração na recuperação de compostos.

A reconstituição do extrato em fase móvel foi realizada devido aos solventes empregados, diclorometano e hexano, não serem adequados a análise por UHPLC-MS/MS.

**Tabela 7** – Relação dos testes empregando a técnica LLE avaliados em relação a extração de coextrativos e ensaios de recuperação dos compostos em amostra de café verde.

Teste	Procedimento
T6a	1 mL extrato “branco” fortificado na concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ + 1 mL $\text{H}_2\text{O}$ + 1 mL diclorometano + 1 min vortex. Centrifugação (8 min, 3400 rpm). 1 mL da alíquota do fundo recolhida, evaporada e reconstituída em 1 mL FM e filtrada
T6b	2 mL extrato “branco” fortificado na concentração de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ + 1 mL $\text{H}_2\text{O}$ + 1 mL diclorometano + 1 min vortex. Centrifugação (8 min, 3400 rpm). 1 mL da alíquota do fundo recolhida, evaporada e reconstituída em 1 mL de FM e filtrada
T7a	1 mL extrato “branco” fortificado na concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ + 1 mL n-hexano + 5 mL solução 20% NaCl + 1 min vortex. Centrifugação (8 min, 3400 rpm). 1 mL da camada de hexano evaporada e reconstituída em 1 mL de FM e filtrada
T7b	2 mL extrato “branco” fortificado na concentração de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ + 1 mL n-hexano + 5 mL solução 20% NaCl + 1 min vortex. Centrifugação (8 min, 3400 rpm). Evaporar 1 mL da camada de hexano e reconstituída em 1 mL de FM e filtrada

### 3.7.1 Teste gravimétrico

Para auxiliar na avaliação do método QuEChERS na etapa de extração, foram realizados testes gravimétricos dos métodos QuEChERS original, QuEChERS citrato e QuEChERS acetato. Após a extração da matriz “branco” de café verde, 4 mL de extrato sem limpeza foram submetidos a secagem utilizando o concentrador TurboVap®, sob fluxo de nitrogênio, utilizando temperatura de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Testes gravimétricos foram realizados também na etapa de limpeza de extrato da matriz “branco” de café verde, onde 1,5 mL do extrato após limpeza conforme

indicado nos testes T4, T5, T6a e T7a foram submetidos a secagem utilizando o concentrador TurboVap®, sob fluxo de nitrogênio, utilizando temperatura de 40 °C.

### 3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE RESÍDUOS EM CAFÉ VERDE

O método QuEChERS modificado para análise de resíduos de agrotóxicos em café verde foi validado avaliando-se os parâmetros de seletividade, curva analítica e faixa linear, efeito matriz, limites de detecção e quantificação, exatidão através do ensaio de recuperação, precisão (repetitividade) e precisão intermediária.

#### 3.8.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada a partir da comparação dos cromatogramas obtidos da injeção no sistema UHPLC-MS/MS dos extratos de amostras “branco” com as amostras “branco” fortificadas com os padrões dos compostos analisadas no método.

#### 3.8.2 Curva analítica e linearidade

A linearidade da curva analítica foi avaliada a partir da injeção em triplicata das curvas analíticas preparadas a partir da solução padrão nas concentrações 0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 µg L<sup>-1</sup>. Estas soluções foram preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato “branco” da matriz café verde. Posteriormente, realizaram-se os cálculos da média da área de cada analito, para obter a regressão linear e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) que deve estar entre 0,990 e 0,999. A equação da reta (Equação 1) relaciona a área do pico de cada analito à concentração e a sensibilidade

$$y = ax + b \quad \text{Equação 1}$$

Onde,  $y$  é a resposta medida, ou seja, a área do pico;  $x$  é a concentração;  $a$  é o coeficiente angular (inclinação da curva analítica) que é igual a sensibilidade;  $b$  é o coeficiente linear (intersecção com o eixo  $y$ , quando  $x = 0$ ).

#### 3.8.3. Efeito matriz

Para avaliar o efeito matriz (EM) comparam-se as inclinações curvas analíticas dos padrões realizados no solvente (acetonitrila) e no extrato “branco” da matriz de café verde. O efeito matriz é calculado através da Equação 2.

$$EM (\%) = \left( \frac{a_M - a_S}{a_S} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:  $a_M$  é a inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em extrato da matriz “branco” de café verde;  $a_S$  é a inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em solvente (acetonitrila).

#### 3.8.4. Exatidão e precisão

A exatidão e precisão do método foram avaliados a partir dos valores de recuperação e RSD. Ensaios de recuperação, a partir da fortificação das amostras “branco” da matriz café verde nos níveis 10, 20 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  foram realizadas com 7 replicatas. De acordo com o INMETRO (2018), a recuperação é calculada a partir da estimativa da concentração pela análise de amostras “branco” fortificadas com o analito em quantidades conhecidas (Equação 3).

$$\text{Recuperação (\%)} = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:  $C_1$  é a Concentração na amostra fortificada;  $C_2$  é a Concentração na amostra não fortificada;  $C_3$  é a Concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

A precisão, expressa através do desvio padrão relativo (DPR), é calculado através da Equação 4, sendo expressada em percentual.

$$\text{Desvio Padrão Relativo (\%)} = \left( \frac{DP}{CMD} \right) \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde: DP é o Desvio padrão; CMD é a Concentração média determinada.

A precisão intermediária foi avaliada a partir da execução do método em dias diferentes, empregando-se os ensaios de fortificação nos níveis 10, 20 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

#### 3.8.5. LOQ e LOD do método

A partir da avaliação dos resultados dos ensaios de recuperação e de linearidade das curvas analíticas, de todos os analitos, realizou-se a definição do limite de detecção e do limite de quantificação do instrumento ( $LOD_i$ ,  $LOQ_i$ ) e do método ( $LOD_m$ ,  $LOQ_m$ ). O  $LOQ_i$  foi estabelecido como o menor ponto da curva analítica preparada no extrato da amostra “branco” da matriz de café verde, com a razão sinal/ruído maior que 10. E o  $LOD_i$  foi calculado através do  $LOQ_i$  estabelecido dividido por 3,33. O  $LOQ_m$  foi estabelecido como a menor concentração fortificada na amostra “branco” de café verde que apresentou recuperações entre 70 e 120%, e com  $RSD \leq 20\%$ . Calculou-se o  $LOD_m$  partindo-se do  $LOQ_m$  estabelecido dividido por 3,33.

### **3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO A AMOSTRAS REAIS**

O método desenvolvido foi aplicado para determinação de resíduos dos agrotóxicos em estudo em 7 amostras de café verde, provenientes da região de Maringá (PR). A amostra branco de café verde foi adquirida da produção orgânica e era proveniente de Carmo de Minas (MG).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 CONDIÇÃO DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM CAFÉ VERDE

A fase móvel utilizada neste estudo para a determinação de resíduo de agrotóxicos é a mesma utilizada para análise das amostras de rotina do LARP-UFSM. Foram empregadas duas fases móveis A e B no modo gradiente. A fase móvel A é constituída de uma solução aquosa 2% (v/v) metanol, ácido fórmico 0,1% (v/v) e formiato de amônio 5 mmol L<sup>-1</sup>. A fase móvel B é constituída de metanol com ácido fórmico 0,1% (v/v) e formiato de amônio 5 mmol L<sup>-1</sup>, o gradiente utilizado está descrito na Tabela 8. A adição dos aditivos ácido fórmico e formiato de amônio às fases orgânica e aquosa foi feita com o objetivo de melhorar a ionização dos analitos (KEMMERICH *et al.*, 2015). O tempo de corrida cromatográfica foi de 10 minutos e a vazão foi mantida constante em 0,225 mL min<sup>-1</sup>.

**Tabela 8**-Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de agrotóxicos em café verde, empregado ao sistema UHPLC-MS/MS.

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

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

As condições empregadas ao sistema UHPLC-MS/MS para o estabelecimento do método de determinação multirresíduo em café verde, estão descritas a seguir:

- Temperatura da coluna: 40 °C;
- Voltagem do capilar (ESI+): 0,5 kV;
- Temperatura de dessolvatação: 500 °C;
- Vazão do gás de dessolvatação (N<sub>2</sub>): 600 mL min<sup>-1</sup>;
- Vazão do spray: 80 mL min<sup>-1</sup>;
- Vazão do gás de colisão: 0,15 mL min<sup>-1</sup>;
- Temperatura da fonte: 150 °C;
- Volume de injeção: 10 µL;
- Tempo de residência (*dwel time*): 0,01 s;
- Tempo de aquisição: 30 s.

Para que as melhores condições de análise para cada composto fossem obtidas, foram previamente infundidas soluções individuais dos compostos presentes no método, na concentração de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ . A partir da infusão foram selecionados os íons de quantificação (transição de maior intensidade) e confirmação (transição de segunda maior intensidade), utilizando a análise no modo SRM no MS/MS. O modo positivo de eletronebulização foi escolhido, para todos os compostos.

Para melhores condições de análise, as curvas analíticas preparadas em extrato da matriz “branco” de café verde e em acetonitrila foram diluídas 5 vezes em água ultrapura. A Tabela 9 apresenta todos os agrotóxicos selecionados nesse estudo e determinados por UHPLC-MS/MS, utilizando o modo de ionização positivo, no modo de aquisição SRM, seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ), íons precursores e íons produto para cada composto.

**Tabela 9-**Agrotóxicos analisados por UHPLC-MS/MS, utilizando o modo de ionização ESI +, no modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ), íons precursores e produtos para a quantificação e identificação.

