

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

Fabiane Marconato Stringhini

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM
TOMATE, BETERRABA E CENOURA EMPREGANDO QuEChERS
MODIFICADO E UHPLC-MS/MS**

Santa Maria, RS
2020

Fabiane Marconato Stringhini

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM
TOMATE, BETERRABA E CENOURA EMPREGANDO QuEChERS
MODIFICADO E UHPLC-MS/MS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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 obtenção do título de **Doutora em Ciências**.

Orientadora: Profa. Dra. Martha Adaime

Santa Maria, RS
2020

Stringhini, Fabiane
Determinação multirresíduo de agrotóxicos em tomate,
beterraba e cenoura empregando QuEChERS modificado e
UHPLC-MS/MS / Fabiane Stringhini.- 2020.
113 p.; 30 cm

Orientadora: Martha Adaime
Coorientador: Renato Zanella
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2020

1. Resíduo de agrotóxicos 2. Hortaliças 3. Preparo de
amostra 4. QuEChERS 5. Cromatografia I. Adaime, Martha
II. Zanella, Renato III. Título.

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

Declaro, FABIANE STRINGHINI, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas.

Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Fabiane Marconato Stringhini

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM
TOMATE, BETERRABA E CENOURA EMPREGANDO QuEChERS
MODIFICADO E UHPLC-MS/MS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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 obtenção do título de **Doutora em Ciências**.

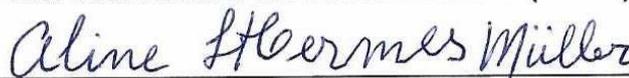
Aprovado em 17 de abril de 2020:



Prof. Dra. Martha Bohrer Adaime (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



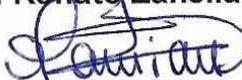
Prof. Dra. Lizíara da Costa Cabrera (UFFS)



Dra. Aline Lima Hermes Müller (UFSM)



Prof. Dr. Renato Zanella (UFSM)



Prof. Dr. Osmar Damian Prestes (UFSM)

Santa Maria, RS
2020

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar nas escolhas dos melhores caminhos, me dar saúde e força para superar as dificuldades e proteção para me amparar.

Aos meus pais, Amauri e Viviane, e meu irmão Rômulo, pelo amor, incentivo e apoio incondicional, pela total ajuda na superação dos obstáculos que surgiram ao longo desta caminhada, que apostaram em mim mais do que ninguém e que seguramente são os que mais compartilham da minha alegria.

A minha filha Eduarda, agradeço pela espontaneidade, carinho e amor incondicional que sempre me estimularam nos momentos difíceis. É minha fonte de inspiração e quem me dá forças para seguir em frente todos os dias.

Ao professor Dr. Renato Zanella e a professora Dra. Martha Adaime pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho, pela orientação, confiança e conhecimento transmitido.

A todos os colegas do LARP que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À extinta CIENTEC, que motivou e proporcionou o início desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria, seus professores e funcionários.

RESUMO

DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM TOMATE, BETERRABA E CENOURA EMPREGANDO QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS

AUTOR: Fabiane Marconato Stringhini
ORIENTADORA: Prof. Dra. Martha Bohrer Adaime

Beterraba, cenoura e tomate são alimentos com grande teor de água, açúcares e pigmentos, que estão entre as hortaliças mais cultivadas e consumidas no mundo todo e frequentemente apresentam resíduos de agrotóxicos em suas análises. Por isso, um método multirresíduo simples foi desenvolvido e validado para a determinação de 129 agrotóxicos e metabólitos em amostras de beterraba, cenoura e tomate, utilizando o método QuEChERS acetato modificado sem a etapa de limpeza para o preparo de amostras e posterior determinação por cromatografia líquida de ultra-alta performance acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS). Foram testados diferentes sorventes e combinações de sorventes para a etapa de limpeza, além de teste gravimétrico e de evaporação do solvente. Entretanto, visando um método mais rápido e barato, optou-se por eliminar a etapa de limpeza do extrato. A diluição dos extratos brutos em diferentes proporções de fase móvel foi avaliada e a diluição de 10 vezes apresentou resultados adequados, melhorando o desempenho da análise e minimizando o efeito matriz. A validação foi realizada de acordo com o guia da SANTE, apresentando resultados satisfatórios. O limite de quantificação foi de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a maioria dos compostos. Recuperações entre 70 e 120% com precisão $\leq 20\%$ foram encontradas para a maioria dos compostos e níveis de fortificação avaliados. Os resultados de efeito matriz para a matriz tomate não foram significativos para a maioria dos compostos. O método demonstrou ser simples, robusto e eficiente para ser aplicado em análises de rotina em laboratórios. A aplicabilidade do método foi determinada pela análise de amostras comercializadas no Brasil e resultados positivos foram encontrados, demonstrando a importância do método proposto.

Palavras-chave: resíduo de agrotóxicos, hortaliças, preparo de amostra, QuEChERS, cromatografia

ABSTRACT

PESTICIDES MULTIRESIDUE DETERMINATION IN TOMATO, BEET AND CARROT USING MODIFIED QuEChERS AND UHPLC-MS/MS

AUTHOR: Fabiane Marconato Stringhini
ADVISOR: Prof. Dra. Martha Bohrer Adaime

Beet, carrot and tomato are foods with a high content of water, sugars and pigments, which are among the most cultivated and consumed vegetables worldwide and frequently contain pesticide residues. Therefore, a simple multiresidue method was developed and validated to determine 129 pesticides and metabolites in beet, carrot and tomato samples using a modified acetate QuEChERS without clean-up for sample preparation and determination by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Different sorbents and sorbent combinations were tested for the clean-up step, in addition to gravimetric and solvent evaporation tests. However, aiming a faster and cheaper method, it was decided to eliminate the clean-up step. Dilution of the raw extract in different proportions of mobile phase was evaluated and a dilution of 10 times presented adequate results improving analysis performance while minimizing the matrix effect. Validation performed according to SANTE guideline presented satisfactory results. Practical method limit of quantification was $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ for most compounds. Recoveries between 70 and 120% with precision $\leq 20\%$ were found for most compounds and spike levels evaluated. Matrix effect results for tomato were not significant for most compounds. Method proved to be simple, robust and effective to be applied in routine analysis. Method applicability was performed by analysis of samples commercialized in Brazil and positive results were found demonstrating the importance of the proposed method.

Keywords: pesticide residues, vegetables, sample preparation, QuEChERS, chromatography

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do licopeno (A), do β -caroteno (B), dos flavonoides (C) e dos derivados do ácido cinâmico e do ácido benzóico (D), respectivamente.....	19
Figura 2 – Estrutura química geral da betalaína. (A) Ácido betalâmico presente em toda molécula de betalaína. (B) Esta estrutura poderá representar tanto a betacianina quanto a betaxantina, dependendo da identidade dos radicais 1 e 2. Nas betacianinas, R= glicose ou ácido glucurônico. As betaxantinas possuem um anel dihidropirínico.....	22
Figura 3 – Emprego de defensivos agrícolas por hectare (US\$/ha).....	26
Figura 4 – Defensivos agrícolas empregados por cultura em 2017, em US\$.	27
Figura 5 – Gráfico de vendas de agrotóxicos nas principais culturas em 2015, à esquerda, e gráfico de vendas de agrotóxicos nos principais estados do Brasil em 2015, à direita.....	28
Figura 6 – Percentual das classes de defensivos empregados em 2017.....	28
Figura 7 – Principais rotas de transporte e degradação de agrotóxicos no ambiente.	30
Figura 8 – Figura esquemática dos principais componentes de um espectrômetro de massas.....	39
Figura 9 – Estrutura do sorvente PSA.....	43
Figura 10 – Estrutura química do sorvente carbono grafitizado GCB.	43
Figura 11 – Fluxograma do preparo de amostra utilizado para os ensaios do planejamento composto central (Tabela 9).	59
Figura 12 – Cromatograma de íons totais do mix de padrões na matriz branco de tomate na concentração de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	62
Figura 13 – Fluxograma das três variações do método QuEChERS: original, citrato e acetato, respectivamente.	63
Figura 14 – Gráfico do número de compostos por faixa de recuperação para a matriz beterraba pelo método QuEChERS acetato, original e citrato.	69
Figura 15 – Gráfico do número de compostos por faixa de recuperação para a matriz cenoura pelo método QuEChERS acetato, original e citrato.....	69
Figura 16 – Gráfico do número de compostos por faixa de recuperação para a matriz tomate pelo método QuEChERS acetato, original e citrato.....	69
Figura 17 – Extratos das amostras de tomate (T), beterraba (B) e cenoura (C), sem etapa de limpeza.	72
Figura 18 – Extratos de beterraba após etapa de limpeza com os sorventes: quitosana (1); Strata-X (2); PSA (3); PSA + C18 (4); PSA + florisil não ativado (5); PSA + florisil ativado (6); PSA + GCB (7) e PSA + C18 + GCB (8).....	72
Figura 19 – Extratos de cenoura após etapa de limpeza com os sorventes: quitosana (1); Strata-X (2); PSA (3); PSA + C18 (4); PSA + florisil não ativado (5); PSA + florisil ativado (6); PSA + GCB (7); PSA + C18 + GCB (8).	73
Figura 20 – Extratos de tomate após etapa de limpeza com os sorventes: quitosana (1); Strata-X (2); PSA (3); PSA + C18 (4); PSA + florisil não ativado (5); PSA + florisil ativado (6); PSA + GCB (7); PSA + C18 + GCB (8).	73
Figura 21 – Gráfico do número de compostos por faixa de recuperação (%) para a matriz cenoura.....	74
Figura 22 – Gráfico do número de compostos por faixa de recuperação (%) para a matriz tomate.....	74
Figura 23 – Extratos de tomate após etapa de limpeza e centrifugação para os ensaios da Tabela 7.	75

Figura 24 – Extratos de tomate após etapa de filtração para os ensaios da Tabela 7.	75
Figura 25 – Extratos de cenoura após etapa de limpeza e centrifugação para os ensaios da Tabela 7.	76
Figura 26 – Extratos de cenoura após etapa de filtração para os ensaios da Tabela 7.	76
Figura 27 – Gráfico de Pareto (A) e superfície de resposta (B) resultantes do planejamento composto central para o composto carbendazim.	77
Figura 28 – Extratos de beterraba após etapa de limpeza com os sorventes: celite (9); GCB (10); C18 (11); fase fluorada (12).	78
Figura 29 – Extratos de cenoura após etapa de limpeza com os sorventes: celite (9); GCB (10); C18 (11); fase fluorada (12).	78
Figura 30 – Extratos de tomate após etapa de limpeza com os sorventes: celite (9); GCB (10); C18 (11); fase fluorada (12).	78
Figura 31 – Gráfico do número de compostos por faixa de recuperação (%) para as três matrizes, utilizando celite como sorvente.	79
Figura 32 – Gráfico do número de compostos por faixa de recuperação (%) para as três matrizes, utilizando GCB como sorvente.	80
Figura 33 – Gráfico do número de compostos por faixa de recuperação (%) para as três matrizes, utilizando C18 como sorvente.	80
Figura 34 – Gráfico do número de compostos por faixa de recuperação (%) para as três matrizes, utilizando fase fluorada como sorvente.	80
Figura 35 – Resíduo do teste de evaporação utilizando apenas GCB na etapa de limpeza para as matrizes tomate (T), beterraba (B) e cenoura (C).	81
Figura 36 – Resíduo do teste de evaporação utilizando mistura de PSA e GCB na etapa de limpeza para as matrizes tomate (T), beterraba (B) e cenoura (C).	81
Figura 37 – Resíduo do teste de evaporação sem realizar a etapa de limpeza para as matrizes tomate (T), beterraba (B) e cenoura (C).	82
Figura 38 – Gráfico do efeito matriz para a diluição de 10x (concentração final: 1 µg L ⁻¹); 5x (concentração final: 2 µg L ⁻¹); 3,3x (concentração final: 3 µg L ⁻¹) e 2x (concentração final: 5 µg L ⁻¹).	83
Figura 39 – Fluxograma do preparo de amostra utilizando o método QuEChERS modificado otimizado.	84
Figura 40 – Comparação dos cromatogramas obtidos do branco de amostra, do reagente branco, e da amostra de tomate fortificada com 10 µg kg ⁻¹ para o composto flutolanil.	85
Figura 41 – Cromatograma comparando o sinal do branco de solvente e reagentes (linha preta), da amostra branco de tomate fortificada com piraclostrobina a 0,01 mg kg ⁻¹ (linha roxa) e de uma amostra de tomate (linha verde) contendo 0,238 mg kg ⁻¹ de piraclostrobina.	100
Figura 42 – Cromatograma comparando o sinal do branco de solvente e reagentes (linha preta), da amostra branco de beterraba fortificada com piraclostrobina a 0,04 mg kg ⁻¹ (linha vermelha) e de uma amostra de beterraba (linha roxa) contendo 0,012 mg kg ⁻¹ de piraclostrobina.	101
Figura 43 – Cromatograma comparando o sinal do branco de solvente e reagentes (linha roxa), da amostra branco de cenoura fortificada com difenoconazol a 0,04 mg kg ⁻¹ (linha vermelha) e de uma amostra de cenoura (linha preta) contendo difenoconazol em concentração <0,01 mg kg ⁻¹	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição centesimal das matrizes cruas.	17
Tabela 2 – Classes toxicológicas dos agrotóxicos.	25
Tabela 3 – Os dez ingredientes ativos mais vendidos em 2018.....	29
Tabela 4 – Resultados do PARA Ciclo 2017-2018 para as matrizes tomate, cenoura e beterraba.....	32
Tabela 5 – Resultados do PNCRC/Vegetal 2º semestre 2015, ano 2016, ano 2017 e ano 2018.	33
Tabela 6 – Agrotóxicos determinados em tomate, cenoura e beterraba e seus LMRs.	34
Tabela 7 – Relação dos compostos avaliados, com informações sobre a classe, grupo químico, fórmula molecular.	52
Tabela 8 – Gradiente da fase móvel utilizada para determinação de agrotóxicos em beterraba, cenoura e tomate no sistema UHPLC-MS/MS.....	56
Tabela 9 – Planejamento composto central para verificação do efeito dos sorventes na etapa de limpeza do extrato.	58
Tabela 10 – Recuperação dos compostos analisados pelos métodos QuEChERS Acetato, Original e Citrato para as matrizes tomate, beterraba e cenoura.	64
Tabela 11 – Teste gravimétrico sem a etapa de limpeza e com a etapa de limpeza, respectivamente.	70
Tabela 12 – Resultados dos cálculos de % de coextrativos.....	71
Tabela 13 – Médias de recuperação dos compostos para as matrizes cenoura e tomate utilizando as combinações de sorventes PSA+C18, PSA+GCB e PSA+C18+GCB.....	74
Tabela 14 – Número de compostos por faixa de recuperação de cada sorvente para as matrizes beterraba, cenoura e tomate.....	79
Tabela 15 – Resultados de validação do método QuEChERS modificado sem etapa de limpeza com tempo de retenção (t_R), íons precursores e íons produto, energia de colisão, linearidade (coeficiente de determinação, r^2), efeito matriz (%), limite de quantificação (LOQ), limite de determinação (LOD), exatidão (recuperação, %) e precisão (RSD, %) para matriz tomate.....	88
Tabela 16 – Resultados de validação para o método QuEChERS modificado sem etapa de limpeza para as matrizes beterraba e cenoura: linearidade (r^2), efeito matriz (%), exatidão (em termos de recuperação).	94
Tabela 17 – Resultados das análises em amostras reais de tomate, beterraba e cenoura.	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API	Ionização a Pressão Atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Ionization</i>
C ₁₈	Sorvente octadecilsilano
CCPR	Comitê de Resíduos de Agrotóxicos do Codex Alimentarius, do inglês <i>Codex Committee on Pesticide Residues</i>
CV	Coeficiente de Variação
DL ₅₀	Dose Média Letal
DPR	Desvio Padrão Relativo
d-SPE	Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês <i>Dispersie Solid Phase Extraction</i>
ESI (+)	Ionização por Eletronebulização no modo positivo, do inglês <i>Electrospray Ionization in positive mode</i>
ESI (-)	Ionização por Eletronebulização no modo negativo, do inglês <i>Electrospray Ionization in negative mode</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GCB	Carbono Grafitizado, do inglês <i>Graphitized Carbon Black</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LARP	Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas
LC	Cromatografia Líquida, do inglês <i>Liquid Chromatography</i>
LMR	Limite Máximo de Resíduo
LOD	Limite de Detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>
LOQ	Limite de Quantificação, do inglês <i>Limit of Quantification</i>
MAE	Extração Assistida por Micro-ondas, do inglês <i>Microwave Assisted Extraction</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MIP	Polímeros Impressos Molecularmente, do inglês <i>Molecularly Imprinted Polymers</i>
MS/MS	Espectrometria de Massas em série, do inglês <i>tandem Mass Spectrometry</i>
MSPD	Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês <i>Matrix Solid Phase Dispersion</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARA	Programa de Análise de Resíduos em Alimentos
PCC	Planejamento Composto Central
pH	Potencial hidrogeniônico
PLE	Extração Acelerada por Solventes, do inglês <i>Pressurized Liquid Extraction</i>
PNCR	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PSA	Amina Primária e Secundária, do inglês <i>Primary Secondary Amine</i>
QuEChERS	Rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto, seguro, do inglês quick, easy, cheap, effective, rugged, safe
RSD	Desvio padrão Relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
SBSE	Extração Sortiva em Barra Magnética, do inglês <i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>
SFE	Extração por Fluido Supercrítico, do inglês <i>Supercritical Fluid Extraction</i>
SPE	Extração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>
SPME	Microextração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Micro-Extraction</i>
SRM	Monitoramento de Reações Seleccionadas, do inglês <i>Selected Reaction Monitoring</i>
UHPLC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês <i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 AS MATRIZES	17
2.1.1 Tomate	17
2.1.2 Cenoura.....	20
2.1.3 Beterraba.....	21
2.2 AGROTÓXICOS.....	23
2.2.1 O consumo de agrotóxicos no Brasil.....	25
2.2.2 Problemas relacionados aos agrotóxicos	29
2.2.3 Programas de monitoramento	31
2.3 DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS ...	36
2.3.1 Técnicas cromatográficas para determinação de resíduos de agrotóxicos	36
2.3.2 Preparo de amostras para determinação multirresíduo de agrotóxicos	39
2.3.2.1 Método QuEChERS	41
2.3.2.2 Método QuEChERS sem etapa de limpeza	44
2.4 OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS	45
2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS.....	45
2.5.1 Seletividade.....	46
2.5.2 Efeito matriz	46
2.5.3 Linearidade e curva analítica.....	46
2.5.4 Precisão	47
2.5.5 Exatidão	48
2.5.6 Limites de detecção e de quantificação.....	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	49
3.2 MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES	50
3.3 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA.....	51
3.4 PREPARO DA SOLUÇÃO DE CONTROLE.....	51
3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS.....	51
3.6 SISTEMA CROMATOGRÁFICO UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM TOMATE, BETERRABA, CENOURA	55

3.6.1 Fase móvel.....	56
3.6.2 Condições utilizadas no sistema UHPLC-MS/MS	56
3.7 PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM TOMATE, BETERRABA E CENOURA	57
3.8 PLANEJAMENTO FATORIAL	58
3.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	59
3.10 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS.....	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1 SISTEMA CROMATOGRÁFICO UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM TOMATE, BETERRABA E CENOURA.....	61
4.2 OTIMIZAÇÃO DA ETAPA DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM TOMATE, BETERRABA E CENOURA.....	62
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO SEM ETAPA DE LIMPEZA.....	84
4.3.1 Seletividade.....	85
4.3.2 Linearidade.....	86
4.3.3 Efeito matriz	86
4.3.4 Exatidão e precisão	86
4.3.5 Limite de quantificação.....	87
4.4 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS COMERCIAIS.....	97
5 CONCLUSÕES	102
6 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS.....	103
7 PROPOSTAS FUTURAS DA TESE	104
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, diversos tipos de contaminantes orgânicos podem estar presentes em amostras de alimentos. Na produção agrícola, os agrotóxicos apresentam benefícios econômicos, uma vez que são utilizados para o controle de pragas e doenças que afetam as lavouras, garantindo a qualidade da produção. Porém, quando usados de forma irregular e indiscriminada, eles também são responsáveis pela contaminação dos mananciais de água, do solo e dos alimentos, colocando em risco a saúde humana, além da sua persistência no meio ambiente e tendências de bioacumulação (ZANELLA *et al.*, 2015; PRESTES *et al.*, 2009).