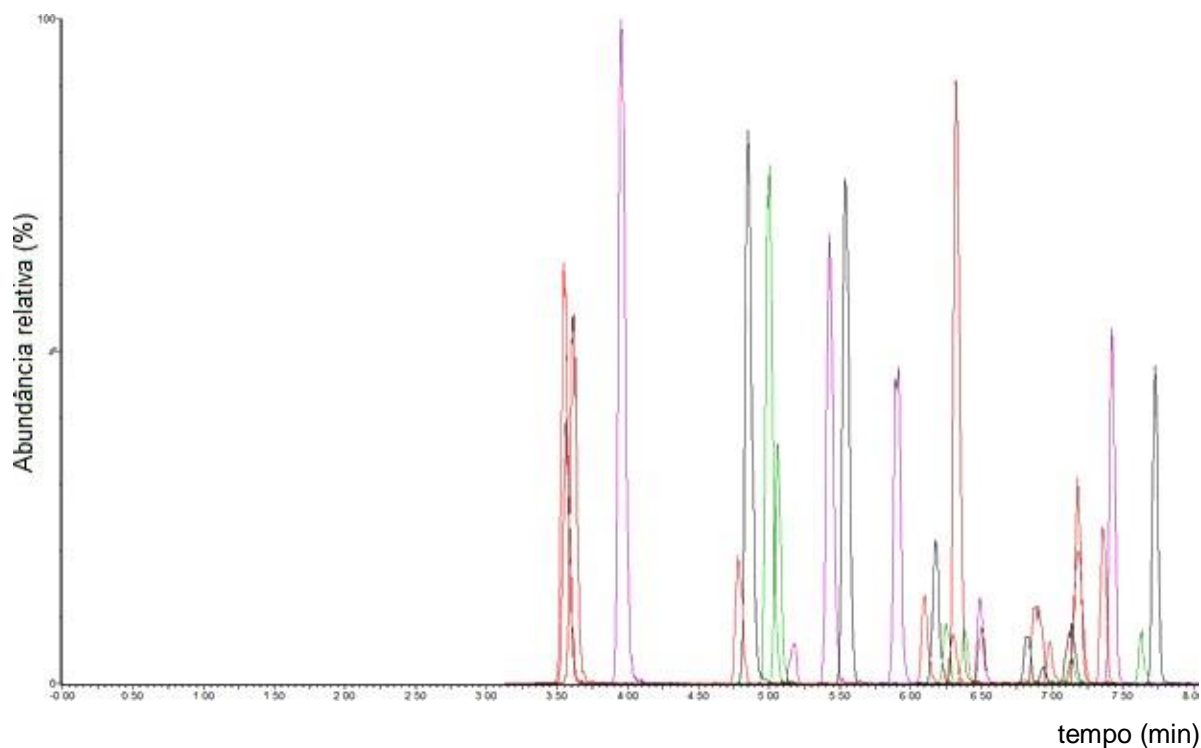
Composto	$t_R$ (min)	Íon Precursor (m/z)	VC (V)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
				Íon Produto (m/z)	EC (eV)	Íon Produto (m/z)	EC (eV)
Acetamiprido	3,62	223	23	126	20	56	15
Atrazina	5,44	216	30	174	18	96	23
Atrazina-d5 (P.C)	5,42	221	26	179	18	101	23
Azoxistrobina	5,91	404	17	329	30	372	15
Boscalida	6,11	343	32	307	20	140	20
Buprofezina	7,42	306	22	201	12	57,4	20
Carbaril	2,93	202	19	145	22	117	28
Carbofurano	4,85	222	25	165	16	123	16
Carboxim	5,00	236	25	143	16	87	22
Clorpirifós	7,63	350	27	97	32	198	20
Clorpirifós metílico	7,14	322	23	125	20	289	16
Difenoconazol	7,13	406	37	251	25	111	60
Dimetoato	3,55	230	12	125	20	199	10
Epoxiconazol	6,50	330	25	101	50	121	22
Fluquiconazol	6,38	376	37	307	30	349	18
Malationa	6,18	331	12	99	24	127	12
Metalaxil	5,54	280	15	192	17	220	13
Metconazol	6,99	320	29	70	22	125	36
Miclobutanil	6,31	289	25	70,2	18	125	32
Pirimicarbe	4,41	239	25	182	15	72	18
Profenofós	7,37	373	25	128	40	303	20
Propargito	7,73	368	15	175	15	231	15
Propiconazol	6,88	342	37	159	34	69	22
Simazina	4,79	202	34	96	22	124	16
Tebuconazol	6,83	308	31	70	22	125	40
Tetraconazol	6,50	372	32	159	30	70	20
Tiacloprido	3,96	253	32	126	20	90	40
Tiodicarbe	5,17	355	17	88	16	108	16
Trifenilfosfato (PI)	6,88	327	40	152	37	215	28
Triazofós	6,32	314	22	162	35	119	18
Triciclazol	4,11	190	32	136	27	163	20
Trifloxistrobina	7,18	409	25	145	40	186	16
Vamidationa	3,57	288	17	118	28	146	10

VC: Voltagem do cone. EC: Energia de colisão. PI: Padrão Interno. PC: Padrão de Controle.



A Figura 2 apresenta um cromatograma obtido a partir dos íons selecionados no modo de aquisição SRM para a solução analítica preparado no extrato da matriz de café verde, com os analitos na concentração de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . E devido a presença de cafeína no extrato de café verde e seu tempo de retenção de 2,78 minutos, a aquisição de dados dos íons no modo SRM não foi realizada até aproximadamente 3,5 minutos da corrida cromatográfica, evitando assim a interferência da mesma (pico largo e alto) na determinação dos íons dos outros compostos.

**Figura 2** – Cromatograma de íon total obtido a partir dos íons selecionados no modo por UHPLC-MS/MS a partir de soluções preparadas no extrato da matriz café verde na concentração de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ .



## 4.2 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM CAFÉ VERDE

### 4.2.1 Escolha do método QuEChERS

Com base nos estudos relatados na literatura foram realizados os testes, conforme Tabela 5, para se determinar o método QuEChERS mais adequado a extração da matriz café verde, com relação a recuperação dos compostos estudados e uma menor coextração de interferentes. As análises foram conduzidas no sistema UHPLC-MS/MS.

Para matrizes que possuam um teor de água menor que 25% em sua composição é recomendado a diminuição da quantidade de amostra, e adição de água. A hidratação da amostra melhora a homogeneidade e garante eficiência na etapa de extração, pois a migração do solvente de extração ao interior da matriz é facilitada (HACKBART *et al.*, 2012).

Os grãos de café verde apresentam um teor de 10 a 12% de água em sua composição, assim foram empregados 5 g de amostra (DE OLIVEIRA, PACHECO e SCHERER, 2016), e adição de 5 mL de água (1:1, m/v) (MEKONEN *et al.*, 2014) e um tempo de hidratação de 30 minutos (SAITO-SHIDA, NEMOTO e TESHIMA, 2015), antes da extração com acetonitrila, foram as modificações feitas no método QuEChERS.

As versões do método QuEChERS com as modificações descritas acima, foram avaliadas em relação a recuperação dos compostos, na concentração de 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , através de uma curva analítica preparada em extrato “branco” da matriz café verde em cada teste avaliado. Nos testes de recuperação realizados em triplicata, o método QuEChERS original (T1) apresentou melhores resultados de recuperação e RSD satisfatórios para 31 compostos avaliados inicialmente.

A extração realizada a partir do método QuEChERS original (T1) apresentou melhores resultados de recuperação e RSD satisfatórios para os 31 compostos. Enquanto para o teste QuEChERS acetato (T2), o número de compostos recuperados foi 15 e no teste QuEChERS citrato (T3) foram recuperados 21 compostos.

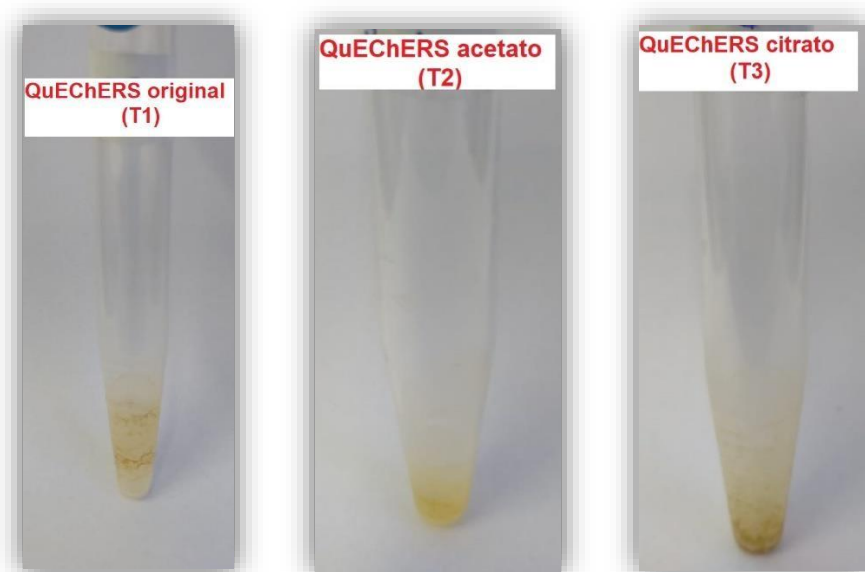
Os QuEChERS acetato e QuEChERS citrato possuem um efeito tampão, que pode afetar a extração de compostos, que apresentem sensibilidade ao pH, como problemas de estabilidade e/ou recuperação. Compostos como pimetrozina, imazalil e bentazona são compostos que dependem do pH do meio para que recuperações

satisfatórias sejam obtidas, independente de qual matriz os mesmos se encontrem (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Testes gravimétricos foram realizados para avaliar a remoção de coextrativos na etapa de extração e auxiliar na escolha do método QuEChERS mais adequado (Figura 3). No teste utilizando QuEChERS citrato (T3) o efeito tampão entre 5,0 e 5,5 apresentou uma maior extração de coextrativos (57,7 mg). O extrato do teste QuEChERS original (T1) apresentou pH igual a 5, e uma extração de coextrativos intermediária (43,6 mg), sendo o QuEChERS acetato (T2), com efeito tamponante com um valor de pH igual a 4,8, sendo o teste que extraiu uma menor quantidade de coextrativos (30,5 mg).

Relacionando os testes de recuperação de compostos com a quantidade de coextrativos, o teste QuEChERS original (T1) foi o que apresentou melhores resultados de recuperação satisfatórios e extração de coextrativos.

**Figura 3-** Testes gravimétricos dos QuEChERS original, QuEChERS acetato e QuEChERS citrato.

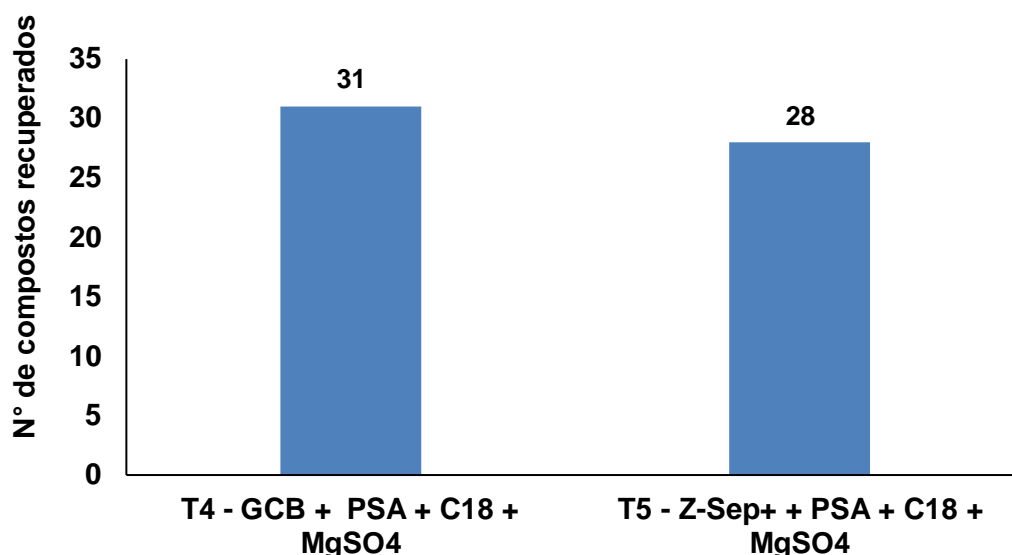


#### 4.2.2 Avaliação da etapa de limpeza

A etapa de limpeza no preparo de amostra, é de suma importância, para que os resultados obtidos sejam confiáveis, apresentem robustez e um menor efeito matriz. Assim, na técnica d-SPE foram escolhidos os sorventes que efetuassem uma remoção efetiva de coextrativos sem comprometer a recuperação dos compostos.

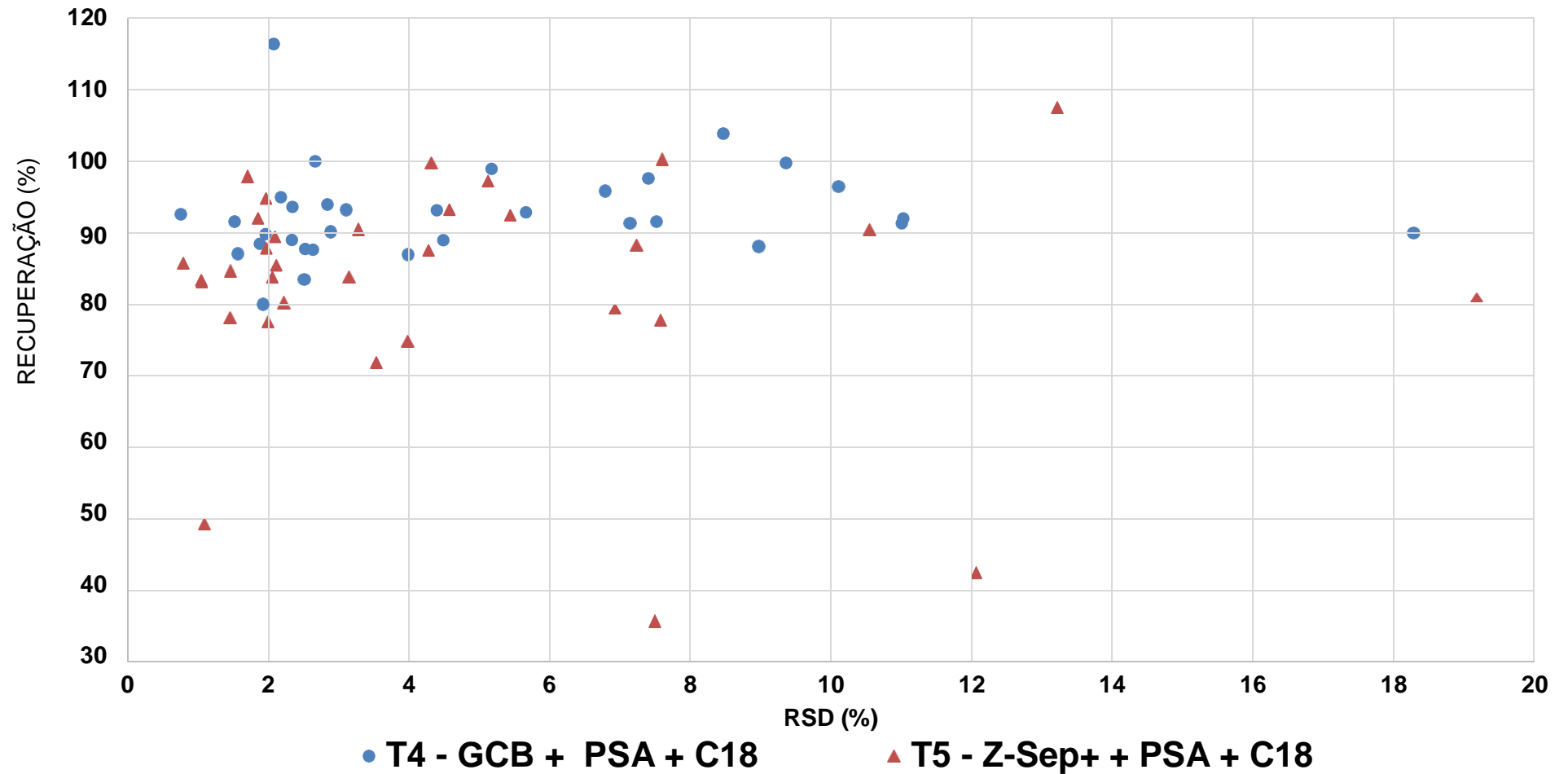
Nesta etapa, conforme descrito na Tabela 6 foram avaliados os sorventes GCB, PSA, C18 e MgSO<sub>4</sub> (T4) e Supel™ QuE Z-Sep<sup>+</sup>, PSA, C18 e MgSO<sub>4</sub> (T5) com relação a remoção de interferentes e coextrativos. Na Figura 4 estão apresentados os resultados de recuperação dos testes T4 e T5, com RSD ≤ 20% para os compostos avaliados.

**Figura 4** – Número de compostos que apresentaram recuperações entre 70 e 120%, com valores de RSD ≤ 20%, nos testes de limpeza na matriz café verde por UHPLC-MS/MS.



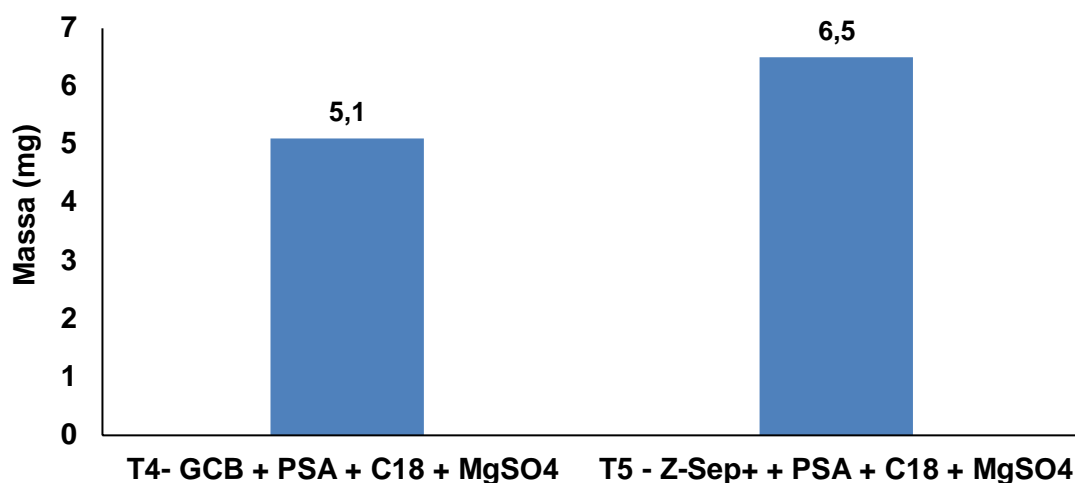
A mistura de sorventes empregadas na técnica d-SPE, nos testes T4 e T5, foram realizadas devido à complexidade da matriz e de modo a remover efetivamente os coextrativos. O teste com o uso de GCB, PSA, C18 e MgSO<sub>4</sub> (T4) foi o que apresentou melhor resultado, com 31 compostos com recuperação entre 70 e 120% e RSD ≤ 20%, enquanto o teste empregando Supel™ QuE Z-Sep<sup>+</sup>, PSA, C18 e MgSO<sub>4</sub> (T5) apresentou recuperações satisfatórias para 28 compostos, com RSD ≤ 20%, conforme apresentado no gráfico de recuperação versus RSD, representado na Figura 5.

**Figura 5** – Gráfico de recuperação versus RSD obtidos nos testes de limpeza de extrato T4 e T5 para os 31 compostos avaliados inicialmente.



Como os testes T4 e T5 apresentaram bons resultados na recuperação dos compostos, os mesmos foram avaliados quanto à remoção de coextrativos da matriz café verde, a partir dos testes gravimétricos (Figura 6).

**Figura 6-** Gráfico da massa (mg) de coextrativos em relação aos testes T4 e T5.



O GCB (T4) conhecido por apresentar forte interação com compostos planares, devido à sua grande área superficial e remoção de coextrativos apolares proporcionou uma maior limpeza do extrato branco da matriz café. O Supel™ QuE Z-Sep+ (T5), empregado para remoção de lipídeos, apresentou ótimos resultados de recuperação de compostos para a matriz café verde, porém uma menor quantidade de coextrativos foi removida na limpeza, se comparado ao teste T4.