Com relação aos danos causados ao homem, podemos citar: problemas neurológicos (EATON *et al.*, 2008), reprodutivos (DAHAMNA *et al.*, 2010), desregulação hormonal (KJAERSTAD *et al.*, 2010; KOIFMAN e HATAGIMA, 2003), malformações congênitas (KOCMAN e TOPAKTAS, 2009), danos ao sistema nervoso central, respiratório, cardiovascular, além de reações alérgicas (SILVA *et al.* 2005), distúrbios neurocomportamentais (WOLANSKY e HARRILL, 2008; ALAVANJA *et al.*, 2004), alterações neuromotoras (WOLANSKY *et al.*, 2006) e até alguns tipos de câncer (JOBIM *et al.*, 2010; ALAVANJA *et al.*, 2004; RAKITSKY *et al.*, 2000).

Por isso, há a necessidade de prevenir e controlar os possíveis efeitos danosos à saúde humana e ao meio ambiente. Uma das formas de minimizar esses riscos, é monitorando os resíduos de agrotóxicos nos alimentos, o que torna a sua determinação extremamente importante. Para esta análise, faz-se necessário uma etapa prévia de preparo de amostra, uma vez que as concentrações dos analitos são geralmente muito baixas, os compostos apresentam propriedades químicas distintas, além da complexidade das matrizes (PRESTES *et al.*, 2009).

Geralmente, essa complexidade da composição dos alimentos associada ao fato de que as medidas normalmente são feitas em baixos níveis de concentração, ocasiona dificuldades para a quantificação dos resíduos e contaminantes, sendo necessária a realização de uma etapa de limpeza (*clean-up*) do extrato, após extração com solvente. Essa etapa é fundamental, pois reduz as interferências e o efeito matriz, além de diminuir a necessidade de manutenção do sistema cromatográfico (CABRERA *et al.*, 2012).

Atualmente, o método QuEChERS (do inglês **quick, easy, cheap, effective, rugged, safe**) e suas modificações são aplicadas para uma grande variedade de matrizes e para vários compostos, apresentado por seus autores como sendo um método rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. Vários sorventes e combinações de sorventes podem ser utilizados, dependendo do tipo de matriz, técnica cromatográfica e dos tipos de compostos analisados (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

A extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid phase extraction*) desenvolvida simultaneamente com o método QuEChERS, proporciona um extrato final com menor quantidade de interferentes. Quando comparada com técnicas tradicionais, como a SPE, a d-SPE apresenta maior praticidade e um menor custo, utiliza uma menor quantidade de sorvente e solventes, além de não haver a necessidade de trabalhar com cartuchos (CABRERA *et al.*, 2012; PRESTES *et al.*, 2009).

Por outro lado, em alguns casos, a etapa de limpeza pode diminuir a recuperação dos analitos, pois eles podem ficar retidos no material sorvente ou ser eliminados junto com os interferentes (CABRERA, 2012). Métodos que utilizam apenas uma etapa de extração com solventes (acetonitrila/água ou metanol/água, por exemplo), dispensando a etapa de limpeza do extrato, também têm sido relatados de forma promissora, além de serem mais rápidos e terem um menor custo com reagentes (SILVA *et al.*, 2019; GEBREHIWOT *et al.*, 2019).

A identificação dos agrotóxicos em alimentos requer técnicas sensíveis e seletivas, devido aos compostos interferentes da matriz, que muitas vezes acabam mascarando o sinal do analito. Por isso, a cromatografia líquida de ultra-alta resolução com detecção de espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS) tem sido a técnica mais utilizada para análises multirresíduo de agrotóxicos. A combinação entre a aplicabilidade da cromatografia líquida aliada à grande capacidade de detecção dos analisadores de massas possibilitou o desenvolvimento de métodos que possuem maior seletividade, sensibilidade e especificidade em um menor tempo de corrida cromatográfica. (CALDAS *et al.*, 2011; KEMMERICH *et al.*, 2015; MAY *et al.*, 2017).

Assim, o desenvolvimento de métodos para determinação multirresíduo de agrotóxicos em produtos como frutas, vegetais e cereais é de extrema importância, uma vez que frequentemente são detectados, nas análises de laboratório, resíduos

destes compostos nestes alimentos. Algumas dificuldades como a diferença das propriedades químicas destes compostos e a variedade de matrizes, devem ser superadas no desenvolvimento desses métodos, pois além de serem bastante laboriosos e exigirem tempo, também tem a questão do elevado custo com materiais e a geração de grandes quantidades de resíduos tóxicos.

Dessa forma, o objetivo geral desta tese é desenvolver e validar um método para determinação multirresíduo de 129 agrotóxicos em tomate, beterraba e cenoura, empregando o método QuEChERS e UHPLC-MS/MS, além de aplicar o método proposto em amostras reais.

Os objetivos específicos são:

- a) avaliar qual a melhor variação do método QuEChERS para extração dos analitos de interesse;
- b) avaliar quais as melhores condições para o método de extração selecionado, utilizando diferentes sorventes e combinações de sorventes, visando a limpeza dos extratos e redução de coextrativos;
- c) ampliar o escopo de compostos, considerando as substâncias permitidas e as proibidas, de forma a contemplar as legislações vigentes;
- d) validar o método desenvolvido, para determinação de resíduos de agrotóxicos e metabólitos em tomate empregando UHPLC-MS/MS, avaliando os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, efeito matriz, exatidão, precisão e limites de quantificação e detecção;
- e) estender o escopo do método para as matrizes beterraba e cenoura;
- f) demonstrar a aplicabilidade do método validado para determinação de resíduos de agrotóxicos e metabólitos em amostras de tomate, beterraba e cenoura.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AS MATRIZES

As matrizes escolhidas para o presente estudo foram beterraba, cenoura e tomate, por se tratarem de matrizes complexas, com elevado teor de pigmentos, além de grande quantidade de água e açúcares, como pode ser visto na Tabela 1 da composição centesimal destes alimentos.

Os pigmentos são os principais interferentes provenientes destas matrizes que dificultam a identificação dos analitos nas análises cromatográficas.

Tabela 1 – Composição centesimal das matrizes cruas.

	<i>Umidade (%)</i>	<i>Energia (kcal)</i>	<i>Proteína (g)</i>	<i>Lipídeos (g)</i>	<i>Carboidrato (g)</i>	<i>Fibra Alimentar (g)</i>	<i>Cinzas (g)</i>	<i>Vitamina C (mg)</i>
Beterraba	86	49	1,9	0,1	11,1	3,4	0,9	3,1
Cenoura	90,1	34	1,3	0,2	7,7	3,2	0,9	5,1
Tomate	95,1	15	1,1	0,2	3,1	1,2	0,5	21,1

Fonte: (TACO, 2011).

2.1.1 Tomate

O tomate (*Solanum lycopersicum*; *Lycopersicon esculentum* ou *Lycopersicon lycopersicum*) pertence à família das Solanáceas e corresponde a um dos vegetais mais amplamente cultivados no mundo (MELO *et al*, 2012).

As espécies de tomate selvagem são nativas da América do Sul ocidental, ao longo da costa e alto dos Andes, desde o centro do Equador, atravessando o Peru, até o norte do Chile e as Ilhas Galápagos (BERGOUGNOUX, 2014). Foi domesticado no México e introduzido na Europa em 1544. Mais tarde, disseminou-se da Europa para a Ásia meridional e oriental, África e Oriente Médio. Mais tarde, distribuiu-se o tomate silvestre para outras partes da América do Sul e do México (ANDERLINI, 1982).

Do ponto de vista botânico, o tomate é uma fruta e não um vegetal, sendo ele uma das hortaliças mais consumidas no mundo, depois da batata e antes da cebola, além de ser a cultura de jardim preferida (BERGOUIGNOUX, 2014).

O consumo de tomate contribui para uma dieta saudável e bem equilibrada, pois é rico em minerais, vitaminas, aminoácidos essenciais, açúcares e fibras dietéticas. O tomate contém grandes quantidades de vitaminas B e C, ferro e fósforo. Consume-se o tomate fresco, em saladas e sanduíches, ou cozido, em molhos, sopas e carnes ou pratos de peixe. Pode ser processado em purês, sumos e molho de tomate (*ketchup*). Também os frutos enlatados e secos constituem produtos processados de importância econômica (BERGOUIGNOUX, 2014; ANDERLINI, 1982).

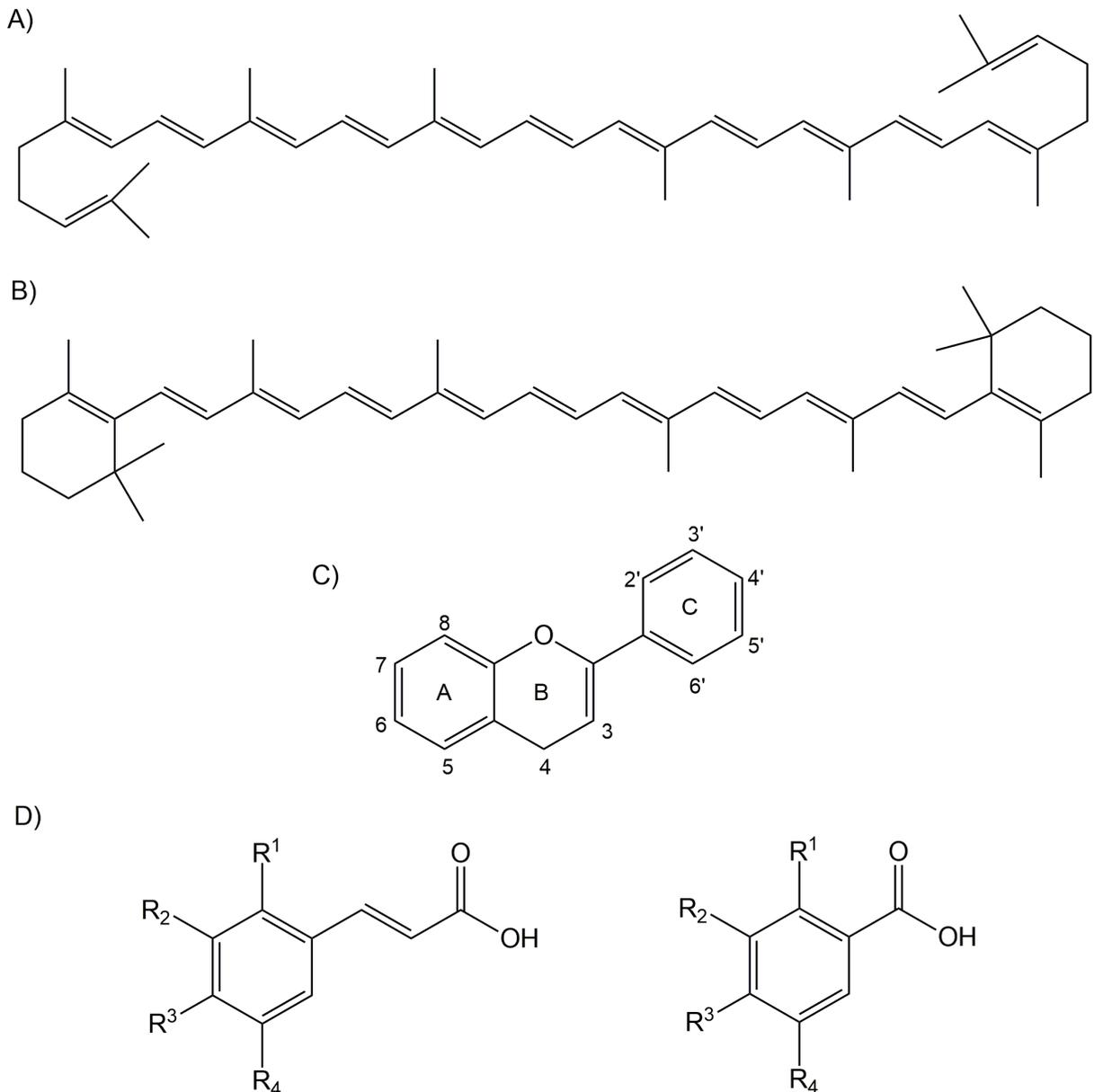
O tomate é considerado um alimento funcional, pois contém diferentes classes de substâncias com propriedades antioxidantes, como ácido ascórbico (vitamina C), tocoferóis (vitamina E), carotenoides (licopeno), flavonoides (rutina) e ácidos fenólicos, que trazem benefícios para a saúde humana (ANDRADE *et al.*, 2015; REIS, 2016).

O tomate armazena várias moléculas de antioxidantes, dentre elas o ácido ascórbico e a vitamina E. O ácido ascórbico é uma vitamina solúvel em água e um redutor eficaz, reagindo com oxidantes, sendo o principal antioxidante hidrofílico contido neste fruto. Já a vitamina E (majoritariamente α e γ -tocoferol), encontrada na fração lipofílica do tomate, é um antioxidante lipossolúvel que permite a eliminação de radicais livres nas membranas e no plasma. (BORGUINI & TORRES, 2009; REIS, 2016).

Os carotenóides são pigmentos sintetizados durante o amadurecimento do fruto. Os dois principais carotenóides presentes no tomate são o licopeno, em maior concentração (80 a 90%), e o β -caroteno, em menor concentração (7 a 10%), representados nas Figuras 1A e 1B, respectivamente. O licopeno, que também tem ação antioxidante, é responsável pela atrativa cor vermelha do fruto, enquanto o β -caroteno é um pigmento de cor vermelha-alaranjada forte que tem especial interesse devido à sua atividade pró-vitamina A (BORGUINI e TORRES, 2009; REIS, 2016).

Os carotenóides possuem ligações duplas conjugadas que permite a estes compostos absorverem luz na região do visível (cromóforo), mas também as tornam muito suscetíveis à isomerização e oxidação. Além disso, possuem caráter hidrofílico e são mais instáveis em pH ácido (SCHIOZER & BARATA, 2007).

Figura 1 – Estrutura química do licopeno (A), do β -caroteno (B), dos flavonoides (C) e dos derivados do ácido cinâmico e do ácido benzóico (D), respectivamente.



Fonte: Adaptação de REIS (2016).

Os flavonoides possuem uma estrutura base comum, que consiste em dois anéis aromáticos unidos por três átomos de carbono que formam um heterociclo oxigenado, como pode ser visto na Figura 1C. Muitas das variedades de flavonoides são responsáveis pelas cores atraentes das folhas, flores e frutos e sua cor varia de acordo com o pH, sendo mais estáveis (avermelhada) em meio ácido que em

soluções alcalinas (amarelada ou incolor) (REIS, 2016; SCHIOZER & BARATA, 2007).

Os ácidos fenólicos pertencem à família dos polifenóis e encontram-se em abundância nas plantas, dividindo-se em duas classes: os derivados do ácido benzóico e os derivados do ácido cinâmico, cuja estrutura química se representa na Figura 1D. (REIS, 2016).

2.1.2 Cenoura

A cenoura (*Daucus carota L.*) é uma hortaliça herbácea, da família *Apiaceae*, de cultivo anual, cuja parte comestível é uma raiz tuberosa, lisa, carnuda, reta e sem ramificações, podendo ter formato cônico e cilíndrico. É um alimento muito cultivado e consumido no Brasil e um dos vegetais minimamente processados mais comercializados. Pode ser encontrado em diversas formas no comércio, tais como: cubos, fios, palito, ralada, fatiada, e minicenouras (“cenourete” – baby carrot americana ou “catetinho” – formato esférico) (LARA, 2014; SILVA *et al.*, 2016).

Além do consumo *in natura*, a cenoura pode ser utilizada como matéria-prima por indústrias processadoras de alimentos como de sucos, concentrados, pós, conservas e doces (SILVA *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2006; SHARMA *et al.*, 2012).

As cenouras começaram a ser cultivadas no Afeganistão, Paquistão e Irã e depois no Império Persa, há aproximadamente cinco mil anos atrás. A cor e o sabor foram os primeiros critérios de seleção para domesticação. A cor da raiz mudou significativamente durante o período de domesticação. As cenouras selvagens eram brancas ou amarelo claro, enquanto as primeiras cores das domesticadas eram roxas ou amarelas. A cenoura laranja provavelmente surgiu de mutações das formas amarelas e da seleção humana, que imagina-se ter se originado na Holanda (STOLARCZYK e JANICK, 2011).

Do ponto de vista nutricional, a cenoura contém carboidratos “disponíveis”; fibras alimentares; proteínas; lipídios; minerais (cálcio, magnésio, potássio, sódio, fósforo, manganês, ferro, cobre e zinco); vitamina C; e carotenoides, com destaque para o β -caroteno. O β -caroteno é o pigmento responsável pela cor laranja das cenouras, e que no organismo humano é transformado em vitamina A. As necessidades diárias da vitamina A podem ser quase totalmente supridas com o

consumo de apenas 100 g desta hortaliça. Essa vitamina contribui para o bom estado da visão, da pele e das mucosas. Além disso, a cenoura é fonte de vitaminas do complexo B, que ajudam a regular o sistema nervoso e a função do aparelho digestivo. Apresenta também teor de açúcar, sendo, portanto, uma boa fonte de energia (CARVALHO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2016; LARA, 2014).

Os açúcares solúveis, presentes nas formas de sacarose, glicose e frutose, são os maiores componentes da matéria seca das raízes, equivalente a cerca de 70%. Os teores de amido da raiz são inferiores aos dos açúcares, geralmente 1 a 10% da matéria seca. A variação no acúmulo de solutos deve-se a combinação de fatores ambientais e endógenos da planta, como as condições climáticas durante a estação de crescimento das raízes, estágio de desenvolvimento na colheita e cultivares (EMBRAPA, 2018).