A técnica de extração líquido-líquido empregada nos testes T6a, T6b, T7a e T7b foi realizada de modo a avaliar a eficiência da mesma na etapa de limpeza, com relação à remoção de cafeína do extrato de café verde e a recuperação de compostos, uma vez que há poucos estudos relatando o emprego da LLE para essa matriz. O uso do solvente de extração acetonitrila facilita o uso dessa técnica, uma vez que quando misturada a solventes apolares ocorre uma distinta partição das fases (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015).

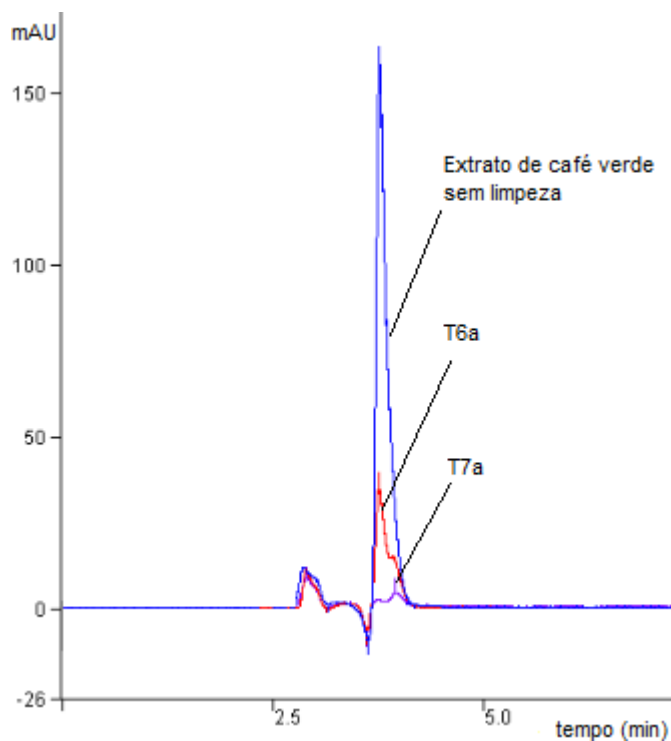
Os testes empregando diclorometano (T6a e T6b) não apresentaram recuperações satisfatórias. No teste T6a (sem concentração do extrato final), a maioria dos compostos apresentaram recuperações na faixa entre 30 e 50%, com  $RSD \leq 20\%$ . No teste T6b (com concentração do extrato final) não foi observado um aumento na recuperação dos compostos.

Dos testes que empregaram hexano, somente o teste T7a (sem concentração do extrato final) apresentou recuperações satisfatória entre 70 e 120% para 12 compostos, com  $RSD \leq 20\%$ . No teste T7b (com concentração do extrato final) a maioria dos compostos apresentaram recuperações na faixa entre 30 e 50%, com  $RSD \leq 20\%$ .

O uso de fase aquosa contendo adição de um sal neutro e inerte, é uma estratégia utilizada na LLE para aumentar a concentração dos compostos na fase orgânica (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015). O efeito de *salting out*, provocado pela adição de NaCl à fase aquosa e um volume maior da mesma, auxiliou na extração de compostos no teste T7a.

Com relação à remoção de cafeína do extrato de café verde, no teste empregando diclorometano (T6a) ocorreu uma redução de 70,4% de cafeína quando comparado com o extrato de café verde sem a etapa de limpeza. E no teste empregando hexano (T7a) a redução foi de 94,5% (Figura 7). O emprego de diclorometano, solvente menos apolar que o hexano, e um pequeno volume de água ultrapura resultou em uma menor remoção de cafeína do extrato de café verde no teste T6a. No teste T7a, o uso de um solvente mais apolar como o hexano e um volume maior de água ultrapura proporcionou que uma maior quantidade de cafeína particionasse na fase aquosa, devido a solubilidade da molécula da cafeína ser maior em solventes polares.

**Figura 7** – Gráfico dos testes T6a e T7a empregando a técnica LLE para a remoção de cafeína.

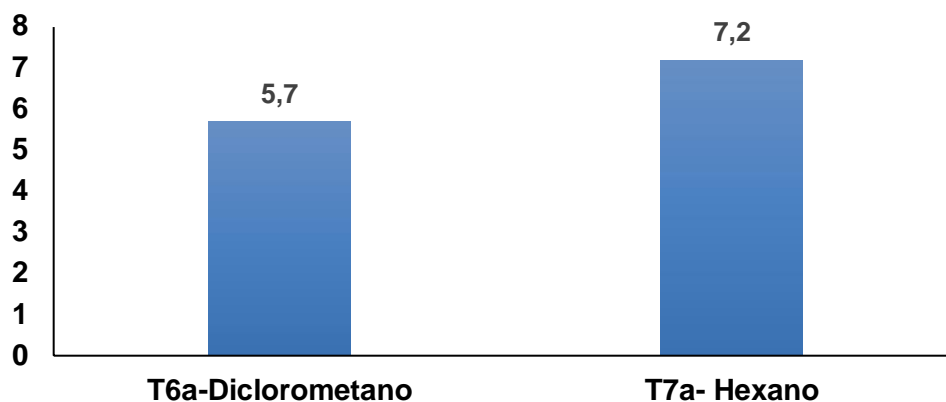


A técnica LLE apresentou bons resultados para a remoção de cafeína do extrato de café verde, porém não apresentou recuperações satisfatórias (valores entre 70 e 120%) para os compostos, impossibilitando seu uso como a técnica de limpeza do extrato de café verde.

Os testes T6a e T7a também foram avaliados quanto à remoção de coextrativos da matriz café verde através de testes gravimétricos (Figura 8). Uma maior quantidade de compostos coextraídos foi obtida nos testes empregando LLE, quando comparado com os testes empregando d-SPE, acarretando em uma menor limpeza do extrato e no menor número de compostos com recuperações satisfatórias dos testes de limpeza.



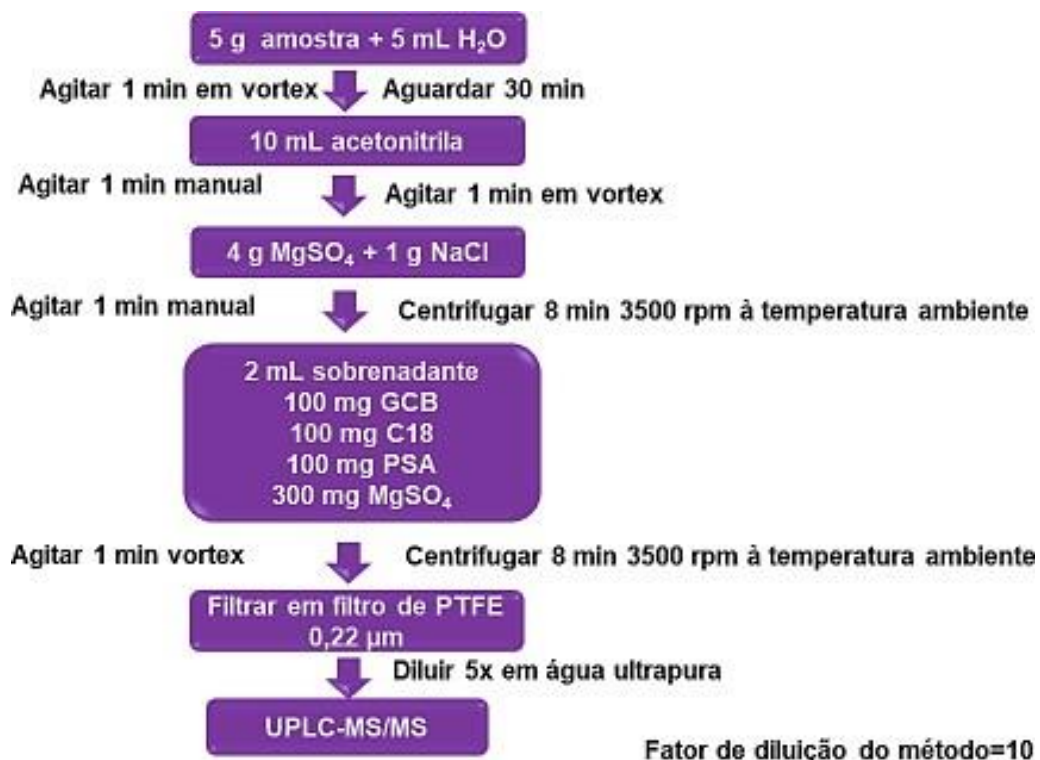
**Figura 8** – Gráfico da massa (mg) de coextrativos em relação aos testes T6a e T7a.



Dessa maneira, os sorventes GCB, PSA, C18 e  $\text{MgSO}_4$  foram os escolhidos para serem empregados na etapa de limpeza. Devido a maior recuperação dos compostos (31 compostos), com recuperação entre 70 e 120% e menor massa de coextrativos (5,1 mg) no extrato final se comparado aos demais testes.

### 4.2.3 Método de extração otimizado

**Figura 9** – Procedimento do método de extração validado.



O método de extração validado (Figura 9) consiste em hidratar 5 g de amostra com 5 mL de água ultrapura, agitação por 1 minuto em vortex e repouso por 30 minutos. Após esse tempo, são adicionados 10 mL de acetonitrila, seguida por agitação manual por 1 minuto. Os sais de extração QuEChERS original (4 g de MgSO<sub>4</sub> e 1 g de NaCl) são adicionados e novamente é realizada uma agitação manual por 1 minuto e posterior centrifugação (8 min, 3500 rpm à temperatura ambiente). Na etapa de limpeza, 2 mL de sobrenadante são adicionados a uma mistura de sorventes contendo 100 mg de GCB, 100 mg de C18, 100 mg de PSA e 300 mg MgSO<sub>4</sub>. Após agitação por 1 minuto em vortex e centrifugação (8 min, 3500 rpm à temperatura ambiente) são utilizados filtros de PTFE (diâmetro de 0,22 µm) para filtrar o extrato de café verde, que em seguida é diluído 5 vezes em água ultrapura antes da análise por UHPLC-MS/MS.

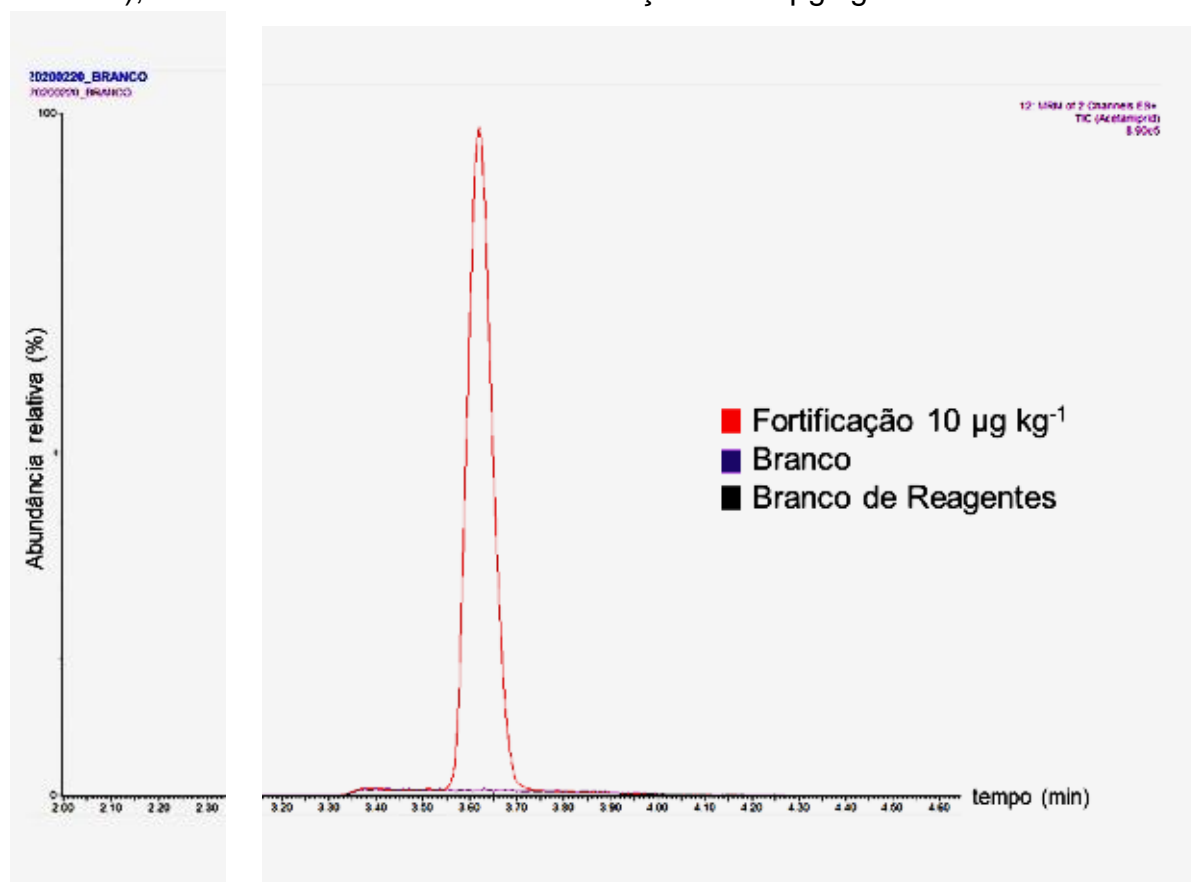
### 4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO

#### 4.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi assegurada por meio da comparação dos cromatogramas obtidos dos extratos de amostras “branco” da matriz café verde e o extrato de amostra “branco” de café verde fortificada. A partir desta avaliação foi possível verificar a ausência de interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos. A amostra “branco” de café verde aplicada ao estudo se encontrou sem a presença de agrotóxicos.

Na Figura 10 tem-se os cromatogramas do sistema UHPLC-MS/MS para a amostra “branco” de café verde, branco dos reagentes e da solução analítica com o composto representativo acetamiprido no extrato da matriz na concentração de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

**Figura 10** – Cromatograma de íon total obtido por UHPLC-MS/MS do composto acetamiprido, obtidos para o branco dos reagentes (em preto), “branco” da amostra café verde (em roxo) e solução analítica no extrato da matriz café verde (em vermelho), contendo os analitos na concentração de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ .



### 4.3.2 Curva analítica e linearidade

A linearidade de cada analito foi determinada através das injeções em triplicata das soluções analíticas preparadas em acetonitrila e nos extratos “branco” da matriz café verde, nas concentrações 0,5, 1, 2, 5, 10 e 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

A Tabela 10 apresenta os coeficientes de determinação ( $r^2$ ), para as curvas analíticas em solvente e na matriz “branco” de café verde, bem como a faixa linear para cada analito.

**Tabela 10** – Curvas analíticas no solvente e na matriz “branco” de café verde e coeficientes de determinação e valores de faixa linear.

Analitos	Faixa linear de trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Curva analítica	
		Solvente $r^2$	Matriz $r^2$
Acetamiprido	0,5-20	0,9981	0,9981
Atrazina	0,5-20	0,9977	0,9977
Azoxistrobina	0,5-20	0,9979	0,9979
Boscalida	0,5-20	0,9974	0,9974
Buprofezina	0,5-20	0,9974	0,9974
Carbaril	0,5-20	0,9980	0,9980
Carbofurano	0,5-20	0,9977	0,9977
Carboxim	0,5-20	0,9983	0,9983
Clorpirifós	0,5-20	0,9974	0,9974
Clorpirifós-metílico	0,5-20	0,9988	0,9988
Difenoconazol	0,5-20	0,9981	0,9981
Dimetoato	0,5-20	0,9988	0,9988
Epoxiconazol	0,5-20	0,9981	0,9981
Fluquiconazol	0,5-20	0,9970	0,9970
Malationa	0,5-20	0,9978	0,9978
Metalaxil	0,5-20	0,9974	0,9974
Metconazol	0,5-20	0,9985	0,9985
Miclobutanil	0,5-20	0,9983	0,9983
Pirimicarbe	0,5-20	0,9983	0,9983
Profenofós	0,5-20	0,9982	0,9982
Propargito	0,5-20	0,9989	0,9989
Propiconazol	0,5-20	0,9976	0,9976
Simazina	0,5-20	0,9981	0,9981
Tebuconazol	0,5-20	0,9972	0,9972
Tetraconazol	0,5-20	0,9986	0,9986
Tiacloprido	0,5-20	0,9976	0,9976
Tiodicarbe	0,5-20	0,9976	0,9976
Triadimefom	0,5-20	0,9981	0,9981
Triazofós	0,5-20	0,9964	0,9964
Trifloxistrobina	0,5-20	0,9978	0,9978
Vamidationa	0,5-20	0,9983	0,9983

Os valores de linearidade considerados adequados e satisfatórios, são aqueles no qual o valor do coeficiente de determinação seja igual ou maior que 0,99. Assim, os analitos que apresentaram os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) nesses valores, tiveram sua linearidade assegurada. Assim, este parâmetro está em conformidade com guias de validação de métodos do INMETRO e SANTE.

#### 4.3.3 Efeito matriz

A técnica UHPLC-MS/MS é uma poderosa ferramenta para identificação e quantificação de resíduos de agrotóxicos em matrizes complexas, devido a precisão, robustez, alta seletividade e sensibilidade. Todavia, ocorre a competição dos analitos e os componentes da amostra pela ionização. Esse fenômeno, conhecido como efeito matriz, resulta em um aumento ou diminuição do sinal analito, gerando interferências em relação a exatidão da quantificação (JIAO *et al.*, 2016). A Tabela 11 apresenta os resultados de efeito matriz do método proposto.

**Tabela 11**-Efeito matriz dos agrotóxicos estudados na matriz café verde determinados por UHPLC-MS/MS.

<b>Compostos</b>	<b>Efeito Matriz (%)</b>	<b>Compostos</b>	<b>Efeito Matriz (%)</b>
Acetamiprido	0	Metconazol	2
Atrazina	-5	Miclobutanil	3
Azoxistrobina	5	Pirimicarbe	4
Boscalida	4	Profenofós	3
Buprofezina	9	Propargito	91
Carbaril	-2	Propiconazol	8
Carbofurano	2	Simazina	-7
Carboxin	2	Tebuconazole	4
Chlorpirifós	36	Tetraconazole	3
Chlorpirifós-metilico	13	Tiacloprido	3
Difenoconazol	24	Tiodicarbe	11
Dimetoato	-3	Triadimefom	7
Epoxiconazol	6	Triazofós	7
Fluquiconazol	-5	Trifloxistrobina	6
Malationa	9	Vamidationa	1
Metalaxil	6		

A maioria dos compostos não apresentou efeito matriz, pois os valores de efeito matriz obtidos se encontraram na faixa entre -20 e +20%. Alguns compostos apresentaram efeito matriz médio (valores de efeito matriz na faixa entre  $\pm 50$  e 20%), como o clorpirifós (36%) e difenoconazole (24%), enquanto o propargito apresentou um efeito matriz de 91%, considerado um efeito matriz forte ( $\pm 50\%$ ) (FERRER *et al.*, 2011).

Para diminuir o efeito matriz e a quantidade de compostos da matriz injetada no equipamento e aumentar a resolução dos picos, os extratos foram diluídos 5 vezes em água ultrapura antes da análise cromatográfica.

#### **4.3.4 Exatidão (Ensaio de recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária)**

A exatidão e precisão do método foi avaliada por meio da injeção de três níveis de concentração em sete replicatas. A Tabela 12 apresenta os resultados das recuperações ( $n= 7$ ) percentuais e o RSD % para os 31 compostos fortificados na matriz café verde, nos níveis de fortificação de 10, 20 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , extraídos através do método QuEChERS modificado.

Para a determinação dos valores de recuperação, utilizaram-se curvas analíticas preparadas no extrato “branco” da matriz café verde.