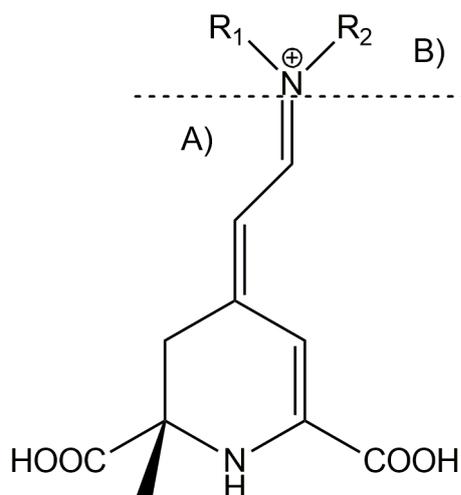
2.1.3 Beterraba

A beterraba (*Beta vulgaris L.*), originária das regiões de clima temperado da Europa e do norte da África, pertence à família *Chenopodiaceae*, na qual a parte comestível é a raiz tuberosa de formato globular que se desenvolve quase à superfície do solo, com sabor acentuadamente doce e coloração púrpura. (RESENDE & CORDEIRO, 2007).

Existem três tipos de beterraba: a beterraba açucareira de coloração branca, usada para produção de açúcar; a beterraba forrageira usada na alimentação animal e a beterraba para mesa ou beterraba olerícola de coloração vermelha, sendo a mais conhecida e cultivada no Brasil (PINHEIRO, 2011). A coloração vermelho-arroxeadada desta hortaliça deve-se à presença das betalaínas, que são compostos semelhantes às antocianinas e flavonoides. As betalaínas são pigmentos hidrossolúveis que incluem as betacianinas (responsáveis pela coloração vermelho-violeta) e as betaxantinas (responsáveis pela coloração amarelo-laranja), caracterizando a coloração típica das raízes de beterraba, que contém ambos os corantes, cerca de 75-95% de betacianina e aproximadamente 95% de betaxantina. A estrutura química geral das betalaínas é apresentada na Figura 2 (VOLP *et al.*, 2009).

A estabilidade da cor das betalaínas é fortemente influenciada pela presença de luz, oxigênio, atividade de água, variação de pH e temperatura (SCHIOZER & BARATA, 2007).

Figura 2 – Estrutura química geral da betalaína. (A) Ácido betalâmico presente em toda molécula de betalaína. (B) Esta estrutura poderá representar tanto a betacianina quanto a betaxantina, dependendo da identidade dos radicais 1 e 2. Nas betacianinas, R= glicose ou ácido glucurônico. As betaxantinas possuem um anel dihidropirínico.



Fonte: (VOLP *et al.*, 2009).

Como pode ser observado, a estrutura geral das betalaínas contém o ácido betalâmico acompanhado de um radical R1 ou R2. Estes radicais são uma representação geral para os possíveis substituintes desse ponto da estrutura, que podem ser de um simples hidrogênio a um complexo substituinte. A variação desses grupos é em função das diferentes fontes de onde podem ser obtidos esses pigmentos e determinam sua tonalidade e estabilidade (VOLP *et al.*, 2009).

Além das propriedades colorantes, as betalaínas são identificadas como uma nova classe de antioxidantes presente na dieta humana, principalmente devido à sua capacidade de sequestrar radicais livres. A ingestão regular de beterraba pode fornecer proteção contra algumas doenças relacionadas ao estresse oxidativo em humanos, como certos tipos de câncer (LOPES *et al.*, 2011; VITTI *et al.*, 2003).

A beterraba é fonte de vitaminas do complexo B e de minerais como sódio, potássio, zinco e magnésio. Seu aspecto sensorial, devido à sua cor, pode ser uma das razões que explicam o crescimento, no mercado brasileiro, do consumo de

beterraba minimamente processada, que está sendo impulsionado pelo segmento de saladas prontas (LOPES *et al.*, 2011).

2.2 AGROTÓXICOS

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, 1997), agrotóxicos são substâncias ou mistura de substâncias utilizadas na produção, colheita ou no armazenamento de alimentos. Eles são bioativos e capazes de controlar, prevenir, destruir ou combater espécies indesejáveis (pragas animais, microbiológicas ou de plantas) que, de alguma maneira, possam interferir na produção, no processamento, armazenamento, transporte e estocagem de alimentos, produtos agrícolas em geral, madeira e seus derivados. Nesta definição incluem-se substâncias utilizadas no combate a mosquitos e outros insetos domésticos ou quaisquer agentes de prevenção à ação de vetores de doenças que possam ser transmitidas ao homem ou animais domésticos como, por exemplo, a febre amarela (GALLI *et al.*, 2006).

No Brasil, a Lei Federal nº 7.802 de 11 de julho de 1989, conhecida como “Lei de Agrotóxicos”, que foi regulamentada pelo Decreto nº 4.074 de 2002, dispõe sobre a pesquisa, experimentação, produção, embalagem e rotulagem, o transporte, armazenamento, a comercialização, propaganda comercial, utilização, importação, exportação, o destino final dos resíduos e das embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. Através dessa Lei, o termo “*agrotóxico*” deve ser utilizado em substituição aos termos: biocidas, defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas e produtos fitossanitários (JARDIM *et al.*, 2009; BRASIL, 1989).

Segundo o Decreto Federal Brasileiro nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entendem-se por *agrotóxicos*: “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 plantadas, e de outros ecossistemas e 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 as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento”.

Os agrotóxicos são classificados, de acordo com as pragas que controlam, em (TSIPI *et al.*, 2015):

- Acaricidas: usados para matar ácaros e carrapatos ou para impedir seu crescimento ou desenvolvimento. Compostos de diferentes grupos químicos são usados como acaricidas. Muitos deles também são classificados como inseticidas.
- Algicidas: usados para matar ou inibir algas. Compostos de diferentes grupos químicos, como fenilureias (diuron, isoproturon), difenil éteres (oxifluorfen), triazinas (cibutrina, simazina, terbutrina), e amidas (quinonamida) estão incluídas nesta classe.
- Avicidas: usados para combater pássaros. Diferentes compostos químicos como fention, endrin, estricnina e 4-aminopiridina são aplicados.
- Bactericidas: usados para matar ou inibir bactérias em planta ou solo.
- Repelentes de aves: usado para deter pássaros de se aproximar ou se alimentar nas lavouras ou produtos armazenados.
- Fungicidas: usados para matar fungos em plantas, produtos armazenados, ou solo ou para inibir o seu desenvolvimento.
- Herbicidas: usados para matar plantas ou inibir seu crescimento ou desenvolvimento.
- Inseticidas: utilizados para matar insetos ou impedir seu crescimento ou desenvolvimento.
- Nematicidas: utilizado para matar nematóides em plantas ou solo. Avermectinas, carbamatos e compostos organofosforados também podem agir como nematicidas.
- Reguladores de crescimento da planta: substância que altera o crescimento esperado, floração ou taxa de reprodução das plantas. Antiauxinas, citocinas, desfolhantes, gametocidas, giberelinas, inibidores de crescimento, retardadores de crescimento e simuladores de crescimento são incluídos nessa classe de pesticidas.
- Rodenticidas: usados para matar ratos e outros roedores.

Os agrotóxicos também podem ser classificados quanto a sua composição química em *orgânicos*: carbamatos (nitrogenados), clorados, fosforados e clorofosforados; *inorgânicos*: cujas composições químicas apresentam arsênio, tálio,

bário, nitrogênio, fósforo, cádmio, ferro, selênio, chumbo, cobre, mercúrio e zinco e, *botânicos*: compostos de nicotina, piretrina, sabadina e rotenona (JARDIM *et al.*, 2009).

Não menos importante, também há a classificação quanto a toxicidade dos agrotóxicos (Tabela 2), adotada pela Anvisa, cujos parâmetros são estabelecidos com base nos padrões do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotuleamento de Produtos Químicos (GHS, do inglês *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*) (ANVISA, 2019).

Tabela 2 – Classes toxicológicas dos agrotóxicos.

Classe Toxicológica	Classificação	Cor da faixa no rótulo da embalagem
I	Extremamente Tóxico	Vermelha
II	Altamente Tóxico	Vermelha
III	Moderadamente Tóxico	Amarela
IV	Pouco Tóxico	Azul
V	Produto improvável de causar dano agudo	Azul
Não classificado	Produto não classificado	Verde

Fonte: Adaptado de ANVISA (2019).

2.2.1 O consumo de agrotóxicos no Brasil

Para serem utilizados, os agrotóxicos precisam estar em uma forma conveniente para uso efetivo e seguro. Por isso, os produtos comerciais têm em sua formulação uma mistura de compostos. Dentre estes compostos, está presente o ingrediente ativo, que é o um composto químico que (normalmente) não é apropriado para aplicação direta no ambiente na sua forma isolada. A formulação permite mesclar o produto de grau analítico com elementos inertes, de modo que tenha a concentração adequada, facilitando, assim, a sua manipulação, aplicação e transporte, bem como a dispersão, para um melhor desempenho sobre a praga a ser controlada. Existem cerca de 400 ingredientes ativos, utilizados na formulação de pesticidas, registrados para uso específico na agricultura (MAPA, 2020).

Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agropecuária (SINDAG, 2019) e o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG, 2018), o Brasil é o segundo maior produtor de alimentos no mundo, ficando atrás somente dos Estados Unidos. Em termos de área cultivada, nosso país se mantém em ritmo crescente ano a ano, assim como a produtividade agrícola, graças ao incremento da tecnologia de produção. Dessa forma, para atingir e aumentar os índices de produtividade em uma área tão extensa, é crescente o uso de insumos como agrotóxicos, fertilizantes e sementes certificadas (SINDAG, 2019).

Outros fatores que devem ser levados em consideração são as múltiplas safras ao longo do ano e o clima tropical brasileiro, que favorece a proliferação de pragas e, conseqüentemente, a possibilidade de mais aplicação de defensivos agrícolas. Segundo a SINDIVEG (2018), o Brasil é eficiente na produção de alimentos com menor aplicação de agrotóxicos, quando comparado o emprego com a área plantada, em hectares, como pode ser visto na Figura 3. O Brasil está em 7º lugar, perdendo para Japão, Coreia, Alemanha, França, Itália e Reino Unido, que empregam mais defensivos agrícolas por área tratada.

Figura 3 – Emprego de defensivos agrícolas por hectare (US\$/ha).

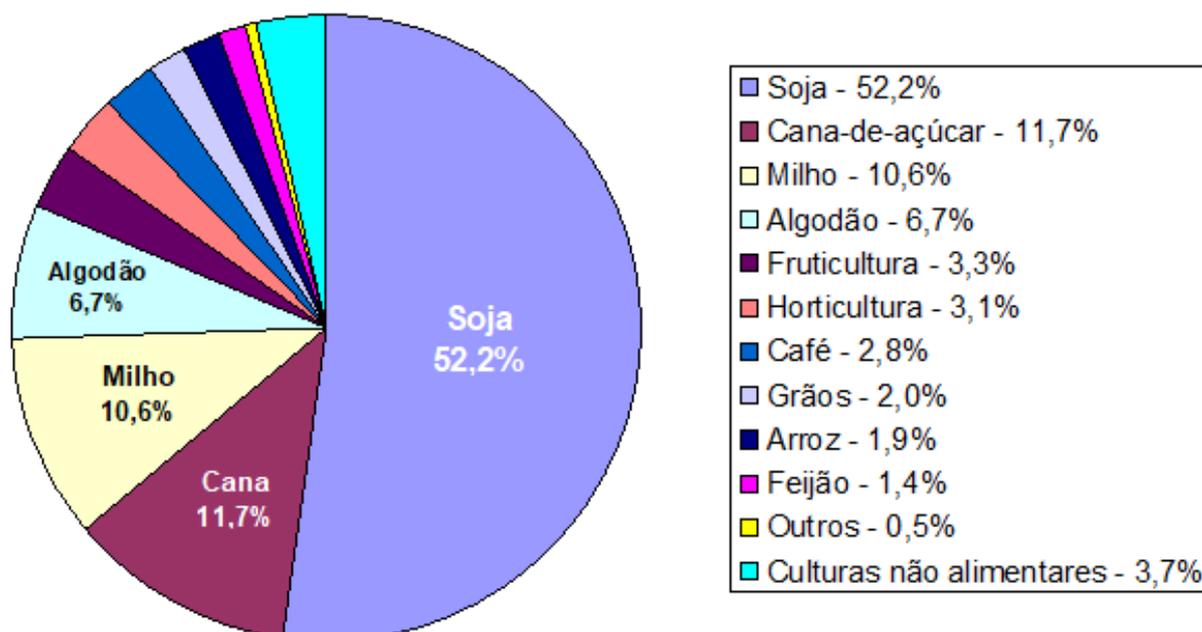


Fonte: (SINDIVEG, 2018).

Carneiro e colaboradores (2015), relatam que há um crescente consumo de agrotóxicos pela agricultura brasileira, proporcional ao aumento das monoculturas, cada vez mais dependentes dos insumos químicos. Segundo o estudo, o consumo de agrotóxicos no Brasil cresceu 42% de 2002 para 2011. No entanto, segundo o SINDAG (2019), para analisar estes dados, deve-se levar em conta a questão do aumento da área cultivada, que foi de 25% no período de 2002 a 2011, e também o crescimento da produtividade agrícola, que foi de 45,7% no mesmo período.

A maior parte (81%) dos agrotóxicos utilizados no Brasil é destinada a cultura da soja, do milho, da cana-de-açúcar e do algodão, como pode ser observado na Figura 4 (SINDIVEG, 2018).

Figura 4 – Defensivos agrícolas empregados por cultura em 2017, em US\$.



Fruticultura: citros, maçã, uva, melão e melancia, banana e outros

Horticultura: batata inglesa, tomate, cebola, alho e outros

Grãos: trigo, aveia, centeio, cevada e amendoim

Culturas não alimentares: reflorestamento, pastagem, floricultura e fumo

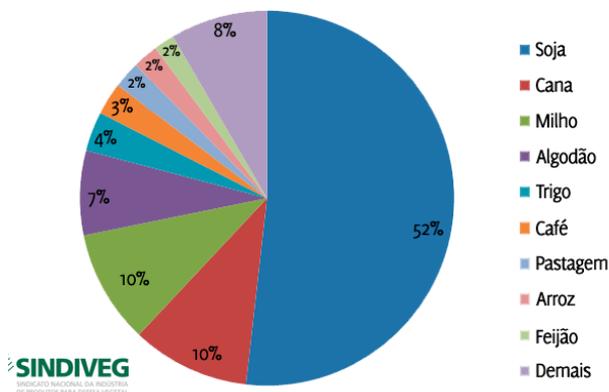
Outros: grãos armazenados e outros.

Fonte: Adaptado de SINDIVEG (2018).

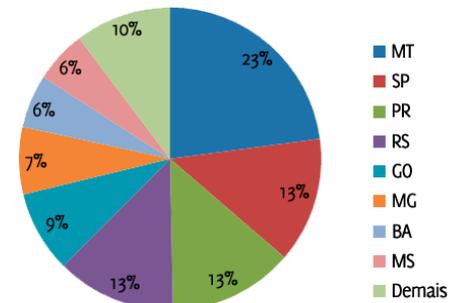
Já as vendas por Estado, até 2015, eram lideradas pelo Mato Grosso, seguido por São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, como pode ser visto na Figura 5. São Paulo teve sua participação aumentada devido à recuperação das lavouras de cana-de-açúcar, café e citros. (SINDIVEG, 2015).

Figura 5 – Gráfico de vendas de agrotóxicos nas principais culturas em 2015, à esquerda, e gráfico de vendas de agrotóxicos nos principais estados do Brasil em 2015, à direita.

Vendas Principais Culturas 2015



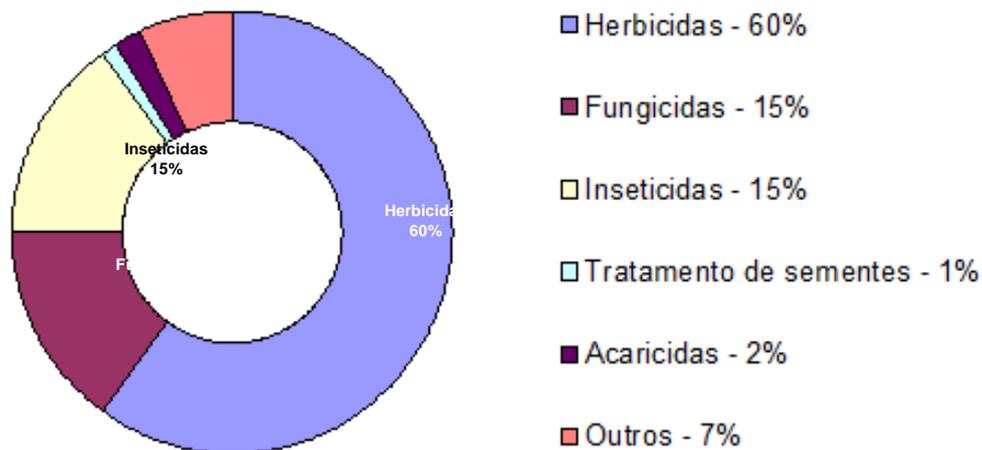
Vendas Principais Estados 2015



Fonte: (SINDIVEG, 2018).

Quanto a classe mais comercializada, em 2017, os herbicidas foram os que representaram a maior parte dos agrotóxicos utilizados (60%), conforme Figura 6 (SINDIVEG, 2018; IBAMA, 2019).

Figura 6 – Percentual das classes de defensivos empregados em 2017.



Fonte: Adaptado de SINDIVEG (2018).

Segundo dados do Boletim Anual de 2018 do IBAMA, calcula-se que tenham sido registrados 259 novos produtos formulados e que o total desses produtos abrange um montante de 329 ingredientes ativos. A Tabela 3 mostra os dez ingredientes ativos mais vendidos em 2018, onde o glifosato lidera o ranking.

Tabela 3 – Os dez ingredientes ativos mais vendidos em 2018.

Ingrediente Ativo	Vendas (ton. IA)	Ranking
Glifosato e seus sais	195.056,02	1º
2,4-D	48.921,25	2º
Mancozebe	40.549,92	3º
Atrazina	28.799,34	4º
Acefato	24.656,79	5º
Dicloreto de paraquate	13.199,97	6º
Enxofre	10.409,69	7º
Imidacloprido	9.112,53	8º
Óleo mineral	9.112,53	9º
Oxicloreto de cobre	7.443,62	10º

Fonte: (IBAMA, 2019).

Apesar da demanda crescente do uso de agrotóxicos, o mercado de agroquímicos como um todo está perdendo para a comercialização ilegal de produtos. Estudos apontam que o contrabando pode chegar a 20% das vendas de defensivos agrícolas no Brasil. Trata-se de um grande problema, pois além das questões econômicas que são impactadas pela atividade irregular, tem também a questão da segurança alimentar da população e risco de contaminação do meio ambiente, uma vez que a segurança desses produtos nas lavouras é desconhecida e que não passam pela análise das autoridades regulamentadoras. (SINDIVEG, 2015)

Vale lembrar que o uso excessivo e indiscriminado de agrotóxicos também pode ocasionar problemas ambientais, como contaminação do solo e da água, e os consumidores podem ser expostos a estes compostos químicos presentes nos alimentos tratados, colocando em risco a saúde humana (LARA, 2014; ZANELLA *et al.*, 2015; GOLGE e KABAK, 2015).

2.2.2 Problemas relacionados aos agrotóxicos

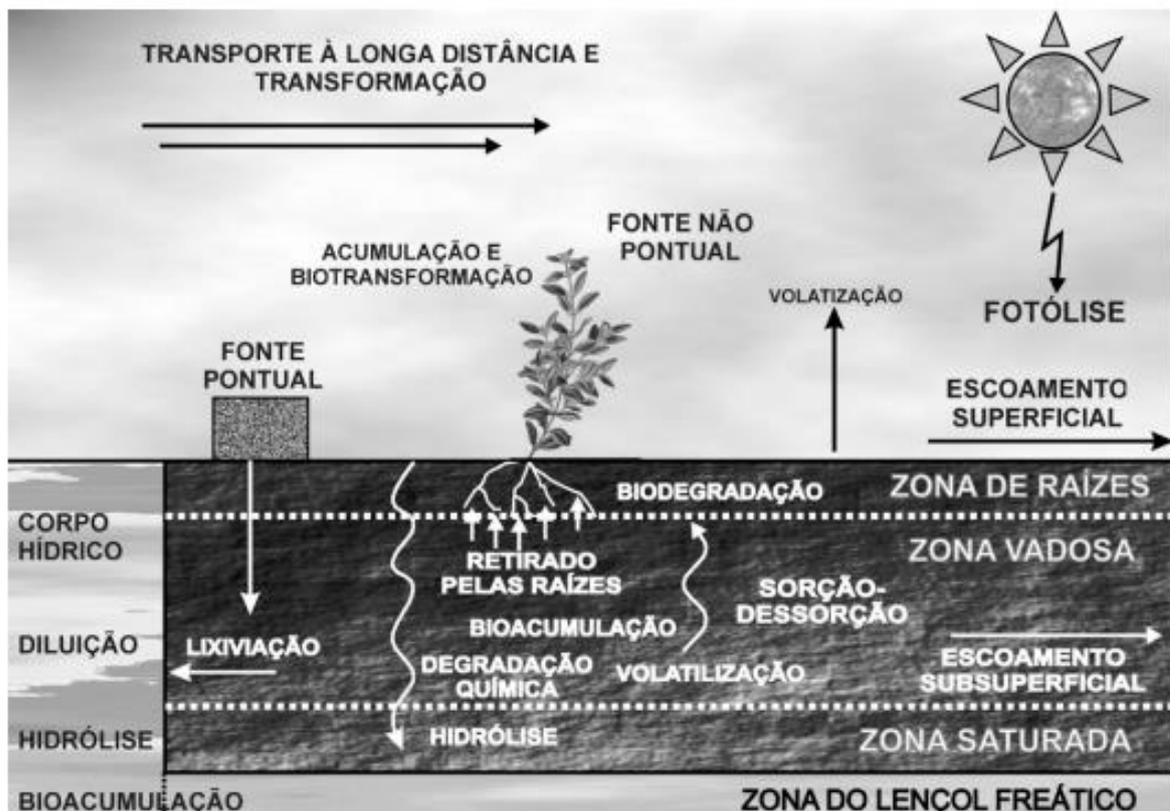
O uso de agrotóxicos na agricultura deve ser feito com alguns cuidados, através de procedimentos seguros para o manejo de substâncias perigosas, e de forma moderada, para evitar vazamentos de produtos, contaminação e até mesmo a desertificação do solo. Se utilizados de maneira intensiva e indiscriminada, os

agrotóxicos podem causar a degradação dos recursos naturais, em alguns casos de forma irreversível, levando à ocorrência de desequilíbrios biológicos e ecológicos, entre eles a contaminação de lençóis freáticos e aquíferos. Para os anfíbios, por exemplo, esses compostos podem ser letais, mesmo em concentrações na ordem de micrograma por litro. Além dos danos causados ao meio ambiente, uma área contaminada pode comprometer a qualidade dos recursos hídricos, gerando danos à saúde pública, restrições ao uso do solo e, até mesmo, desvalorizando propriedades públicas e privadas. (JARDIM *et al.*, 2009).

Para o ser humano, a exposição aos agrotóxicos, a curto e longo prazo, pode causar dificuldades respiratórias, alergias, diversos tipos de câncer, danos ao sistema nervoso central, problemas no sistema reprodutivo e locomotor, deficiência mental, dentre outros, dependendo das características das substâncias ativas e da maneira como foi utilizado (ZANELLA *et al.*, 2015; GOLGE e KABAK, 2015).

Na Figura 7 são representadas as principais rotas de transporte e de degradação dos agrotóxicos na natureza, e os meios mais prováveis onde esses compostos podem ser encontrados (JARDIM *et al.*, 2009).

Figura 7 – Principais rotas de transporte e degradação de agrotóxicos no ambiente.



Fonte: (JARDIM *et al.*, 2009).

Em geral, o alimento é a principal rota de exposição aos agrotóxicos. A exposição aos resíduos por meio da dieta é cerca de cinco vezes maior que por outras rotas de exposição, como o ar e água potável. Como a produção de frutas e hortaliças é maior, estima-se que estes alimentos contribuam para uma maior ingestão diária de agrotóxicos, quando comparado com outros grupos de alimentos de origem vegetal como pães e cereais (LARA, 2014).

As medidas mais importantes para minimizar o risco da contaminação por agrotóxicos em humanos são, não somente monitorá-los nos produtos agrícolas, frutas e verduras, mas também propor e empregar formas alternativas que visem a redução desses compostos durante as etapas de plantio de uma determinada cultura. Há ainda os defensivos agrícolas que não tem registro para todas as culturas, o que pode acarretar no seu uso para combater uma praga em uma cultura que não tenha registro autorizado. Normalmente, quando os agrotóxicos são aplicados seguindo as boas práticas agrícolas, os limites máximos de resíduos não são excedidos. Porém, a forma inadequada de utilização desses compostos é que se torna preocupante, podendo deixar quantidades significativas de resíduos tanto em alimentos quanto e em compartimentos ambientais (JARDIM *et al.*, 2009; SINDIVEG, 2018).

2.2.3 Programas de monitoramento

O monitoramento minucioso e completo de resíduos de agrotóxicos em alimentos é fundamental para a avaliação dos riscos que a exposição aos agrotóxicos pode causar em um organismo, em determinado período de tempo. Por isso, a realização de um programa nacional de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos é imprescindível para que ações da vigilância sanitária, com foco na prevenção e no controle dos riscos à saúde decorrentes do consumo de alimentos contaminados, sejam colocadas em prática (JARDIM *et al.*, 2009).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável que estabelece a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico, oficialmente aceita no alimento após ter sido tratado com a máxima dose recomendada na bula de cada produto. Esse limite máximo de resíduo (LMR) é estabelecido para diversos tipos de alimentos comercializados no país, através da avaliação dos teores de resíduos que permanecem nas culturas após a aplicação de

agrotóxicos, respeitando o intervalo de segurança de cada ingrediente ativo. O estabelecimento e regulamentação desses limites visa garantir a segurança do consumidor e garantir práticas legais do comércio externo (ANDRADE *et al.*, 2015; LARA, 2014).

Para avaliar esses parâmetros, existem dois programas de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos no país: o Programa de Análise de Resíduos em Alimentos (PARA), realizado pela ANVISA; e o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal (PNCRC/Vegetal), realizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O PARA tem por objetivo avaliar os níveis de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal que chegam à mesa do consumidor (ANVISA, 2019). Já o PNCRC/Vegetal tem por objetivo monitorar a ocorrência de resíduos de agrotóxicos e contaminantes químicos e biológicos em produtos de origem vegetal produzidos no país, destinados ao mercado interno e também à exportação (MAPA, 2020).

Para a cultura do tomate, por exemplo, no último PARA, das 316 amostras analisadas, 39 não apresentaram resíduos dos agrotóxicos pesquisados, 167 apresentaram resíduos em concentrações iguais ou inferiores ao LMR e 8 apresentaram resíduos em concentração acima do LMR. Os ativos imidacloprido, fenpropatrina e carbendazim foram os ingredientes ativos mais detectados. Resultados para beterraba e cenoura também são apresentados na Tabela 4 (ANVISA, 2020).

Tabela 4 – Resultados do PARA Ciclo 2017-2018 para as matrizes tomate, cenoura e beterraba

Matriz	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras sem resíduos de agrotóxicos	Nº de amostras com resíduos de agrotóxicos ≤LMR	Nº de amostras com resíduos de agrotóxicos >LMR	Ingredientes ativos mais detectados
Tomate	316	39	167	8	Imidacloprido, fenpropatrina e carbendazim
Beterraba	357	236	69	19	Ditiocarbamatos, tebuconazol e difenoconazol
Cenoura	353	33	180	3	Procimidona, piraclastrobina e tebuconazol

Fonte: Adaptado de ANVISA (2020).

O PNCRC/Vegetal abrange um número menor de amostras e avalia tomate na forma de moitoramento e beterraba e cenoura em subprograma exploratório, ou seja, avalia a ocorrência de resíduos e contaminantes para os quais ainda não existam limites e níveis máximos estabelecidos. Resultados da última publicação do programa são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados do PNCRC/Vegetal 2º semestre 2015, ano 2016, ano 2017 e ano 2018.

Matriz	2015			2016			2017			2018		
	Amostras conforme	Total de amostras	índice de conformidade	Amostras conforme	Total de amostras	índice de conformidade	Amostras conforme	Total de amostras	índice de conformidade	Amostras conforme	Total de amostras	índice de conformidade
Tomate	20	23	86,9%	18	23	78,3%	57	67	75,0%	40	45	89,0%
Beterraba	12	13	92,3%	8	10	80,0%	15	20	76,5%	6	8	75,0%
Cenoura	11	11	100,0%	14	16	87,5%	13	17	85,1%	8	9	88,9%

Fonte: Adaptado de MAPA (2020).

No âmbito internacional, os limites máximos de resíduos (LMRs) são determinados pelo Comitê para Resíduos de Agrotóxicos do Codex Alimentarius (CCPR), que segue recomendações da Food and Agriculture Organization (FAO) e da Organização Mundial de Saúde (OMS) para estabelecer normas internacionais na área de alimentos. Os países que não dispõem de um sistema organizado de registro de agrotóxicos adotam os limites instituídos pelo Codex Alimentarius em sua legislação (LARA, 2014).

Os agrotóxicos mais comumente analisados em tomate, cenoura e beterraba e que contém limites máximos de resíduo definidos, são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Agrotóxicos determinados em tomate, cenoura e beterraba e seus LMRs.
(continua)

Agrotóxicos	Tomate			Cenoura			Beterraba		
	LMR (mg/kg)			LMR (mg/kg)			LMR (mg/kg)		
	ANVISA	UE	Codex	ANVISA	UE	Codex	ANVISA	UE	Codex
Acetamiprido	0,5	0,5	NA	NA	0,01	NA	0,03	0,01	NA
Aldicarbe	-	0,02	NA	-	0,02	NA	-	0,02	NA
Ametrina	NA	-	-	NA	-	-	NA	-	-
Azaconazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Azametifós	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Azinfós-etílico	-	0,02	-	-	0,02	-	-	0,02	-
Azinfós-metílico	-	0,05	NA	-	0,05	NA	-	0,05	NA
Azoxistrobina	0,5	3	-	0,2	1	NA	0,2	1	NA
Boscalida	0,05	0,3	NA	0,1	2	2	NA	4	2
Buprofezina	0,5	0,01	1	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA
Carbendazim	NA	0,3	0,5	NA	0,1	0,2	NA	0,1	NA
Carbofurano	0,1	0,002	NA	-	0,002	NA	-	0,002	NA
Carbofurano-3-OH	-	0,002	NA	-	0,002	-	-	0,002	-
Carboxina	NA	0,03	-	NA	0,03	-	NA	0,03	-
Clorprofam	-	0,01	NA	-	0,01	NA	-	0,01	NA
Cimoxanil	NA	0,01	-	NA	0,01	-	NA	0,01	-
Ciproconazol	NA	0,05	NA	NA	0,05	NA	NA	0,05	NA
Clomazona	NA	0,01	-	NA	0,01	-	NA	0,01	-
Clorantranilipore	NA	0,06	0,02	NA	0,08	0,08	NA	0,06	0,02
Clorfenvinfós	-	0,01	-	-	0,01	-	-	0,01	-
Clotianidina	0,1	-	-	NA	0,02	0,2	NA	0,01	0,2
Clorpirifós	0,5	0,1	NA	NA	0,1	0,1	NA	0,05	NA
Clorpirifós-metílico	-	1	1	-	0,01	NA	-	0,01	NA
Cresoxim-metílico	NA	-	-	0,01	0,01	-	NA	0,05	-
Cianazina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Deltametrina	0,03	0,07	0,3	NA	0,02	0,02	NA	0,02	NA
Demeton-S-metil-sulfona	-	0,01	-	-	0,01	-	-	0,01	-
Diclosulam	NA	-	-	NA	-	-	NA	-	-
Dicrotofós	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Difenoconazol	0,1	2	0,5	0,2	0,4	0,2	0,1	0,4	NA
Diflubenzurom	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA
Dimetoato	1	0,01	-	NA	0,03	NA	NA	0,01	NA
Dimoxistrobina	NA	0,01	-	NA	0,01	-	NA	0,01	-
Diniconazol	-	0,01	NA	-	0,01	-	-	0,01	-
Diurom	NA	0,01	-	NA	0,01	-	NA	0,01	-
EPN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epoxiconazol	NA	0,05	-	NA	0,05	-	NA	0,05	-
Espinosade A	NA	-	-	NA	-	-	NA	-	-
Espinosade D	NA	-	-	NA	-	-	NA	-	-
Etoxisulfurom	NA	0,01	-	NA	0,01	-	NA	0,01	-
Etoprofós	NA	-	0,01	NA	0,02	NA	NA	0,02	NA
Famoxadona	NA	0,01	NA	0,05	0,01	NA	NA	0,01	NA
Fenamidona	NA	0,15	NA	NA	0,2	0,2	NA	0,15	NA
Fenamifós	0,1	0,04	NA	NA	0,02	NA	NA	0,02	NA
Fenarimol	NA	0,02	NA	NA	0,02	NA	NA	0,02	NA
Fenazaquin	-	0,01	NA	-	0,01	NA	-	0,01	NA
Fenoxicarbe	-	0,01	-	-	0,05	-	-	0,01	-
Fenpropimorfe	NA	0,01	NA	NA	0,04	NA	NA	0,01	NA

Agrotóxicos	Tomate			Cenoura			Beterraba		
	LMR (mg/kg)			LMR (mg/kg)			LMR (mg/kg)		
	ANVISA	UE	Codex	ANVISA	UE	Codex	ANVISA	UE	Codex
Fenpiroximat	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA
Fentiona	-	-	NA	-	0,01	NA	-	0,01	NA
Fipronil	NA	0,005	NA	NA	0,005	NA	NA	0,005	NA
Fluazifope-p-butílico	-	0,06	-	0,2	0,4	0,6	NA	0,5	NA
Fluquiconazol	NA	0,05	-	NA	0,05	-	NA	0,05	-
Fluroxipir	NA	0,01	-	NA	0,01	-	NA	0,01	-
Flusilazol	-	0,01	NA	-	0,01	NA	-	0,01	NA
Flutolanil	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA
Furatiocarbe	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexitiazoxi	NA	0,5	0,1	NA	0,5	NA	NA	0,5	NA
Imazalil	NA	0,5	0,3	NA	0,05	NA	NA	0,05	NA
Imazamoxi	NA	0,05	NA	NA	0,05	NA	NA	0,05	NA
Imazapique	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA
Imazapir	NA	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Imazaquim	NA	0,05	-	NA	0,05	-	NA	0,05	-
Imazetapir	NA	-	NA	NA	-	NA	NA	-	NA
Imidacloprido	0,5	0,5	0,5	0,05	0,5	0,5	NA	0,5	0,5
Iprovalicarbe	0,05	0,7	NA	NA	0,01	-	NA	0,01	-
Linurom	NA	0,01	-	1	0,01	-	NA	0,01	-
Mecarbam	-	0,01	-	-	0,01	-	-	0,01	-
Mefosfolam	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mepronil	-	0,01	-	-	0,01	-	-	0,01	-
Metalaxil	0,05	0,3	0,5	NA	0,1	0,05	NA	0,02	NA
Metconazol	0,05	0,02	-	0,05	0,02	-	NA	0,02	-
Metidationa	NA	0,02	NA	NA	0,02	NA	NA	0,02	NA
Metiocarbe sulfona	-	0,2	-	-	0,1	-	-	0,1	-
Metiocarbe sulfóxido	-	0,2	-	-	0,1	-	-	0,1	-
Metomil	1	0,01	1	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA
Metoxifenoazida	NA	0,01	NA	NA	0,5	0,5	NA	0,01	NA
Metribuzim	0,1	0,1	-	NA	0,1	-	NA	0,1	-
Metsulfuron-metílico	NA	0,01	-	NA	0,01	-	NA	0,01	-
Mevinfós	-	0,2	-	-	0,01	-	-	0,01	-
Molinato	-	0,01	-	-	0,01	-	-	0,01	-
Monocrotofós	-	0,01	-	-	0,01	-	-	0,01	-
Monolinuron	-	0,01	-	-	0,01	-	-	0,01	-
Nicosulfuron	NA	0,01	-	NA	0,01	-	NA	0,01	-
Nuarimol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Parationa-etílica	-	0,01	NA	-	0,05	-	-	0,05	-
Pencicuum	0,1	0,05	-	0,1	0,05	-	0,1	0,05	-
Penconazol	-	0,1	0,09	-	0,01	NA	-	0,01	NA
Penoxsulam	NA	0,01	-	NA	0,01	-	NA	0,01	-
Fosalona	-	0,01	NA	-	0,01	NA	-	0,01	NA
Fosmet	NA	0,05	NA	NA	0,05	NA	NA	0,05	NA
Picoxistrobina	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA
Piperonil-butóxido	-	-	2	-	-	0,5	-	-	0,5
Pirimicarbe	1	0,5	NA	NA	0,05	0,05	NA	0,05	0,05
Pirimifós-etílico	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pirimifós-metílico	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA
Piriproxifeno	0,01	0,05	NA	NA	0,05	NA	0,01	0,05	NA

Agrotóxicos	Tomate			Cenoura			Beterraba		
	LMR (mg/kg)			LMR (mg/kg)			LMR (mg/kg)		
	ANVISA	UE	Codex	ANVISA	UE	Codex	ANVISA	UE	Codex
Profenofós	-	10	10	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA
Propargito	2	0,01	2	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA
Propiconazol	0,1	3	3	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA
Propoxur	-	0,05	-	NA	0,05	-	NA	0,05	-
Piraclostrobina	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA	0,2	0,1	NA
Pirazofós	-	0,01	-	-	0,01	-	-	0,01	-
Piridafentiona	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piridato	-	0,05	-	-	0,05	-	-	0,05	-
Pirimetanil	-	1	0,7	1	1	1	NA	0,01	NA
Quinalfos	-	0,01	-	-	0,01	-	-	0,01	-
Quinclorac	NA	0,01	NA	-	0,01	NA	-	0,01	NA
Quinoxifen	-	0,02	NA	-	0,02	NA	-	0,02	NA
Quizalofope-p-etílico	NA	0,4	-	NA	0,2	-	NA	0,06	-
Saflufenacil	NA	0,03	NA	NA	0,03	NA	NA	0,03	NA
Simazina	NA	0,01	-	NA	0,01	-	NA	0,01	-
Tebuconazol	0,3	0,9	0,7	0,6	0,4	0,4	0,3	0,02	NA
Tebufenozida	NA	0,05	NA	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA
Tebufempirada	-	0,8	-	-	0,01	-	-	0,01	-
Terbufós	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA
Tetraconazol	0,2	0,1	-	0,01	0,02	-	NA	0,02	-
Tiabendazol	0,01	0,01	NA	0,01	0,01	NA	NA	0,01	NA
Tiacloprido	0,1	0,5	0,5	NA	0,05	NA	NA	0,05	NA
Tiametoxam	1	0,2	NA	NA	0,3	0,3	NA	0,01	0,3
Tiobencarbe	NA	0,01	-	NA	0,01	-	NA	0,01	-
Tiodicarbe	NA	0,01	-	NA	0,01	-	NA	0,01	-
Tiofanato-metílico	0,2	1	-	0,01	0,1	-	NA	0,1	-
Tolcofós-metílico	-	0,01	NA	-	0,01	NA	-	0,01	NA
Tolifluanida	-	0,02	-	-	0,02	-	-	0,02	-
Triadimenol	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA
Triazofós	0,5	0,01	NA	NA	0,01	NA	-	0,01	NA
Triciclazol	NA	0,01	-	NA	0,01	-	NA	0,01	-
Trifloxissulfurom	NA	0,7	-	NA	-	-	NA	-	-
Trifloxistrobina	0,5	0,7	0,7	0,05	0,1	0,1	0,1	0,02	NA
Triflumurom	0,1	0,01	-	NA	0,01	-	NA	0,01	-
Vamidotiona	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*NA: Não autorizado

Fonte: (ANVISA, 2020; EC, 2020; CODEX, 2020).