A faixa de aceitação dos valores de recuperação seguiram o guia de validação de métodos da SANTE (2019), com valores entre 70 e 120%, com  $\text{RSD} \leq 20\%$ .

A precisão intermediária ( $\text{RSD}_{\text{pi}}$ ) para os agrotóxicos estudados foi avaliada em um dia diferente do qual foram realizados os estudos de repetitividade. A Tabela 12 também apresentado os valores de recuperação e precisão intermediária, nas concentrações de 10, 20 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para a matriz café verde.

**Tabela 12** - Recuperação e RSD dos agrotóxicos com o emprego do método QuEChERS proposto.

Compostos	Recuperação % (RSD %) para os 3 níveis de fortificação ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )*					
	Repetitividade			Precisão Intermediária		
	10	20	50	10	20	50
Acetamiprido	75 (7)	79 (5)	71 (7)	71 (5)	80 (6)	85 (3)
Atrazina	75 (5)	78 (3)	81 (4)	73 (6)	79 (7)	85 (3)
Azoxistrobina	76 (7)	84 (6)	86 (5)	81 (8)	83 (7)	88 (5)
Boscalida	61 (4)	75 (10)	79 (8)	68 (11)	72 (16)	81 (5)
Buprofezina	23 (12)	89 (3)	92 (2)	82 (5)	84 (47)	85 (3)
Carbaril	70 (9)	76 (7)	76 (4)	75 (9)	77 (6)	83 (4)
Carbofurano	78 (10)	83 (4)	80 (6)	77 (8)	83 (6)	92 (4)
Carboxim	73 (6)	72 (4)	70 (4)	71 (6)	74 (5)	73 (4)
Clorpirifós	-6 (32)	87 (14)	92 (7)	84 (15)	80 (63)	79 (7)
Clorpirifós-metílico	43 (19)	77 (16)	77(8)	88 (19)	57 (24)	84 (9)
Difenoconazol	53 (5)	77 (17)	76 (10)	85 (9)	74 (24)	77 (6)
Dimetoato	76 (6)	80 (4)	80 (6)	70 (4)	80 (3)	86 (5)
Epoxiconazol	70 (4)	79 (8)	82 (8)	74 (16)	71 (8)	88 (7)
Fluquiconazol	41 (20)	87 (18)	88 (9)	81 (9)	85 (13)	94 (9)
Malationa	82 (16)	88 (11)	92 (5)	80 (11)	90 (8)	93 (3)
Metalaxil	85 (8)	81 (5)	77 (9)	70 (9)	76 (8)	82 (6)
Metconazol	63 (16)	75 (17)	82 (7)	87 (16)	71 (19)	82 (6)
Miclobutanil	43 (15)	84 (13)	83 (8)	43 (8)	78 (15)	87 (7)
Pirimicarbe	80 (5)	74 (2)	73 (6)	74(5)	79 (5)	79 (5)
Profenofós	28 (14)	86 (5)	87 (12)	59 (6)	40 (23)	85 (4)
Propargito	3 (19)	92 (2)	96 (3)	82 (3)	81 (80)	80 (7)
Propiconazol	57 (8)	78 (10)	76 (7)	76 (5)	79 (8)	89 (3)
Simazina	78 (9)	75 (9)	81 (5)	59 (9)	76 (9)	85 (5)
Tebuconazol	74 (17)	70 (20)	81 (6)	111 (143)	73 (16)	83 (20)
Tetraconazol	71 (16)	82 (11)	90 (7)	86 (14)	90 (7)	93 (6)
Tiacloprido	62 (3)	75 (11)	80 (6)	69 (4)	71 (10)	85 (4)
Tiodicarbe	93 (20)	77 (15)	73 (20)	57 (18)	78 (20)	83 (8)
Triadimefom	71 (11)	80 (17)	84 (6)	76 (17)	83 (6)	89 (5)
Triazofós	71 (12)	87 (15)	93 (5)	79 (11)	84 (9)	91 (3)
Trifloxistrobina	38 (16)	95 (5)	90 (14)	101 (9)	65 (27)	93 (4)
Vamidationa	87 (8)	76 (4)	74 (8)	76 (11)	78 (5)	79 (4)

\* n= 7

A exatidão do método para a matriz café verde, em relação à repetibilidade, apresentou resultados satisfatórios (recuperações entre 70 e 120%, com  $RSD \leq 20\%$ ) na concentração de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  para os seguintes compostos: acetamiprido, atrazina, azoxistrobina, carbaril, carbofurano, carboxim, dimetoato, epoxiconazol, matationa, metalaxil, pirimicarbe, tetraconazol, triadimefom, triazofós e vamidationa.

No nível de concentração intermediário ( $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) os compostos boscalida, fluquiconazol, metconazol, miclobutanil, propargito, propiconazol, simazina, tebuconazol, tialprido e tiodicarbe apresentaram valores de recuperação entre 70 e 120% e  $RSD \leq 20\%$ .

E no maior nível de concentração, igual a  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ , os compostos buprofezina, clorpirifós, clorpirifós-metílico, difenoconazol, profenofós e trifloxistrobina apresentaram valores de recuperação entre 70 e 120% e  $RSD \leq 20\%$ .

Os valores de recuperação na avaliação da precisão intermediária variaram entre 70 e 120%, com  $RSD_{pi}$  menores que 20%, para todos os compostos.

#### **4.3.5 Determinação dos valores de LOD e LOQ do método e do instrumento**

Na tabela 13, estão dispostos os valores obtidos de LOD e LOQ do método para os analitos na matriz café verde.

Neste estudo, o LOQ se apresentou na faixa de  $0,01$  a  $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ , enquanto o LOD de  $0,003$  a  $0,015 \text{ mg kg}^{-1}$ . Com relação ao  $LOQ_i$ , os valores determinados foram de  $1$  a  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ , enquanto que para o  $LOD_i$  foram  $0,3$  a  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Estes valores de limites foram considerados satisfatórios, pelo fato de que estes atendem as concentrações dos valores máximos de resíduos permitidos (LMR) para os agrotóxicos em café verde estabelecidos pela legislação da EU e brasileira por meio da ANVISA, com exceção do composto profenofós e tiodicarbe que só atendem aos valores da legislação da EU.



**Tabela 13** - Valores de LOD e LOQ do método para os analitos validados no estudo.

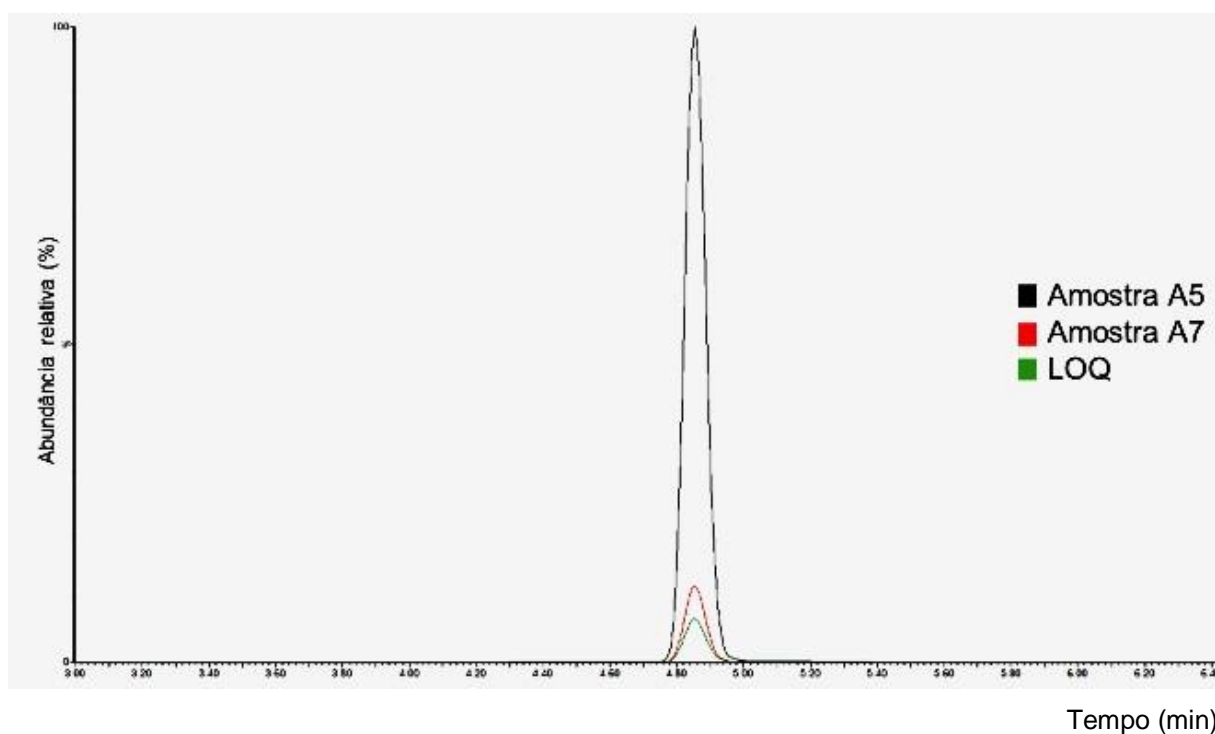
<b>Compostos</b>	<b>LOD (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>ANVISA (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>LMR EU (mg kg<sup>-1</sup>)</b>
Acetamiprido	0,003	0,01	0,2	0,05
Atrazina	0,003	0,01	-	0,1
Azoxistrobina	0,003	0,01	0,05	0,03
Boscalida	0,006	0,02	0,05	0,05
Buprofezina	0,015	0,05	-	0,05
Carbaril	0,003	0,01	-	0,05
Carbofurano	0,003	0,01	-	0,05
Carboxim	0,003	0,01	-	0,1
Clorpirifós	0,015	0,05	0,05	0,05
Clorpirifós-metílico	0,015	0,05	0,05	0,05
Difenoconazol	0,015	0,05	0,5	0,05
Dimetoato	0,003	0,01	-	0,05
Epoxiconazol	0,003	0,01	0,1	0,05
Fluquiconazol	0,006	0,02	0,07	0,05
Malationa	0,003	0,01	0,01	0,02
Metalaxil	0,003	0,01	-	0,05
Metconazol	0,006	0,02	0,2	0,1
Miclobutanil	0,006	0,02	0,1	0,05
Pirimicarbe	0,003	0,01	-	0,05
Profenofós	0,015	0,05	0,03	0,05
Propargito	0,015	0,05	0,3	0,05
Propiconazol	0,006	0,02	0,05	0,02
Simazina	0,006	0,02	0,02	0,05
Tebuconazol	0,015	0,05	0,2	0,1
Tetraconazol	0,003	0,01	0,08	0,02
Tiacloprido	0,006	0,02	-	0,05
Tiodicarbe	0,006	0,02	0,01	0,05
Triadimefom	0,003	0,01	0,1	0,05
Triazofós	0,003	0,01	0,01	0,02
Trifloxistrobina	0,015	0,05	0,05	0,05
Vamidationa	0,003	0,01	-	-

#### 4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método QuEChERS modificado proposto foi empregado na determinação de resíduos de agrotóxicos em 7 amostras de café verde. Foi adicionado o padrão de controle (atrazina deuterada) na concentração de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  à todas as amostras. Os resultados de exatidão e precisão se apresentaram dentro da faixa de aceitação de recuperação entre 70 e 120%, com  $\text{RSD} \leq 20\%$ .

Foram detectados resíduos de carbofurano em cinco amostras analisadas, ou seja, 71% das amostras analisadas apresentaram contaminação desse composto, que se encontra proibido no Brasil desde 2017 pela ANVISA, conforme publicado na Resolução RDC n° 185, de 18 de outubro de 2017. As concentrações de carbofurano encontradas nas amostras, foram de  $0,011$  a  $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$ . Das 7 amostras analisados somente uma apresentou contaminação de carbofurano maior que o valor de LMR estabelecido pela União Europeia. Na Figura 11, está representado o cromatograma de íon total obtido por UHPLC-MS/MS para carbofurano, para o LOQ, amostra A7 na concentração de  $0,016 \text{ mg kg}^{-1}$  e amostra A5 na concentração de  $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$ .

**Figura 11** – Cromatograma de íon total obtido por UHPLC-MS/MS do composto carbofurano obtidos para o LOQ (em verde), amostra A7 na concentração de  $0,016 \text{ mg kg}^{-1}$  (em vermelho) e amostra A5 na concentração de  $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$  (em preto).



A detecção de carbofurano nas amostras de café verde analisadas pode ser devido a aplicação de carbosulfano, que através de reações de hidroxilação e/ou oxidação forma o metabólito carbofurano (SOLER, *et al.*, 2007). Sendo também um composto não permitido para a cultura de café o carbosulfano têm seu uso permitido para outras culturas como algodão, milho e soja.

## 5 CONCLUSÃO

A técnica LLE se mostrou eficiente na remoção de cafeína do extrato de café verde, porém não foram obtidos resultados satisfatórios de recuperação (valores entre 70 e 120%) para os compostos avaliados.

O método QuEChERS original modificado e aplicado neste estudo mostrou-se eficaz para a determinação de 31 agrotóxicos em grão de café verde, onde o uso da combinação de sorventes PSA, C18, MgSO<sub>4</sub> e GCB se mostrou mais eficiente quanto ao maior número de compostos recuperados bem como na remoção de coextrativos.

A detecção dos analitos empregando o sistema UHPLC-MS/MS com fonte de ionização por eletronebulização (*electrospray*) no modo positivo, operando no modo SRM, apresentou resultados satisfatórios referente a detectabilidade, seletividade e precisão na etapa de validação do método para a matriz café verde.

O método foi avaliado em parâmetros como linearidade e faixa de trabalho, através da fortificação das curvas analíticas preparadas em extrato da matriz café verde. O efeito matriz, avaliado pela comparação das curvas analíticas preparadas na matriz café verde e no solvente acetonitrila, indicou a necessidade de validar e quantificar os dados utilizando a solução de compostos em matriz.

Através dos ensaios de fortificação nos três níveis de concentração, a exatidão do método foi avaliada, apresentando-se com recuperações dentro da faixa de 70 a 120%. A precisão do método apresentou resultados satisfatórios em termos de repetitividade, com RSD inferiores a 20% para os 31 compostos avaliados. Os valores de LOD do método foram de 0,003 a 0,015 mg kg<sup>-1</sup> e aos valores de LOQ do método foram de 0,01 a 0,05 mg kg<sup>-1</sup>. Assim, o método proposto, empregando QuEChERS modificado e UHPLC-MS/MS para a determinação de agrotóxicos em café verde mostrou-se rápido e adequado, podendo ser aplicado em análises de rotina.

## **6 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS**

Os resíduos produzidos durante o desenvolvimento deste trabalho foram armazenados em recipientes adequados e encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química (DQ) da UFSM. O DQ é responsável pela destinação dos resíduos gerados que serão posteriormente tratados por uma empresa terceirizada especializada nessa área.

## **7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- ✓ Ampliar o escopo de agrotóxicos a serem analisados na matriz café verde por UHPLC-MS/MS;
- ✓ Desenvolver um método de análise cromatográfica por GC-MS/MS para expandir o escopo para analitos não passíveis de análise por cromatografia líquida;
- ✓ Avaliar a eficiência de baixas temperaturas na remoção de coextrativos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC, 2019. Origem do Café. Disponível em:< <https://www.abic.com.br/o-cafe/historia/>>. Acesso em: 7 de jan. 2020.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 86, nº 2, p.412-431, 2003.

ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM, E.; TASDELEN, B.; STAJNBAHER, D. Crop protection, public health, environmental safety. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, p.439-458, 2007.

ANVISA, 2012. RESOLUÇÃO - RDC Nº 4, DE 18 DE JANEIRO DE 2012. Disponível em:<[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/res0004\\_18\\_01\\_2012.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/res0004_18_01_2012.html)>. Acesso em: 7 de jan. 2020.

ANVISA, 2019. ANVISA aprova novo marco regulatório para agrotóxicos. Disponível em:<[http://portal.anvisa.gov.br/noticias?p\\_p\\_id=101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU&p\\_p\\_col\\_id=column-2&p\\_p\\_col\\_pos=1&p\\_p\\_col\\_count=2&\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_groupId=219201&\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_urlTitle=anvisa-aprova-novo-marco-regulatorio-para-agrotoxicos&\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_struts\\_action=%2Fasset\\_publisher%2Fview\\_content&\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_assetEntryId=5568958&\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_type=content](http://portal.anvisa.gov.br/noticias?p_p_id=101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU&p_p_col_id=column-2&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_groupId=219201&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_urlTitle=anvisa-aprova-novo-marco-regulatorio-para-agrotoxicos&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_assetEntryId=5568958&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_type=content)>. Acesso em: 7 jan. 2020.

ANVISA, 2020a. Regularização de Produtos – Agrotóxicos. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/registro>>. Acesso em: 7 de jan. 2020.

ANVISA, 2020d. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>>. Acesso em: 8 jan. de 2020.

BARTH, T. CALIXTO, L. A.; JABOR, V. A. P.; BORGES, K. B. Extração líquido-líquido. *In*: BORGES, K. B. (org.); FIGUEIREDO, E. C. (org.); QUEIROZ, M. E. C. (org.). **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**, 1ª edição, LTC, 2015.

BORGES, K. B.; PEREIRA, A. C.; MANO, V. Introdução ao preparo de amostras. *In*: BORGES, K. B. (org.); FIGUEIREDO, E. C. (org.); QUEIROZ, M. E. C. (org.). **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**, 1ª edição, LTC, 2015.

BRASIL, 2002. Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/LEIS/L7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L7802.htm)>. Acesso em: 13 jan. 2020.

BRASIL, 2019. Diário Oficial da União, Resolução nº 2.080, 31 de julho 2019. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-re-n-2080-de-31-de-julho-de-2019-208203097>>. Acesso em: 7 jan. 2020.

BRESIN, B.; PIOL, M.; FABBRO, D.; MANCINI, M. A.; CASETTA, B.; DEL BIANCO, C. Analysis of organo-chlorine pesticides residue inn raw coffee with a modified “quick easy cheap effective rugged and safe” extraction/clean up procedure for reducing the impact of caffeine on the gas chromatography-mass spectrometry measurement. **Journal of Chromatography A**, v. 1376, p. 167-171, 2015.

CAJKA, T.; DRABOVA, V. B. L.; KALACHOVA, K.; PULKRABOVA, J.; HAJLSLOVA, J. Determination of Multi-Pesticide Residues in Dried Tea Samples using an Optimized Extraction/Cleanup Regime and the Agilent 7000 Series Triple Quadrupole GC/MS System. **AGILENT TECHNOLOGIES Application Note**.

CARVALHO, F. P. Pesticides, environment, and food safety. **Food ans Energy Security**, v. 6, nº 2, p. 48-60, 2017.

CeCafé, 2019.Sobre o café-Consumo. Disponível em: <<https://www.cecafe.com.br/sobre-o-cafe/consumo/>>. Acesso em: 7 de jan. 2020.

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**, nº 3, p. 623-636, 2008.

CHUNG, S. W. C.; CHAN B. T. P. Validation and use of a fast sample preparation method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in analysis of ultra-trace levels of 98 organophosphorus pesticide and carbamates residues in a total diet study involving diversified food types. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p. 4815-4824, 2010.

CONAB (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), 2019. Acomp. safra brasileira de café, v. 5– Safra 2019, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-44, dezembro 2019. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe> >. Acesso em: 06 jan. 2020.

CONAB (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), 2020. Acomp. safra brasileira de café, v. 6– Safra 2020, n. 1- Primeiro levantamento, Brasília, p. 1-62, janeiro 2020. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe> >. Acesso em: 23 jan. 2020.

Consórcio Pesquisa Café, 2019. Café arábica corresponde a 70% e café conilon a 30% da produção dos Cafés do Brasil em 2019. Disponível em: <<http://www.consorciopesquisacafe.com.br/index.php/imprensa/noticias/953-2019-10-03-18-59-35>> Acesso em: 30 de out. 2019.