2.3 DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

2.3.1 Técnicas cromatográficas para determinação de resíduos de agrotóxicos

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) tem importância dentre as técnicas de separação, pois consegue separar misturas com uma grande variedade de compostos similares

presentes em diversos tipos de amostras, com alta resolução, eficiência e detectabilidade. Baseia-se na separação dos componentes de uma mistura através de sua distribuição em uma fase estacionária e uma fase móvel (líquida), de acordo com a polaridade. Pode ser do tipo normal, quando a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel, ou do tipo reversa, quando a fase estacionária é mais apolar do que a fase móvel (COLLINS *et al.*, 2009).

Na busca por análises mais rápidas, sem comprometer a eficiência e a resolução cromatográfica, desenvolveu-se a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*). A UHPLC tem os mesmos princípios de separação da HPLC, no entanto, utiliza colunas com dimensões reduzidas (5-10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1-2,1 mm), recheadas com partículas de fase estacionária $\leq 2 \mu\text{m}$, o que permitiu o uso de altas velocidades lineares de fase móvel (MALDANER & JARDIM, 2012).

A UHPLC vem se destacando com relação à HPLC, pois tem como principais vantagens: diminuição considerável do tempo de análise, resolução e detectabilidade melhores, economia de fase móvel, utiliza pequeno volume de amostra, facilidade em transferir um método desenvolvido em HPLC para UHPLC, grande variedade de colunas e equipamentos disponíveis e menor geração de resíduos (MALDANER & JARDIM, 2012).

A espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) é considerada a técnica mais importante e versátil para a determinação de compostos orgânicos em baixas concentrações, em misturas complexas. Entretanto, o acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas passou por um longo período de desenvolvimento de interfaces para conseguir tornar compatíveis essas duas técnicas. Nesta técnica, uma substância precisa ser ionizada para que possa ser detectada, e isso só foi possível com o desenvolvimento de interfaces API (do inglês *atmospheric pressure ionization*), que operam à pressão atmosférica (LANÇAS, 2009).

Para o acoplamento LC-MS, destacam-se dois tipos de interface complementares operando à pressão atmosférica: ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray ionization*), onde um *spray* é gerado com auxílio de uma corrente elétrica (mais empregada para moléculas de maior polaridade e massa molecular), e ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*), onde uma espécie química é produzida e vai ionizar a

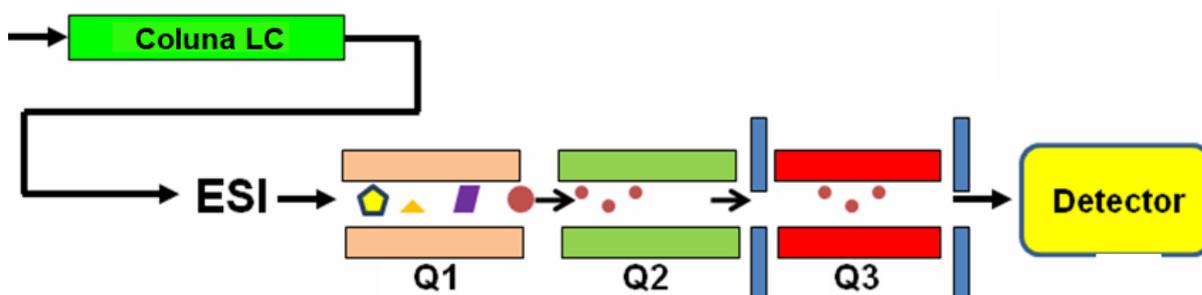
substância em análise (mais empregada para moléculas menos polares e de menor massa molecular) (LANÇAS, 2009).

Na ionização por ESI, o analito, dissolvido na fase móvel, passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. Na saída deste capilar, são formadas pequenas gotas altamente carregadas (*spray*) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco, geralmente N₂, na região do *spray*. O tamanho das gotas é reduzido à medida que ocorre a dessolvatação até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). É quando ocorre a chamada “explosão coulômbica”, que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas originais. Uma série de explosões passa a ocorrer até que são produzidos íons do analito a partir destas gotas, os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (CHIARADIA *et al.*, 2008).

No analisador, os íons são separados de acordo com sua razão m/z (massa/carga elétrica). Os íons separados no analisador são encaminhados para um detector, gerando uma corrente elétrica, que é analisada por um *software* e produz os espectros de massas (LANÇAS, 2009). O analisador do tipo quadrupolo é o mais utilizado, pois são bem estabelecidos, robustos e vem sendo empregado com grande sucesso em análises quantitativas. No entanto, como a ionização à pressão atmosférica é um tipo de ionização que produz poucos íons, os espectros gerados em LC-MS geralmente são pobres em informações, dificultando a confirmação do analito. Por isso, o uso de analisadores em série (LC-MS/MS) foi a forma encontrada para se obter mais informações e confirmar a identidade do analito com maior segurança (LANÇAS, 2009). O espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (QqQ) é formado por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo não opera como analisador, mas apenas como célula de colisão. O efluente da coluna de cromatografia líquida (mistura de íons) entra no primeiro quadrupolo (Q1), que seleciona apenas um íon precursor (íon característico da substância em análise) para o segundo estágio. O íon selecionado é encaminhado para uma célula de colisão (Q2), onde colide com moléculas de N₂ ou Ar e se fragmenta formando os íons produto, os quais serão analisados no quadrupolo seguinte (Q3). O quadrupolo Q3 permite que some determinados íons produto passem para o detector

(HARRIS, 2005; LANÇAS, 2009). A Figura 8 ilustra os principais componentes de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo.

Figura 8 – Figura esquemática dos principais componentes de um espectrômetro de massas.



Fonte: (<https://en.wikipedia.org/wiki/Lipidomics>).

2.3.2 Preparo de amostras para determinação multirresíduo de agrotóxicos

A diversidade de compostos químicos presentes naturalmente nos alimentos (água, proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas, minerais etc.), ocasiona dificuldades para a determinação dos contaminantes orgânicos devido a similaridade existente entre as características físico-químicas desses componentes. Além disso, um grande número de substâncias químicas diferentes têm sido empregadas como agrotóxicos e/ou medicamentos veterinários na produção de alimentos de origem vegetal e animal. Frutas, vegetais e cereais são as matrizes mais analisadas em laboratórios de rotina, apresentando frequentemente resíduos de agrotóxicos de diversas classes (ZANELLA *et al.*, 2015; PRESTES *et al.*, 2009).

Por isso, devido ao risco que estes compostos oferecem à saúde humana, além da sua persistência no meio ambiente e tendência de bioacumulação, a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos e em amostras ambientais tem se mostrado tão importante. Nos últimos anos, diversos métodos analíticos tem sido desenvolvidos para tentar determinar o maior número possível de resíduo de agrotóxicos em alimentos de forma simultânea, os chamados métodos multirresíduo. No entanto, a maioria dos métodos oficiais de análise ainda está longe do considerado ideal, ou seja, métodos de ampla aplicação, rápidos, sensíveis e com resultados confiáveis. Além disso, esses métodos frequentemente apresentam

etapas laboriosas que demandam tempo, grande custo de material e geram grandes quantidades de resíduos tóxicos (PRESTES *et al.*, 2009).

A determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos é um desafio, especialmente devido a baixa concentração dos analitos e a grande quantidade de substâncias interferentes que podem ser co-extraídas com os analitos e que podem interferir no resultado da análise (RIZZETTI *et al.*, 2015).

Desde os anos 1990, devido às fortes pressões de ambientalistas e também a fatores relacionados com a saúde humana, vários procedimentos de preparo de amostras e diversos métodos alternativos de extração foram desenvolvidos, baseados em técnicas que utilizavam pequenos volumes de solventes, para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PRESTES *et al.*, 2009; RIZZETTI *et al.*, 2016). Entre estes métodos podemos citar:

- Extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) (JARDIM, 2010);
- Dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *matrix solid phase dispersion*) (DÓREA & LOPES, 2004);
- Microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase micro-extraction*) (AUGUSTO *et al.*, 2015);
- Extração sortiva em barra magnética (SBSE, do inglês *stir bar sorptive extraction*), que fornece baixos limites de detecção, especialmente para analitos hidrofóbicos (NOGUEIRA, 2012);
- Extração por fluído supercrítico (SFE, do inglês *supercritical fluid extraction*) (LANÇAS & PELISSON, 2015);
- Extração acelerada por solventes (PLE, do inglês *pressurized liquid extraction*) (RIBAS *et al.*, 2014);
- Extração assistida por micro-ondas (MAE, do inglês *microwave assisted extraction*) (CAMEL, 2000).

Estas técnicas apresentam, dentre outras características, elevada eficiência, mas geralmente demandam investimento considerável em instrumentação. Além disso, por ter como base a instrumentação, a extração muitas vezes é automatizada, o que exige analistas treinados e etapas de limpeza entre uma extração e outra, implicando num maior tempo de análise. Outra desvantagem, na maioria das vezes, é o número limitado de compostos orgânicos que podem ser extraídos

simultaneamente. Sendo assim, estes métodos podem ser empregados em aplicações pontuais, mas ainda não são considerados ideais para um método multirresíduo (ZANELLA *et al.*, 2015; PRESTES *et al.*, 2011).

2.3.2.1 Método QuEChERS

Com o objetivo de superar as limitações dos métodos multirresíduos existentes, Anastassiades e colaboradores desenvolveram, em 2003, o método QuEChERS (do inglês, **quick, easy, cheap, effective, rugged, safe**). Tratava-se de uma nova técnica de preparo de amostra para a extração de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais, que tinha como vantagens ser rápida, fácil, econômica, efetiva, robusta e segura, explorando as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna (BANDEIRA *et al.*, 2014; PRESTES *et al.*, 2011).

O método QuEChERS baseia-se nas seguintes etapas: (1) etapa de extração, onde a amostra de interesse é agitada com acetonitrila (manualmente ou com auxílio de vortex), geralmente na proporção 1:1; (2) etapa de partição, onde é adicionado sal (sulfato de magnésio) para promover o efeito *salting out*, o tamponamento do pH do meio, além da remoção de água; e (3) etapa de limpeza do extrato, realizada por d-SPE (do inglês, *dispersive solid phase extraction*). A versão original deste método apresentou excelentes resultados para diferentes tipos de amostra. Porém, algumas aplicações mostraram que certos compostos apresentavam problemas de estabilidade e/ou recuperação de acordo com o pH da matriz. Desta forma, durante o período de otimização do método, percebeu-se que a utilização de tampões (pH 5) promoviam recuperações satisfatórias (>70%) para compostos dependentes do pH, independente da matriz utilizada (BANDEIRA *et al.*, 2014; ZANELLA *et al.*, 2015; CABRERA *et al.*, 2012).

A adição de uma etapa de tamponamento foi a primeira modificação proposta para o método QuEChERS, com o objetivo de melhorar os percentuais de recuperação. Assim, Lehotay e colaboradores, em 2005, desenvolveram o “método QuEChERS acetato”, no qual o efeito tamponante é promovido pela adição de acetato de sódio. Em 2007, Anastassiades e colaboradores propuseram o “método QuEChERS citrato”, que utiliza uma mistura de citrato de sódio diidratado e hidrogenocitrato sesquihidratado como responsáveis pelo efeito tamponante (pH 5,0-5,5). No ano seguinte, o “método QuEChERS citrato” foi oficializado pelo *Comité*

Européen de Normalisation (CEN) como método de referência na União Europeia (PRESTES *et al.*, 2011).

Devido a sua grande versatilidade, atualmente o método QuEChERS e suas modificações vem sendo aplicadas para a determinação de resíduos de vários compostos em uma grande variedade de matrizes de alimentos e ambientais. Além disso, vários sorventes e suas combinações podem ser utilizados, dependendo do tipo de matriz, técnica cromatográfica e dos tipos de compostos analisados (CABRERA *et al.*, 2012; PRESTES *et al.*, 2011).

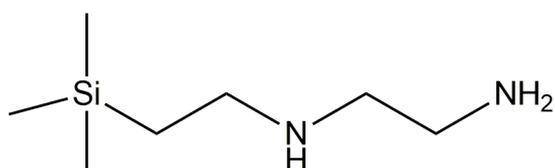
A d-SPE (do inglês, *dispersive solid phase extraction*) é uma etapa de limpeza (*clean-up*) do extrato, que foi desenvolvida simultaneamente com o método QuEChERS. Esta técnica proporciona um extrato final com menor quantidade de interferentes, aliada a um menor custo, quando comparada com técnicas tradicionais, como a SPE (do inglês, *solid phase extraction*), pois requer uma menor quantidade de sorvente e solventes, além de não haver a necessidade de trabalhar com cartuchos. Uma das principais vantagens da d-SPE é a versatilidade no estabelecimento de novos métodos, uma vez que permite a utilização de diferentes quantidades e/ou misturas de sorventes, dependendo do tipo de matriz e dos analitos de interesse. Ademais, possibilita a redução de água residual de forma rápida e simultânea com a etapa de limpeza, proporcionando um extrato final de menor polaridade, facilitando assim a precipitação de coextrativos polares. (CABRERA *et al.*, 2016; PRESTES *et al.* 2009).

Uma das etapas mais críticas da d-SPE é a seleção do(s) sorvente(s), que estão disponíveis em uma grande variedade de características químicas e tamanhos, dependendo do analito de interesse. A maioria dos sorventes disponíveis comercialmente baseia-se em grupos orgânicos ligados quimicamente à sílica (ZANELLA *et al.*, 2015).

O sorvente etilenodiamino-N-propil é uma amina primária e secundária (PSA, do inglês *primary secondary amine*) que atua como um trocador aniônico e pode interagir com outros compostos através de pontes de hidrogênio ou dipolo-dipolo. Possui forte interação com os compostos da matriz, sendo usado para remoção de vários coextrativos interferentes. A estrutura bidentada do PSA (Figura 9) tem um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário na sua estrutura, que promove a remoção de ácidos graxos livres, açúcares, pigmentos e de outros compostos polares presentes na matriz, podendo ocorrer a

retenção de alguns analitos que interferem no resultado da análise. Por outro lado, não é tão eficiente na remoção de gorduras (ZANELLA *et al.*, 2015; CABRERA *et al.*, 2012; RIZZETTI *et al.*, 2016).

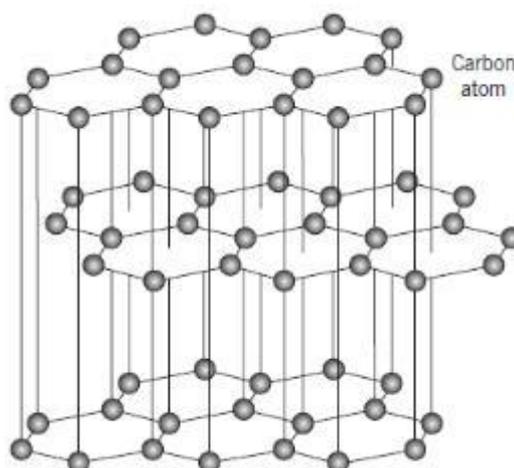
Figura 9 – Estrutura do sorvente PSA.



Fonte: Adaptado de CABRERA *et al.* (2012).

O carvão ativado, ou carbono grafitizado (GCB, do inglês *graphitized carbon black*) (Figura 10) reduz o teor de pigmentos nos extratos provenientes de amostras vegetais através da adição de uma pequena quantidade na etapa de limpeza. Possui uma grande área superficial e contém grupos altamente polares na superfície, com alto potencial para formação de pontes de hidrogênio. Em decorrência dessas características, ocorre forte retenção de analitos planares que contenham um ou mais grupos ativos em sua estrutura, resultando em baixas recuperações para estes compostos (ZANELLA *et al.*, 2015; CABRERA *et al.*, 2012).

Figura 10 – Estrutura química do sorvente carbono grafitizado GCB.



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

O sorvente octadecilsilano (C₁₈) também promove a limpeza efetiva de algumas matrizes, especialmente as que contêm gordura, pois remove com boa eficiência os interferentes apolares (ZANELLA *et al.*, 2015; CABRERA *et al.*, 2012).

Outros sorventes que também poder ser utilizados na etapa de limpeza são: C8 – remove interferentes apolares; alumina (Al₂O₃) – geralmente empregada na separação de compostos lipofílicos; florisil – utilizado para separação de analitos com baixa polaridade; terra diatomácea – cujo componente majoritário é a sílica; quitosana – biopolímero renovável, de baixo custo e suscetível a alterações químicas para aumentar sua capacidade de adsorção; nanotubos de carbono – possuem grande capacidade de adsorção; Strata-X; polímeros impressos molecularmente (MIPs); dentre outros (CABRERA *et al.*, 2012; CABRERA *et al.*, 2016; JARDIM, 2010).

2.3.2.2 Método QuEChERS sem etapa de limpeza

À medida que a instrumentação analítica avança, ela permite a utilização de métodos mais rápidos e simples de preparo de amostras, que dispensa a etapa de limpeza do extrato (SAPOZHNIKOVA, 2014).

Atualmente, métodos que utilizam apenas uma etapa de extração, dispensando a etapa de limpeza, também têm sido relatados de forma promissora para arroz (SILVA *et al.*, 2019), urina, soro, tomate, solo, formulações comerciais e amostras de água (GEBREHIWOT *et al.*, 2019), além de ser um método mais rápido e de menor custo com reagentes.

Às vezes, com a etapa de limpeza, pode-se ter valores menores de recuperação devido à perda de alguns analitos mais polares que são eliminados junto com os interferentes, ou por ficarem retidos no sorvente utilizado. Isso foi observado por Rodrigues (2010), Tomazini e colaboradores (2011) e Sampaio (2011), que optaram por utilizar o método QuEChERS sem a etapa de limpeza para análise de cebola, cana-de-açúcar e mel, respectivamente, pois perceberam uma diminuição dos valores de recuperação devido ao fato de alguns analitos ficarem muito retidos no material sorvente.

Esta ferramenta tem sido utilizada em diferentes áreas de atuação como indústrias farmacêuticas, área forense, testes antidoping e de composição e segurança alimentar (ARIAS, 2017). No entanto, ainda não existem estudos que

utilizem esta técnica para avaliação rápida de amostras de beterraba, cenoura e tomate.

2.4 OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS

Quando otimizamos um procedimento, buscamos o melhor resultado possível diante das possibilidades oferecidas pelo sistema a ser otimizado. Normalmente isso é feito de duas formas: tentativa e erro, onde são testadas diferentes condições experimentais, sem necessariamente existir alguma lógica ou critério, até que algum experimento tenha êxito, ou univariada, quando cada variável do sistema é investigada separadamente enquanto os outros fatores são mantidos constantes. Já a otimização multivariada envolve a realização de experimentos com diferentes combinações de níveis para mais de uma variável. Essas combinações são organizadas de forma específica, por isso utiliza-se frequentemente o termo “planejamento de experimentos” (OLIVEIRA *et al.* 2015).

O planejamento de experimentos utilizando princípios estatísticos é uma ferramenta extremamente útil para extrair do sistema em estudo o máximo de informações realizando o mínimo necessário de experimentos (NETO *et al.*, 2010).

O método do planejamento composto central (PCC), é uma forma de otimização simultânea das condições de análise que consiste em avaliar pontos fatoriais, axiais e centrais, obtendo as interações e efeitos principais entre as variáveis. As repetições no ponto central têm por finalidade fornecer uma medida do erro puro e estabilizar a variância da resposta prevista. Metodologias de superfície de resposta, cujo embasamento está no ajuste de uma equação polinomial a partir dos dados experimentais, também podem ser utilizadas para auxiliar na identificação das condições ideais das variáveis em um único conjunto de combinação de experimentos (NETO *et al.*, 2010).

2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Segundo o guia para validação e controle de qualidade analítica do MAPA (2011), a validação de um método analítico tem por objetivo demonstrar que o mesmo é adequado aos objetivos propostos, isto é, que os parâmetros de desempenho avaliados atendem aos critérios de aceitação recomendados. A

validação visa garantir a qualidade dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade.

Outras definições e recomendações para validação de métodos analíticos são disponibilizadas, na forma de guias, por diversos órgãos nacionais e internacionais, tais como ANVISA (2019), INMETRO (2020), Eurachem (2014), Codex Alimentarius (2001), SANTE (2019), entre outros.

A seguir são descritos alguns parâmetros avaliados neste trabalho no processo de validação do método analítico.

2.5.1 Seletividade

A seletividade de um método é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, os analitos de interesse na presença de outros componentes (outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas, produtos de degradação, outros compostos de propriedades similares etc) que possam interferir na sua determinação em uma mistura complexa. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI *et al.*, 2004).

2.5.2 Efeito matriz

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental, comprometendo o resultado (BRASIL, 2011; INMETRO, 2020).

2.5.3 Linearidade e curva analítica

Linearidade é a capacidade de o procedimento produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A faixa de trabalho linear da curva de calibração deve, necessariamente, contemplar a faixa de concentração esperada para a amostra de ensaio (BRASIL, 2011; INMETRO, 2020).

A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A relação matemática entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a concentração do analito de interesse pode ser expressa como uma equação da reta, chamada de curva analítica, cuja relação entre as duas variáveis é (INMETRO, 2020; RIBANI *et al.*, 2004):

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

onde:

y = resposta medida (sinal instrumental);

x = concentração;

a = coeficiente angular (inclinação da curva analítica = sensibilidade);

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

Além dos coeficientes de regressão (a e b), também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de determinação (r^2). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI *et al.*, 2004).

2.5.4 Precisão

Precisão é a medida de quão próximos os resultados estão um do outro. É a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. As três maneiras de expressá-la são por meio da repetitividade, da precisão intermediária (ou intralaboratorial) e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação. O coeficiente de variação (CV, usualmente expresso em %), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), é calculado da seguinte forma (BRASIL, 2011; EURACHEM, 2014, INMETRO, 2020):

$$CV (\%) = (\text{desvio padrão}) / (\text{concentração média determinada}) \times 100 \quad (2)$$

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição (mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local, repetições em um curto intervalo de tempo). A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. Já a reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos etc.) (RABANI *et al.*, 2004).

2.5.5 Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$ (SANTE, 2019).

2.5.6 Limites de detecção e de quantificação

Os termos limite de detecção e limite de quantificação são utilizados para demonstrar a habilidade do método em detectar e quantificar baixas concentrações de um analito, respectivamente (CASSIANO *et al.*, 2009).

O limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições estabelecidas para o ensaio, com um certo nível de confiança (EURACHEM, 2014, INMETRO, 2020, RIBANI *et al.*, 2004).

O limite de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*) é a menor concentração do analito que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis, utilizando um determinado procedimento experimental (EURACHEM, 2014, INMETRO, 2020, RIBANI *et al.*, 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Aqui serão descritos apenas os materiais, reagentes, preparo de soluções e instrumentação utilizada. Neste trabalho, optou-se por manter a descrição dos testes realizados nos resultados para uma melhor compreensão dos testes.

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados abaixo:

- Agitador Vortex AP56 (Phoenix Lufenco, Brasil);
- Balança analítica de precisão APX-200 (Shimadzu, Japão);
- Balança analítica de precisão AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- Balança analítica de precisão UX-420H (Shimadzu, Japão);
- Centrífuga (Centribio, Brasil);
- Centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- Centrífuga refrigerada SL 703 (Solab Científica, Brasil);
- Evaporador Turbovap LV[®] (Biotage, Alemanha);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha e Eppendorf, Canadá);
- Multiprocessador de alimentos (Philips Walita, Brasil);
- Sistema de purificação de água, Milli-Q Direct-Q[®] 3UV (Millipore, França);
- Sistema UHPLC-MS/MS, modelo Xevo TQ (Waters, EUA), contendo amostrador automático sample manager (Acquity), e equipado com:
 - Cromatógrafo líquido modelo Acquity, composto de sistema controlador de solventes (sistema binário de bombas) para operação de gradientes a alta pressão e sistema de injeção com agulha de Poliéter-éter-cetona (PEEK) dentro da agulha de aço;
 - Coluna analítica Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ (50 mm x 2,1 mm d.i., 1,7 µm) Waters (EUA);
 - Detector MS do tipo triplo quadrupolo, modelo Xevo TQ;
 - Gás argônio 6.0 usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS (White Martins, Brasil);

- Interface/Fonte de ionização por eletronebulização;
- Nitrogênio com pureza $\geq 99\%$ a partir de gerador de nitrogênio Peak Scientific (Escócia) modelo NM30L-MS;
- Sistema de aquisição de dados através do *software MassLynx 4.1* (Waters, EUA).

3.2 MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES

- Acetato de sódio anidro p.a. ACS (J.T. Baker, Japão);
- Acetona grau HPLC (Tedia High Purity Solvent, China);
- Acetonitrila grau HPLC (Sigma Aldrich, Brasil);
- Ácido acético glacial 100% (J.T. Baker, Japão);
- Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3[®] (resistividade de 18,2 M Ω cm);
- Atrazina-d5 (Padrão de Controle) (CDN Isotopes, Canadá);
- Carvão Supelclean ENVI-Carb com diâmetro de partícula 120-400 μ m (SUPELCO, EUA);
- Extran[®] neutro (Merck, Brasil);
- Filtros de seringa PTFE (0,2 μ m) (Analítica, Brasil);
- Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2 mL;
- Gás de colisão: Argônio 99,9992% de pureza (Air Products, Brasil);
- Hexano (Honeywell, Brasil);
- Microtubos tipo *Eppendorf* (2 mL) (Axygen Scientific, EUA);
- Padrões sólidos dos compostos em estudo (Tabela 5) (Dr. Ehrenstorfer, Alemanha);
- Sorvente Bondesil C₁₈ (octadecilsilano) com tamanho de partícula de 40 μ m (Agilent, EUA);
- Sorvente Bondesil PSA com tamanho de partícula de 40 μ m (Agilent, EUA);
- Sorvente carbono grafitizado (GCB) (Supelco, EUA);
- Sorvente Celite[®] (Sigma-Aldrich, Brasil);
- Sorvente Florisil[®] (Sigma-Aldrich, Brasil);
- Sorvente fase fluorada (UNICAMP, Brasil);
- Sorvente quitosana (FURG, Brasil);

- Sorvente Strata-X (Phenomenex, EUA);
- Sulfato de magnésio anidro p.a. (Scharlau, Espanha);
- Tubos de polipropileno, com tampas de rosca, capacidade de 15 e 50 mL (Sarstedt, Alemanha);
- Vidrarias de laboratório.

3.3 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

As amostras "branco" de beterraba, cenoura e tomate utilizadas para otimização e validação do método de preparo de amostra proposto neste trabalho, foram adquiridas no setor de produtos orgânicos de supermercados locais da cidade de Santa Maria (beterraba e cenoura) e de um produtor orgânico de Santo Ângelo (tomate), ambas no Rio Grande do Sul.

Uma porção de 1 kg de cada amostra (com semente e casca) foi cortada em pedaços e, então, processada em um multiprocessador de alimentos. As amostras processadas foram acondicionadas em potes de polipropileno de 200 mL sob refrigeração, em temperatura abaixo de -10°C , até sua utilização.

3.4 PREPARO DA SOLUÇÃO DE CONTROLE

Para assegurar que o procedimento de extração está sendo executado de forma correta, utilizou-se como padrão de controle a atrazina deuterada. Esta substância é adicionada à amostra antes da extração dos analitos, na mesma concentração empregada para avaliação dos ensaios de recuperação ($50\ \mu\text{g kg}^{-1}$).

3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Os compostos selecionados para este estudo são os mais comumente utilizados para estas culturas, abrangem todas as matrizes em questão e estão listados na Tabela 7, juntamente com informações sobre tais agrotóxicos.

Tabela 7 – Relação dos compostos avaliados, com informações sobre a classe, grupo químico, fórmula molecular.

(continua)

Composto	Classe(s)	Grupo Químico	Fórmula Molecular
Acetamiprido	I	Neonicotinóide	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄
Aldicarbe	A, I, N	Metilcarbamato de oxima	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S
Ametrina	H	Triazina	C ₉ H ₁₇ N ₅ S
Atrazina	H	Triazina	C ₈ H ₁₄ ClN ₅
Azaconazol	F	Triazol	C ₁₂ H ₁₁ Cl ₂ N ₃ O ₂
Azametifós	I	Organofosforado	C ₁₉ H ₁₀ ClN ₂ O ₅ PS
Azinfós etil	I	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS ₂
Azinfós metil	I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃ PS ₂
Azoxistrobina	F	Estrobilurina	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅
Boscalida	F	Anilida	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O
Bromofós metil	I	Organofosforado	C ₈ H ₈ BrCl ₂ O ₃ PS
Buprofezina	A, I	Tiadiazinona	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS
Carbaril	I, RC	Metilcarbamato de naftila	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂
Carbendazim	F	Benzimidazol	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂
Carbofurano	A, C	Metilcarbamato de benzofuranila	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃
Carbofurano-3-OH	A, C	Carbamato	C ₁₂ H ₁₅ NO ₄
Carboxina	F	Carboxanilida	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ S
Cialofope Butílico	H	Ácido ariloxifenoxipropiônico	C ₂₀ H ₂₀ FNO ₄
Cianazina	H	Triazina	C ₉ H ₁₃ ClN ₆
Ciazofamida	F	Imidazol	C ₁₃ H ₁₃ ClN ₄ O ₂ S
Cimoxanil	F	Acetamida	C ₇ H ₁₀ N ₄ O ₃
Ciproconazol	F	Triazol	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O
Clomazona	H	Isoxazolidinona	C ₁₂ H ₁₄ ClNO ₂
Clorantraniliprole	I	Antranilamida	C ₁₈ H ₁₄ N ₅ O ₂ BrCl ₂
Clorfenvinfós	A, I	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ O ₄ P
Clorimurom etílico	H	Sulfoniluréia	C ₁₅ H ₁₅ ClN ₄ O ₆ S
Clorpirifós	A, Fo	Organofosforado	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Clorpirifós-metílico	I	Organofosforado	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS
Clorprofam	H, RC	Carbamato	C ₁₀ H ₁₂ ClNO ₂
Clotianidina	I	Neonicotinóide	C ₆ H ₈ ClN ₅ O ₂ S
Cresoxim-metílico	F	Estrobilurina	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄
Deltametrina	Fo, I	Piretróide	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃
Demeton-S-metil-sulfona	A, I	Organofosforado	C ₆ H ₁₅ O ₅ PS ₂
Diazinona	A, I	Organofosforado	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS
Diclosulam	H	Sulfonanilida triazolopirimidina	C ₁₃ H ₁₀ Cl ₂ FN ₅ O ₃ S
Dicrotofós	I	Organofosforado	C ₈ H ₁₆ NO ₅ P
Difenoconazol	F	Triazol	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃
Diflubenzurom	A, I	Benzoiluréia	C ₁₄ H ₉ ClF ₂ N ₂ O ₂
Dimetoate	A, I	Organofosforado	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂
Dimoxistrobina	F	Estrobilurina	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₃
Diniconazol	F	Triazol	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O
Diuron	H	Uréia	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O
EPN	A, I	Organofosforado	C ₁₄ H ₁₄ NO ₄ PS
Epoxiconazol	F	Triazol	C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O
Espinosad A	I	Espinosinas	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₀
Espinosad D	I	Espinosinas	C ₄₂ H ₆₇ NO ₁₀
Etiofencarbe	I	Carbamato	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S
Etoprofós	I, N	Organofosforado	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₂
Etoxissulfurom	H	Sulfoniluréia	C ₁₅ H ₁₈ N ₄ O ₇ S

Composto	Classe(s)	Grupo Químico	Fórmula Molecular
Famoxadona	F	Oxazolidinadiona	C ₂₂ H ₁₈ N ₂ O ₄
Fenpiroximato	A	Pirazol	C ₂₄ H ₂₇ N ₃ O ₄
Fenpropimorfe	F	Morfolina	C ₂₀ H ₃₃ NO
Fenamidona	F	Imidazolinona	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ OS
Fenamifós	N	Organofosforado	C ₁₃ H ₂₂ NO ₃ PS
Fenarimol	F	Pirimidinil carbinol	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O
Fenazaquim	A	Quinazolina	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O
Fenhexamida	F	Amida aromática	C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ NO ₂
Fenoxicarbe	RC	Carbamato	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄
Fentiona	A, C	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂
Fipronil	C, F	Pirazol	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS
Fluazifope-P-butílico	H	Ácido ariloxifenoxipropiônico	C ₁₉ H ₂₀ F ₃ NO ₄
Fluquiconazol	F	Triazol	C ₁₆ H ₈ Cl ₂ FN ₅ O
Fluroxipir	H	Ácido pirimidiniloxibenxóico	C ₇ H ₅ Cl ₂ FN ₂ O ₃
Flutolanil	F	Carboxamida	C ₁₇ H ₁₆ F ₃ NO ₂
Fosalona	A, I	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₅ ClNO ₄ PS ₂
Fosmete	A, I	Organofosforado	C ₁₁ H ₁₂ NO ₄ PS ₂
Furatiocarbe	I	Metilcarbamato de benzofuranila	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₅ S
Hexitiazoxi	A	Tiazolidinacarboxamida	C ₁₇ H ₂₁ ClN ₂ O ₂ S
3-Hidroxicarbofurano	A, I	Carbamato	C ₁₂ H ₁₅ NO ₄
Imazalil	F	Imidazol	C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O
Imazamoxi	H	Imidazolinona	C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₄
Imazapique	H	Imidazolinona	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₃
Imazapir	H	Imidazolinona	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₃
Imazaquim	H	Imidazolinona	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃
Imazetapir	H	Imidazolinona	C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₃
Imidacloprido	I	Neonicotinóide	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂
Iprovalicarbe	F	Carbamato	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₃
Linurom	H	Uréia	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂
Malationa	A, I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂
Mecarbam	A, I	Organofosforado	C ₁₀ H ₂₀ NO ₅ PS ₂
Mefosfolan	A, I	Organofosforado	C ₈ H ₁₆ NO ₃ PS ₂
Mepronil	F	Benzamida	C ₁₇ H ₁₉ NO ₂
Metalaxil	F	Acilalaninato	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄
Metconazol	F	Triazol	C ₁₇ H ₂₂ ClN ₃ O
Metidationa	A, I	Organofosforado	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃
Metiocarbe	A, I	Metilcarbamato de fenila	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S
Metiocarbe sulfona	I	Carbamato	C ₁₁ H ₁₅ NO ₄ S
Metiocarbe sulfóxido	I	Carbamato	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃ S
Metomil	A, I	Metilcarbamato de oxima	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S
Metoxifenzida	I	Diacilhidrazina	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₃
Metribuzim	H	Triazinona	C ₈ H ₁₄ N ₄ OS
Metsulfurom-metílico	H	Sulfoniluréia	C ₁₄ H ₁₅ N ₅ O ₆ S
Mevinfós	A, I	Organofosforado	C ₇ H ₁₃ O ₆ P
Miclobutanil	F	Triazol	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄
Molinato	H	Tiocarbamato	C ₉ H ₁₇ NOS
Monocrotofós	A, I	Organofosforado	C ₇ H ₁₄ NO ₅ P
Monolinuron	H	Uréia	C ₉ H ₁₁ ClN ₂ O ₂
Nicossulfurom	H	Sulfoniluréia	C ₁₅ H ₁₈ N ₆ O ₆ S
Nuarimol	F	Pirimidina	C ₁₇ H ₁₂ ClFN ₂ O
Oxadixil	F	Oxazolidinadiona	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄
Paraoxom	I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₄ NO ₆ P
Paration	A, I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₄ NO ₅ PS