DIAS, C. M.; OLIVEIRA, F. A.; MADUREIRA, F. D.; SILVA, G.; SOUZA, W. R.; CARDEAL, Z. L. Multi-residue method for the analysis of pesticides in Arabica coffee using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30, nº 7, p. 1308-1315, 2013.

DOMINGUES, P; GARCIA, A; SKRZYDLEWSKA, E; ŁUCZAJ, W; GĘGOTEK, A; BIELAWSKA, K; BARBAS, C; DUDZIK, D; REY-STOLLE, M; RUPÉREZ, F; MACIEL, E; ALVES, E; DOMINGUES, M. R; MELO, T; FERREIRA, R. (2018). AACLifeSci Course Companion Manual Advanced Analytical Chemistry for Life Sciences.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), 2019a. Países produtores de café consomem 30,5% e importadores 69,5% da produção mundial. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/47622770/paises-produtores-de-cafe-consomem-305-e-importadores-695-da-producao-mundial>>. Acesso em: 30 de out. 2019.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), 2019b. Safra mundial do ano-cafeeiro 2018-2019 atinge 174,5 milhões de sacas. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/46165397/safra-mundial-do-ano-cafeeiro-2018-2019-atinge-1745-milhoes-de-sacas>>. Acesso em: 30 de out. 2019.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), 2019c. Cafés do Brasil arrecadam US\$ 4,7 bilhões de receita cambial com exportação de 37,4 milhões de sacas de janeiro a novembro de 2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/48923105/cafes-do-brasil-arrecadam-us-47-bilhoes-de-receita-cambial-com->



exportacao-de-374-milhoes-de-sacas-de-janeiro-a-novembro-de-2019>. Acesso em 06 jan. 2020

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), 2020a. Consumo mundial de café em 2019 atinge 168 milhões de sacas. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/48512453/consumo-mundial-de-cafe-em-2019-atinge-168-milhoes-de-sacas>>. Acesso em: 06 jan. 2020.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), 2020b. Safra dos Cafés do Brasil atinge 49,31 milhões de sacas das quais 34,3 milhões da espécie arábica e 15,01 milhões de conilon em 2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/49047026/safra-dos-cafes-do-brasil-atinge-4931-milhoes-de-sacas-das-quais-343-milhoes-da-especie-arabica-e-1501-milhoes-de-conilon-em-2019>>. Acesso em: 06 jan. 2020

FAO, 2014. The Internacional Code of Conductor on Pesticide Management. Disponível em: <[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/Code/Code\\_ENG\\_2017updated.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/Code_ENG_2017updated.pdf)>. Acesso em: 8 jan. 2020.

FERRER, C.; LOZANO, A.; AGÜERA, A. GIRÓN, A. J.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**. v. 1218, p. 7634-7639, 2011.

GARCIA, F. P.; ASCENCIO, S. Y. C.; OYARZUN, J. C. G.; HERNANDEZ, A. C.; ALAVARADO, P. V. Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. **Journal of Research in Environmental Science and Toxicology**, v. 1, n ° 11, p. 279-293.

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

HACKBART, H. C. S.; SOUZA, M. M.; SCAGLIONI, P. T.; PRIMEL, E. G.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E.; Método QuEChERS para determinação de ocratoxina a e citrinina em arroz e farelo de arroz. **Química Nova**, v. 35, n° 9, 2012.

HARMOKO; KARTASASMITA, R. E.; TRESNAWATI, A. QuEChERS Method for the Determination of Pesticide Residues in Indonesian Green Coffee Beans using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Mathematical and Fundamental Sciences** , v. 47, nº 3, p. 296-308, 2015.

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.

HOU, X.; LEI, S.; GUO, L.; QIU, S. Optimization of a multi-residue method for 101 pesticides in green tea leaves using gas chromatography tandem mass spectrometry. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 401-407, 2016.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Orientação sobre validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008, rev. 07, 2018.

JIAO, W.; XIAO, Y.; QIAN, X.; TONG, M.; HU, Y.; HOU, R.; HUA, R.; Optimized combination of dilution and refined QuEChERS to overcome matrix effects of six types of tea for determination eight neonicotinoid insecticides by ultra performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 210, p. 26-34, 2016.

LAMBOT, C.; HERRERA, J. C.; BERTRAND, B.; SADEGHIAN, S.; BENAVIDES, P.; GAITA, A. Cultivating coffee quality-terroir and agro-ecosystem. *In*: FOLMER, B. (org.). **The Craft and Science of Coffee**, 1ª edição, Academic Press, 2016.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”?. **Scientia Chromatographica**, v. 1, nº 2, p. 35-61, 2009.

MEKONEN, S.; AMBELU, A.; SPANOGHE, P. Pesticide residue evaluation in major staple food items of ethiopia using the QuEChERS method: a case study from the Jima Zone. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, p. 1294-1302, 2014.

MERCK, 2020. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/dispersive-spe-tubes/supel-que-z-sep.html>>.

Acesso em: 31 jan. 2020.

OESTREICH-JANZEN, S. Chemistry of Coffee. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, 2019.

OKAMURA, Y. Multi-Residue Analysis of Pesticides in Green Tea Using Caffeine Removal Pretreatment. **Analytical & Measuring Instruments Division**, Application Note N° 2, 2012.

OLIVEIRA, L. A. B.; PACHECO, H. P.; SCHERER, R. Flutriafol and pyraclostrobin residues in Brazilian green coffees. **Food Chemistry**, v. 190, p. 60-63, 2016.

PINTEREST. Disponível em: <https://br.pinterest.com/pin/362962051188084025/?lp=true>. Acesso em: 24 jan. 2020.

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, 1620-1634, 2009.

QIN, Y.; CHEN L.; YANG, X.; TANG, Y.; LI, S.; LIU, C. Determination of 19 Representative Pesticides in Traditional Chinese Medicines by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Chromatographia**, v. 79, p. 875-884, 2016.

REICHERT, B.; KOK, A.; PIZZUTTI, I.R.; SCHOLTEN, J.; CARDOSO, C. D.; SPANJER, M. Simultaneous determination of 117 pesticides and 30 mycotoxins in raw coffee, without clean-up, by LC-ESI-MS/MS analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 1004, p. 40-50, 2018.

REVISAN, M. T. S.; OWEN, R. W.; CALATAYUD-VERNICH, PAU.; BREUER, A.; PICÓ, Y. Pesticide analysis in coffee leaves using a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe approach and liquid chromatography tandem mass spectrometry: Optimization of the clean-up step. **Journal of Chromatography A**, v. 1512, p. 98-106, 2017.

SABARWAL, A.; KUMAR, K.; SINGH, R. P. Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 63, p. 103-114, 2018.

SANTE, 2019. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document n° SANTE/12682/2019. SHAITO-SHIDA, S.; NEMOTO, S.; TESHIMA, R. Multiresidue determination of pesticides in tea by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 50, n° 11, p. 760-776, 2015.

SANZ-URIBE, J. R.; YUSIANTO, MENON, S. N.; PEÑUELA, A., OLIVEROS, C.; HUSSON, J.; BRANDO, C.; RODRIGUEZ, A. Postharvest processing- Revealing the green bean. *In*: FOLMER, B. (org.). **The Craft and Science of Coffee**, 1ª edição, Academic Press, 2016.

SCHENKER, S.; ROTHGEB, T. The toast- Creating the beans' signature. *In*: FOLMER, B. (org.). **The Craft and Science of Coffee**, 1ª edição, Academic Press, 2016.

SIGMA, 2020. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/dispersive-spe-tubes/supel-que-z-sep.html>>.

Acesso em: 31 jan. 2020.

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8ª Edição norte-americana. Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.

SOLER, C.; HAMILTON, B.; FUREY, A.; JAMES, K. J.; MAÑES, J.; PICÓ, Y. Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Analysis of Carbosulfan, Carbofuran, 3-Hydroxycarbofuran, and Other Metabolites in Food. **American Chemical Society**, v.79, nº 4, p. 1277-1763, 2007.

SOUZA, N. R. S.; NAVICKIENE, S. Multiresidue determination of carbamate, organophosphate, neonicotinoid, and triazole pesticides in roasted coffee using ultrasonic solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 102, nº 1, 2019.

STEINIGER, D.; LU, G.; BUTLER, J.; PHILLIPS, E.; FINTSCHENKO, Y.; Multi-residue Pesticide Analysis in Green Tea by a Modified QuEChERS Extraction and Ion Trap GC/MS<sup>n</sup> Analysis. Thermo Fisher Scientific, Technical Note: 10295, 2009.

TSIPI, D.; BOTITSI, H.; ECONOMOU, A. Pesticide chemistry and risk assessment. Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticide Residues and Their Metabolites, 1ª edição, John Wiley & Sons, 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA. **Estrutura de monografias, dissertações e teses**: MDT. 8. ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2012.

VESSECCHI, R.; LOPES, N. P.; GOZZO, F. C.; DÖRR, F. A.; MURGU, M.; LEBRE, D. T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O. V.; RIVEROS, J. M.; Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, n°10, v. 34, p. 1875-1887, 2011.

WANG, J.; CHOW, W.; LEUNG, D. Applications of LC/ESI-MS/MS and UHPLC/Qq-TOF-MS for the Determination of 142 Pesticides in Tea. **Journal of AOAC Internacional**, v. 94, n° 6, 2011.

YANG, X.; WANG, J.; XU, D. C.; QIU, J. W.; MA, Y.; CUI, J. Simultaneous Determination of 69 Pesticide Residues in Coffee by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 4, p. 186-195, 2011.

ZAINUDIN, B. H.; SALLEH, S.; MOHAMED, R.; YAP, K. C.; MUHAMAD, H. Development, validation and determination of multiclass pesticide residues in cocoa beans using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 172, p. 585-595, 2015.

ZANELLA, R. PRESTES, O. D. ADAIME, M. B.; MARTINS, M. L. QuEChERS. *In*: BORGES, K. B. (org.); FIGUEIREDO, E. C. (org.); QUEIROZ, M. E. C. (org.). **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**, 1ª edição, LTC, 2015.