Composto	Classe(s)	Grupo Químico	Fórmula Molecular
Pencicuroom	F	Feniluréia	C ₁₉ H ₂₁ ClN ₂ O
Penconazol	F	Triazol	C ₁₃ H ₁₅ Cl ₂ N ₃
Penoxsulam	H	Sulfonânida triazolopirimidina	C ₁₆ H ₁₄ F ₅ N ₅ O ₅ S
Picoxistrobina	F	Estrobilurina	C ₁₈ H ₁₆ F ₃ NO ₄
Butóxido de piperonila	Sinérgico	Piretrina, piretroide	C ₁₉ H ₃₀ O ₅
Piraclostrobina	F	Estrobilurina	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄
Pirazofós	F, I	Fosforotioato de heterociclo	C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₅ PS
Piridabem	A, I	Piridazinona	C ₁₉ H ₂₅ ClN ₂ OS
Piridafentona	A, I	Organofosforado	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₄ PS
Piridate	H	Fenilpiridazina	C ₁₉ H ₂₃ ClN ₂ O ₂ S
Pirimetanil	F	Anilino pirimidina	C ₁₂ H ₁₃ N ₃
Pirimicarbe	I	Dimetilcarbamato	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂
Pirimifós-etílico	A, I	Organofosforado	C ₁₃ H ₂₄ N ₃ O ₃ PS
Pirimifós-metílico	A, I	Organofosforado	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS
Piriproximem	I	Éter piridiloxipropílico	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃
Profenofós	A, I	Organofosforado	C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS
Prometrina	H	Triazina	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S
Propanil	H	Anilida	C ₉ H ₉ Cl ₂ NO
Propargito	A	Sulfito de alquila	C ₁₉ H ₂₆ O ₄ S
Propiconazol	F	Triazol	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂
Propoxur	I	Metilcarbamato de fenila	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃
Protiofós	A, I	Organofosforado	C ₁₁ H ₁₅ Cl ₂ O ₂ PS ₂
Quinalfós	A, I	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃ PS
Quincloraque	H	Ácido quinolinocarboxílico	C ₁₀ H ₅ Cl ₂ NO ₂
Quinoxifen	F	Quinolina	C ₁₅ H ₈ Cl ₂ FNO
Quizalofop-e-etílico	H	Ácido ariloxifenoxipropiônico	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₂ O ₄
Saflufenacil	H	Pirimidinadiona	C ₁₇ H ₁₇ ClF ₄ N ₄ O ₅ S
Simazina	H	Triazina	C ₇ H ₁₂ ClN ₅
Tebuconazol	F	Triazol	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O
Tebufenozida	I	Diacilhidrazina	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂
Tebufenpirade	A, I	Triazol	C ₁₈ H ₂₄ ClN ₃ O
Terbufós	I, N	Organofosforado	C ₉ H ₂₁ O ₂ PS ₃
Tetraconazol	F	Triazol	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ F ₄ N ₃ O
Tiabendazol	F	Benzimidazol	C ₁₀ H ₇ N ₃ S
Tiacloprido	I	Neonicotinóide	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S
Tiametoxam	I	Neonicotinóide	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S
Tiobencarbe	H	Tiocarbamato	C ₁₂ H ₁₆ ClNOS
Tiodicarbe	I	Metilcarbamato de oxima	C ₁₀ H ₁₈ N ₄ O ₄ S ₃
Tolcofós metil	F	Organofosforado	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ O ₃ PS
Tolilfluânida	F	Fenilsulfamida	C ₁₀ H ₁₃ Cl ₂ FN ₂ O ₂ S ₂
Triadimefom	F	Triazol	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂
Triadimenol	F	Triazol	C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃ O ₂
Triazofós	A, I	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS
Triciclazol	F	Benzotiazol	C ₉ H ₇ N ₃ S
Trifloxissulfurom	H	Sulfoniluréia	C ₁₄ H ₁₃ F ₃ NaN ₅ O ₆ S
Trifloxistrobina	F	Estrobilurina	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄
Triflumurom	I	Benzoiluréia	C ₁₅ H ₁₀ ClF ₃ N ₂ O ₃
Vamidotion	I	Organofosforado	C ₈ H ₁₈ NO ₄ PS ₂

A: acaricida; C: cupinicida; F: fungicida; Fo: formicida; H: herbicida; I: inseticida; N: nematocida; RC: regulador de crescimento.

Fonte: (Autora).

Preparou-se, inicialmente, 10 mL das soluções estoque individuais de cada composto na concentração de 1000 mg L⁻¹, através do cálculo de massa a ser pesada, que leva em consideração a pureza de cada padrão, e posteriormente diluída em acetonitrila. A solução estoque individual do composto carbendazim deve ser preparada em acetonitrila 8% HCl (v/v). As soluções estoque foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura inferior a -4 °C.

A partir destas soluções estoque, foram preparadas duas misturas na concentração 5,0 mg L⁻¹ contendo os padrões desses compostos. Destas duas misturas, então, foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações de 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 250,0 µg L⁻¹ em solvente (acetonitrila) e no extrato das matrizes (beterraba, cenoura e tomate). Para injeção no sistema, UHPLC-MS/MS, as soluções foram diluídas cinco vezes em fase móvel de modo que as concentrações finais das soluções foram: 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 50,0 µg L⁻¹.

3.6 SISTEMA CROMATOGRÁFICO UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM TOMATE, BETERRABA, CENOURA

A combinação entre a aplicabilidade da cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*) aliada à grande capacidade de detecção dos analisadores de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) tornou-se uma importante ferramenta analítica na determinação de resíduos e contaminantes. Esse acoplamento possibilitou o desenvolvimento de métodos que possuem maior seletividade, sensibilidade e especificidade (CALDAS *et al.*, 2011).

Atualmente, o acoplamento do sistema de cromatografia líquida com um analisador do tipo triplo quadrupolo tem sido o mais utilizado para análises de resíduos de agrotóxicos e outros contaminantes químicos em alimentos. Estes analisadores operam através de interfaces do tipo API (do inglês *atmospheric pressure ionization*) e permitem o uso do modo SRM (do inglês *selected reaction monitoring*) para o monitoramento de uma determinada reação (CALDAS *et al.*, 2011; RIZZETTI *et al.*, 2016).

Nos instrumentos do tipo triplo quadrupolo, o íon de interesse é pré-selecionado no primeiro quadrupolo (Q1), depois, o íon é ativado na câmara de colisão (Q2) e os fragmentos desta colisão são analisados no terceiro quadrupolo

(Q3). Esse processo tem como vantagem a certeza sobre a origem dos fragmentos, uma vez que o íon precursor é selecionado antes da colisão (CALDAS *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, a cromatografia líquida de ultra-alta performance (UHPLC, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*) tem apresentado várias vantagens quando comparada com a cromatografia líquida de alta performance (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) tradicional, como aumento da resolução e detectabilidade, bem como diminuição do tempo de análise. A combinação da UHPLC com o acoplamento da espectrometria de massas em série (MS/MS) permite uma alta seletividade e sensibilidade com menor tempo de corrida cromatográfica (RIZZETTI *et al.*, 2016; MALDANER & JARDIM, 2012).

3.6.1 Fase móvel

A fase móvel empregada neste trabalho foi composta de: (A) solução aquosa 2% metanol e (B) metanol, ambas contendo ácido fórmico 0,1% (v/v) e formiato de amônio 5 mmol L⁻¹, conforme gradiente descrito na Tabela 8 a seguir. A vazão foi de 0,225 mL min⁻¹ e o tempo de corrida foi de 10 minutos.

Tabela 8 – Gradiente da fase móvel utilizada para determinação de agrotóxicos em beterraba, cenoura e tomate no sistema UHPLC-MS/MS.

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

Fonte: (Autora).

3.6.2 Condições utilizadas no sistema UHPLC-MS/MS

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

- Temperatura da coluna: 40 °C;
- Pressão: 15000 psi;
- Voltagem capilar: 2,0 kV;
- Temperatura de dessolvatação: 500 °C;
- Vazão do gás de dessolvatação (N₂): 600 L h⁻¹;
- Vazão do gás do cone (N₂): 80 L h⁻¹;
- Vazão do gás de colisão: 0,15 mL min⁻¹;
- Temperatura da fonte: 150 °C;
- Volume de injeção: 10 µL;
- Tempo de residência (*dwel time*): 0,01 s.

O espectrômetro de massas operou com ionização por eletronebulização no modo positivo e negativo (ESI+ e ESI-), empregando monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*) com duas transições para cada composto. O íon mais abundante (primeira transição) foi selecionado para a quantificação e a segunda transição foi usada para identificação (íon qualitativo) dos compostos em estudo.

O *software* MassLynx 4.1 foi utilizado para aquisição de dados e controle do sistema.

3.7 PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM TOMATE, BETERRABA E CENOURA

As amostras branco de tomate foram adquiridas de um produtor orgânico de Santo Ângelo-RS. As amostras branco se beterraba e cenoura foram adquiridas no setor de produtos orgânicos em um supermercado de Santa Maria-RS.

Uma porção de 1 kg de cada amostra foi processada de acordo com o Codex Alimentarius (CODEX, 1999), com casca e semente. As amostras foram acondicionadas em frascos de polipropileno devidamente identificados e armazenadas em freezer a -10 °C até o uso.

Três variações do método QuEChERS (original, acetato e citrato) foram avaliadas para a extração dos analitos em tomate, beterraba e cenoura. Estes testes foram realizados em amostras brancas fortificadas a 50 µg kg⁻¹. Os métodos de

extração foram avaliados segundo critérios de recuperação (%) e desvio padrão relativo (RSD%). Posteriormente, a etapa de limpeza foi avaliada.

3.8 PLANEJAMENTO FATORIAL

Os testes prévios permitiram a escolha do melhor procedimento de extração e a seleção de dois sorventes para a etapa de d-SPE. A otimização da proporção e quantidade de sorventes foi realizada através de um planejamento estatístico, mantendo-se o mesmo procedimento de preparo de amostra para as três matrizes.

Para melhorar a eficiência da etapa de limpeza, as quantidades de sorventes que apresentaram melhores resultados foram otimizadas através de planejamento composto central, do tipo estrela, com configuração randômica, utilizando o *software* Statistica 7.0, como pode ser visto na Tabela 7. O mesmo planejamento foi feito para as amostras de cenoura e tomate, as quais apresentavam os extratos com mais pigmentação, quando comparadas a beterraba. Tal procedimento não foi realizado para a matriz beterraba, pois esta apresentou extrato sem coloração.

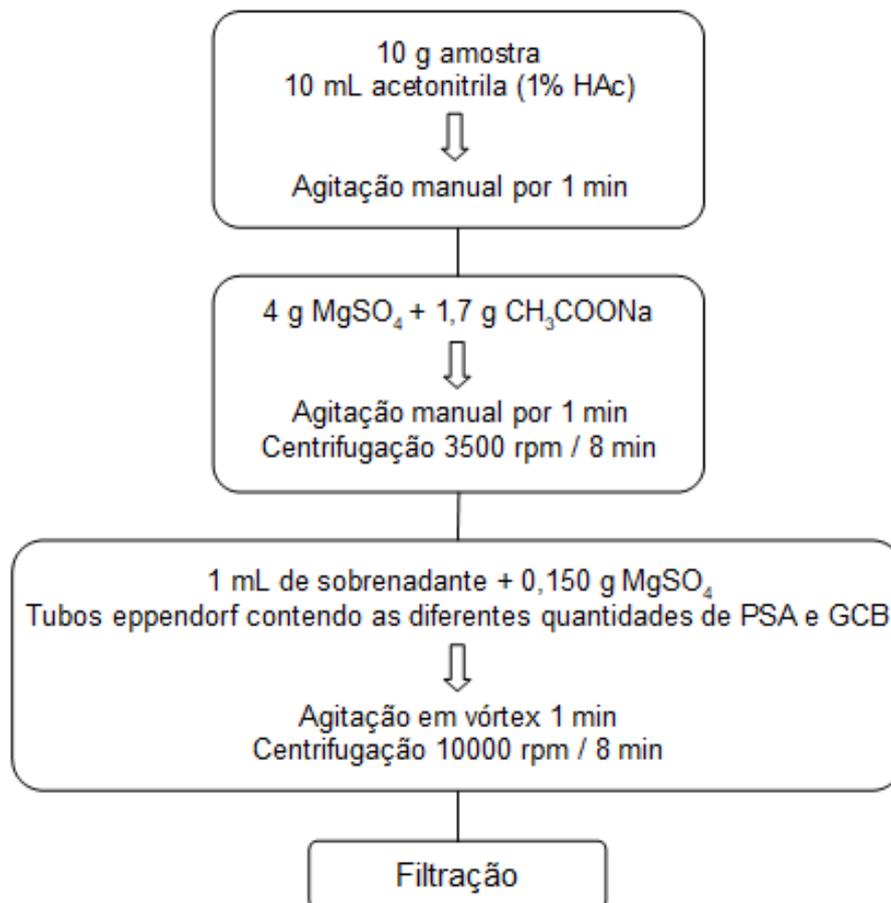
Cada planejamento gerou 10 ensaios distintos (com duplicata do ponto central), realizados em duplicata (Tabela 9). O procedimento de preparo das amostras está demonstrado na Figura 11.

Tabela 9 – Planejamento composto central para verificação do efeito dos sorventes na etapa de limpeza do extrato.

Variáveis	Ensaio									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PSA (mg)	20	100	20	100	60	60	0	60	117	60
GCB (mg)	10	10	50	50	30	30	30	58	30	0

Fonte: (Autora).

Figura 11 – Fluxograma do preparo de amostra utilizado para os ensaios do planejamento composto central (Tabela 9).



Fonte: (Autora).

Após realização do planejamento fatorial, foram ainda realizados testes de evaporação do solvente para auxiliar na avaliação da etapa de limpeza do extrato e testes com diferentes diluições do extrato sem limpeza para avaliar a resposta do sistema UHPLC-MS/MS.

3.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O método desenvolvido neste trabalho foi validado de acordo com o guia da SANTE (2019), avaliando-se a seletividade, linearidade, efeito matriz, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária) para a matriz tomate. O escopo do método foi estendido para as matrizes beterraba e cenoura, de acordo com o documento orientativo sobre validação de métodos analíticos do Inmetro (2020). Segundo este documento, a

extensão da validação deverá ser estabelecida avaliando-se, no mínimo, os parâmetros de recuperação, precisão e limites de detecção e de quantificação (INMETRO, 2020).

A seletividade foi avaliada comparando-se os cromatogramas obtidos da amostras branco e fortificadas. A linearidade foi verificada com seis níveis de concentração com critério de resíduo <20%. O efeito matriz foi estimado comparando-se a inclinação das curvas preparadas na matriz branco de extrato e de solvente (acetonitrila). Os resultados do efeito matriz foram expressos em percentual e foi considerado significativo para valores maiores que $\pm 20\%$. Além disso, para os critérios de identificação para MS/MS foram considerados: um mínimo de dois íons-produtos por composto, sinal-ruído (S/N) ≤ 3 e variação da razão dos íons entre $\pm 30\%$. A exatidão com valores entre 70-120% e valores de repetibilidade associada (RSDr) e precisão intermediária (RSDpi) $\leq 20\%$ foram adotados como critério de aceitação.

Neste estudo, para avaliação da exatidão e precisão, foram realizados ensaios de recuperação nos níveis 10, 20, 40 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=7). A precisão intermediária foi avaliada em dias diferentes, através de ensaios de recuperação no nível de fortificação de 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=7). O limite de quantificação (LOQ) do método foi estabelecido como sendo a menor concentração de analito com exatidão de 70-120% e precisão associada (RSDr) de $\leq 20\%$, em termos de repetibilidade. O limite de detecção (LOD) foi calculado dividindo-se o LOQ por 3,3.

3.10 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

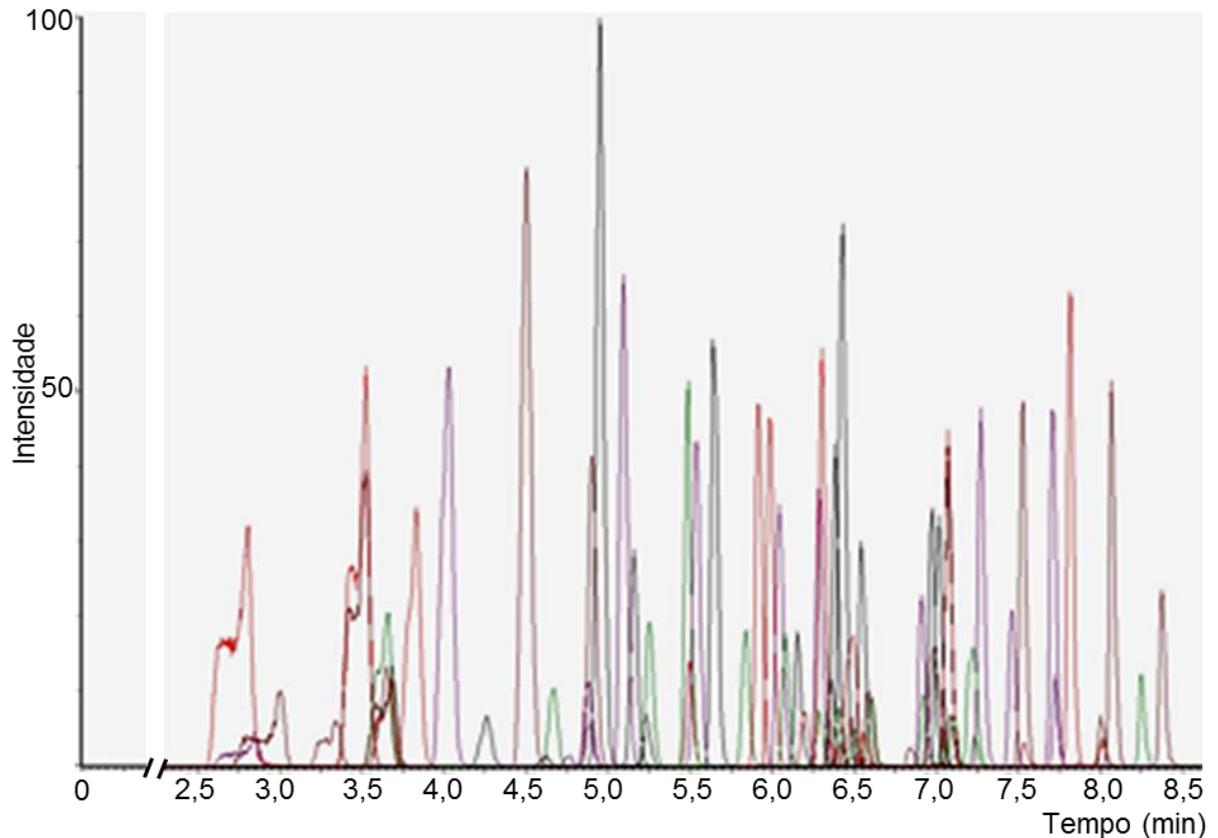
O método desenvolvido e validado neste trabalho foi aplicado para determinação de resíduos de agrotóxicos em seis amostras de tomate, três amostras de beterraba e três amostras de cenoura obtidas de produtores e mercados locais do estado do Rio Grande do Sul (Brasil).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SISTEMA CROMATOGRÁFICO UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM TOMATE, BETERRABA E CENOURA

A determinação de agrotóxicos em beterraba, cenoura e tomate utilizando o método QuEChERS sem a etapa de limpeza foi possível graças a boa seletividade e sensibilidade do sistema UHPLC-MS/MS. O gradiente de fase móvel proporcionou uma separação adequada dos compostos. Estas condições são usadas com frequência no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas – LARP (MARTINS *et al.*, 2017; de MATOS *et al.*, 2019) e fornecem sinais analíticos adequados para os compostos selecionados. As condições cromatográficas proporcionaram alta resolução e bom formato de pico para todos os compostos avaliados. Os tempos de retenção (t_R), transições (SRM), voltagens capilares (CV) e energias de colisão (EC) foram otimizadas para cada analito e são apresentadas na Tabela 13. A transição com maior intensidade foi selecionada para quantificação e a transição com a segunda intensidade mais alta foi usada para identificação. A Figura 12 apresenta o cromatograma de íons totais dos padrões na matriz branco de tomate na concentração correspondente a $20 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Figura 12 – Cromatograma de íons totais do mix de padrões na matriz branco de tomate na concentração de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$.

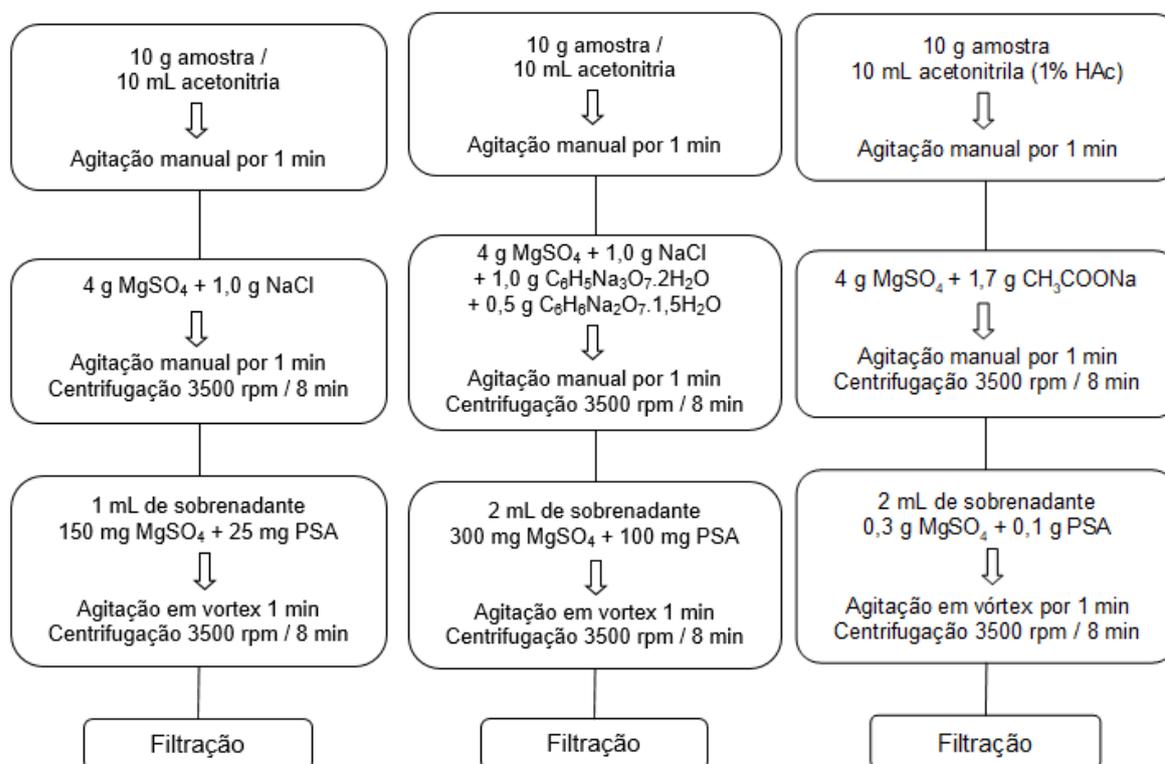


Fonte: (Autora).

4.2 OTIMIZAÇÃO DA ETAPA DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM TOMATE, BETERRABA E CENOURA

Inicialmente, foram avaliadas as três variações do método QuEChERS: original (ANASTASSIADES *et al.*, 2003), citrato (ANASTASSIADES *et al.*, 2007) e acetato (LEHOTAY *et al.*, 2005), como método de preparo de amostra para todas as matrizes, para avaliar qual apresentava melhores resultados em termos de recuperação. Um esquema de cada método pode ser visto nas Figura 13.

Figura 13 – Fluxograma das três variações do método QuEChERS: original, citrato e acetato, respectivamente.



Fonte: (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; ANASTASSIADES *et al.*, 2007; LEHOTAY *et al.*, 2005).

Para todas as matrizes (beterraba, cenoura e tomate), foram analisados todos os compostos da Tabela 6. Na Tabela 10 estão demonstrados os resultados de recuperação para os compostos validados para cada uma das matrizes em estudo. Cabe salientar que a recuperação foi avaliada de forma pontual através de uma fortificação e um padrão na matriz na concentração de 50 µg kg⁻¹.

Tabela 10 – Recuperação dos compostos analisados pelos métodos QuEChERS Acetato, Original e Citrato para as matrizes tomate, beterraba e cenoura.

(continua)

Composto	Tomate						Beterraba						Cenoura					
	Acetato		Original		Citrato		Acetato		Original		Citrato		Acetato		Original		Citrato	
	Recup. (%)	RSD (%)																
Acetamiprido	112	2	91	10	86	8	95	4	92	5	92	5	103	5	48	0	92	3
Aldicarbe	125	23	94	7	73	9	90	7	82	2	91	11	109	5	54	14	82	16
Ametrina	106	3	97	3	82	11	98	8	85	6	96	3	110	10	48	1	92	4
Azaconazol	105	5	96	2	86	8	91	2	88	5	106	3	99	7	51	4	93	5
Azametifós	116	3	109	20	81	7	95	12	88	5	100	9	107	9	49	2	94	7
Azinfós-etílico	100	9	87	9	188	66	94	43	145	38	109	33	144	4	55	26	157	53
Azinfós-metílico	82	16	83	22	102	11	118	5	97	26	108	7	123	26	53	20	89	12
Azoxistrobina	105	11	89	6	86	13	97	22	87	4	94	4	110	18	49	6	87	5
Boscalida	114	5	95	4	80	8	100	0	85	7	101	12	105	13	47	5	108	9
Buprofezina	107	12	86	4	86	9	104	9	83	2	87	3	102	13	51	3	91	8
Carbendazim	99	2	84	4	80	4	89	4	86	1	84	4	101	4	52	1	90	1
Carbofurano	107	8	105	7	98	8	122	1	91	1	127	10	109	3	50	2	99	5
Carbofurano-3-OH	103	6	92	9	77	5	88	4	84	14	100	10	99	4	48	2	90	9
Carboxina	117	5	91	7	66	14	94	8	76	12	142	12	99	3	44	2	90	27
Clorprofam	114	28	79	11	57	36	88	27	76	71	95	5	51	19	45	18	115	47
Clorpirifós	108	25	97	4	71	4	106	26	100	47	98	16	92	34	48	15	76	18
Clorpirifós-metílico	102	25	403	67	56	20	89	37	62	0	88	8	101	32	47	15	65	6
Cimoxanil	114	5	83	12	99	17	100	2	65	29	486	96	113	8	38	3	90	25
Clomazona	120	9	110	3	81	6	97	4	84	2	115	4	89	1	48	8	89	3
Clorantranilipore	113	7	94	3	63	8	119	30	111	20	71	5	115	7	53	9	76	10
Clorfenvinfós	108	25	97	4	71	4	161	17	115	11	122	34	122	26	50	7	90	13
Clotianidina	97	14	113	6	92	15	89	10	83	2	105	4	102	2	52	7	99	10
Cresoxim-metílico	109	40	90	3	184	19	125	1	83	6	127	47	72	16	64	29	108	34
Cianazina	120	12	105	3	84	17	95	9	88	1	105	2	118	7	49	1	80	2
Ciproconazol	119	1	79	11	63	1	88	28	100	19	91	10	97	18	50	9	112	9

Composto	Tomate						Beterraba						Cenoura					
	Acetato		Original		Citrato		Acetato		Original		Citrato		Acetato		Original		Citrato	
	Recup. (%)	RSD (%)																
Deltametrina	86	4	98	4	71	4	123	5	106	18	126	5	106	19	54	3	81	12
Demeton-S-metil-sulfona	101	8	89	5	80	10	96	6	80	8	107	6	105	5	48	1	91	9
Diclosulam	96	14	111	11	67	24	102	3	99	23	78	3	112	15	52	2	97	2
Dicrotofós	101	4	89	7	79	7	87	11	79	1	94	1	93	4	49	4	98	5
Difenoconazol	115	10	94	1	86	14	111	12	90	14	165	4	104	19	47	2	96	6
Diflubenzurom	116	14	98	4	101	11	102	24	103	6	93	1	86	19	53	7	86	9
Dimetoato	99	5	98	5	77	5	102	8	86	3	104	2	96	2	51	2	91	5
Dimoxistrobina	148	17	142	12	96	12	106	35	89	2	136	16	86	16	50	3	116	8
Diniconazole	120	26	84	16	128	4	127	10	103	29	74	37	78	0	39	8	98	19
Diuron	112	5	106	7	90	7	92	8	83	6	100	10	107	12	53	2	103	2
EPN	111	14	82	19	86	4	103	16	84	14	111	11	91	9	38	11	102	15
Epoconazole	110	18	89	5	83	6	109	13	105	11	92	6	104	15	46	3	110	14
Espinosade A	113	28	104	17	79	11	120	13	101	8	104	7	131	24	42	6	82	9
Espinosade D	105	26	102	17	82	12	118	5	89	9	96	14	111	18	52	11	82	18
Etoxissulfurom	119	21	83	21	87	6	101	24	72	4	95	18	76	11	75	17	92	21
Etoprofós	97	6	86	2	93	4	92	11	81	2	80	4	97	19	48	7	96	6
Famoxadona	73	21	60	14	123	54	104	50	56	27	103	24	79	20	52	15	73	20
Fenamidona	99	11	116	6	89	6	82	3	83	2	101	1	109	18	54	12	85	9
Fenamifós	118	10	93	2	91	6	111	15	87	4	104	7	95	20	51	6	91	15
Fenarimol	102	11	87	22	84	9	87	12	79	19	111	28	148	14	38	6	96	3
Fenazaquim	85	26	89	0	71	5	111	5	98	4	90	10	81	33	51	3	86	5
Fenoxicarbe	97	12	88	12	110	12	104	15	70	12	96	6	84	26	45	13	91	4
Fenpropimorfe	85	11	126	21	75	6	88	10	100	14	107	13	86	9	55	5	78	13
Fenpiroximato	116	2	93	2	97	2	111	1	92	14	96	10	109	14	51	7	101	13
Fentiona	116	36	108	15	82	34	111	8	84	3	175	42	98	23	38	7	82	16
Fipronil	111	30	93	6	94	36	124	2	52	17	111	8	85	26	59	15	82	8
Fluazafope-p-butílico	103	6	92	3	77	5	107	12	96	3	101	5	96	17	50	3	99	14

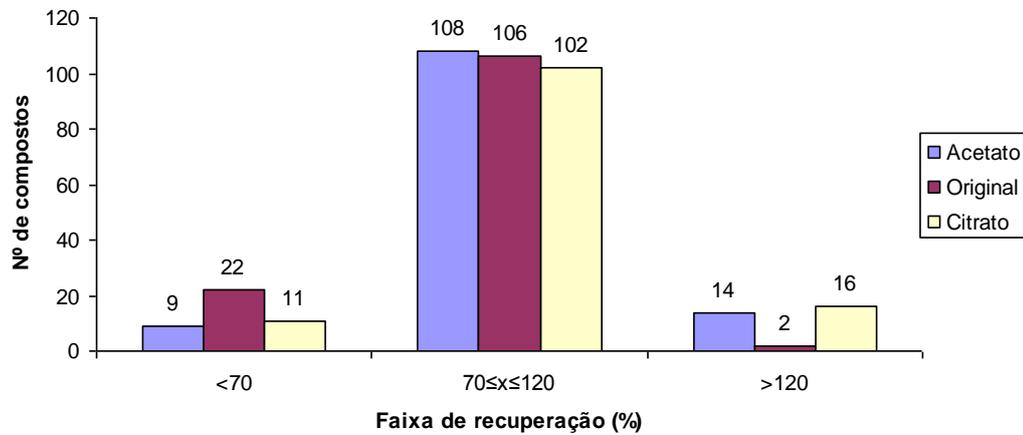
Composto	Tomate						Beterraba						Cenoura					
	Acetato		Original		Citrato		Acetato		Original		Citrato		Acetato		Original		Citrato	
	Recup. (%)	RSD (%)																
Fluquiconazol	118	4	114	19	81	3	118	34	88	11	107	8	116	8	52	1	101	9
Fluroxipir	60	8	55	19	50	5	49	13	43	21	32	14	46	18	45	7	24	11
Flusilazol	113	8	93	5	96	11	101	13	80	9	108	6	92	11	50	8	93	3
Flutolanil	103	21	104	6	9	9	153	18	89	6	96	9	88	4	47	6	152	18
Furatiocarbe	104	12	100	5	87	6	67	5	90	4	86	3	89	11	49	4	100	3
Hexitiazoxi	115	16	88	5	74	3	113	9	91	1	90	6	102	12	48	3	93	4
Imazamoxi	67	5	55	18	36	2	35	4	24	6	29	6	32	8	33	10	34	8
Imazapique	63	4	52	16	34	5	41	1	29	7	30	7	39	2	37	3	31	7
Imazapir	32	2	38	15	23	4	17	1	16	3	24	9	15	2	21	2	25	7
Imazaquim	84	8	53	21	38	2	57	4	37	14	34	11	57	4	44	6	34	11
Imazetapir	85	5	67	16	41	5	64	2	39	12	41	10	56	4	41	2	36	9
Imidacloprido	106	8	92	7	77	15	92	8	86	3	96	4	106	6	52	3	83	8
Iprovalicarbe	105	17	104	1	78	9	129	7	97	13	75	10	103	24	56	15	87	8
Linuron	113	17	95	6	83	8	75	7	82	4	96	6	95	14	48	10	91	2
Mecarbam	118	4	73	14	94	24	88	14	63	6	122	30	103	9	56	13	144	28
Mefosfolam	119	7	105	9	81	8	90	7	78	3	106	6	104	10	52	3	85	4
Mepronil	105	18	97	5	79	11	119	15	91	6	122	7	89	17	47	3	96	5
Metalaxil	106	9	108	2	83	13	98	9	88	4	101	5	102	7	50	2	95	5
Metconazol	111	8	92	10	112	10	96	6	101	10	115	22	118	19	55	10	73	14
Metidationa	114	15	108	6	76	15	101	14	88	2	82	4	114	14	51	3	99	2
Metiocarbe sulfona	155	21	82	8	81	6	93	4	50	-	-	-	97	2	15	20	165	152
Metiocarbe sulfóxido	105	3	71	14	123	73	94	6	57	29	395	117	98	5	38	7	85	29
Metomil	104	5	89	8	81	16	136	14	91	1	78	7	135	9	49	2	97	9
Metoxifenoazida	97	13	89	12	73	8	136	27	63	18	100	22	110	6	40	11	92	13
Metribuzim	192	6	150	3	119	1	90	7	66	5	85	5	154	14	63	10	87	5
Metsulfurom-metílico	75	12	82	12	98	7	107	4	75	1	79	6	87	5	47	4	85	3
Mevinfós	105	15	98	7	69	14	95	3	90	4	100	9	93	6	48	3	93	7

Composto	Tomate						Beterraba						Cenoura					
	Acetato		Original		Citrato		Acetato		Original		Citrato		Acetato		Original		Citrato	
	Recup. (%)	RSD (%)																
Molinato	109	4	86	6	89	9	77	8	87	11	70	19	123	33	39	12	91	27
Monocrotofós	115	14	79	18	99	13	91	6	84	7	99	1	97	7	48	1	84	6
Monolinuron	105	4	94	5	76	7	98	5	90	1	115	10	106	5	47	4	83	7
Nicosulfurom	120	12	90	12	82	7	77	4	59	11	57	9	80	1	46	2	60	8
Nuarimol	98	1	76	12	59	3	88	26	91	9	108	31	134	5	44	5	99	11
Parationa-etilíca	141	27	121	9	122	5	143	21	69	7	63	9	98	10	37	6	116	25
Pencicurom	99	16	88	4	91	3	104	14	89	7	90	8	94	5	45	5	85	10
Penconazol	115	5	86	5	89	11	93	6	91	4	95	4	87	6	52	2	90	6
Penoxsulam	93	5	93	4	98	6	109	12	81	1	81	8	98	11	54	4	88	7
Fosalone	115	15	89	13	73	12	79	7	110	1	158	24	77	16	87	32	58	31
Fosmete	81	25	120	47	112	10	98	5	73	15	288	66	119	22	46	2	90	16
Picoxistrobina	117	12	85	14	96	21	74	7	89	2	91	1	112	3	56	8	96	14
Piperonil-butóxido	109	6	83	17	103	12	95	7	87	0	99	5	102	8	48	3	95	3
Pirimicarbe	119	11	89	6	88	4	93	3	88	1	94	5	96	4	49	2	88	3
Pirimifós-etílico	118	4	91	13	80	5	107	8	90	0	96	5	93	14	48	4	98	9
Pirimifós-metílico	105	7	88	4	81	6	115	24	95	1	93	4	96	18	-	-	112	4
Piriproxifeno	101	18	94	15	79	10	97	9	102	18	100	18	112	14	49	8	94	16
Profenofós	104	8	105	7	68	7	107	12	86	2	99	3	87	12	46	4	107	9
Propargito	112	7	93	6	74	7	105	7	96	16	100	13	99	15	47	5	81	8
Propiconazol	106	8	90	1	74	4	90	6	92	2	110	12	99	20	47	3	89	5
Propoxur	117	12	108	2	85	5	105	6	82	4	94	4	99	1	51	2	86	5
Piraclostrobina	112	4	96	9	79	6	119	3	81	13	95	6	83	5	39	10	83	2
Pirazofós	119	11	120	20	73	18	81	8	67	17	102	8	102	13	46	4	85	9
Piridafentiona	109	4	110	6	75	3	81	11	85	2	97	5	105	11	57	6	107	12
Piridato	112	13	93	10	84	15	109	13	76	68	15	19	102	22	57	4	21	7
Pirimetanil	118	9	80	15	21	2	93	3	83	2	99	5	112	2	45	5	110	9
Quinalfos	121	4	76	3	78	12	92	18	94	7	85	14	88	9	42	8	91	5

Composto	Tomate						Beterraba						Cenoura					
	Acetato		Original		Citrato		Acetato		Original		Citrato		Acetato		Original		Citrato	
	Recup. (%)	RSD (%)																
Quinclorac	111	16	122	13	89	6	33	6	23	7	29	10	31	1	28	2	39	8
Quinoxifen	53	3	59	22	39	3	126	9	79	2	96	4	99	15	43	4	76	10
Quizalofope-p-etílico	111	7	84	9	65	6	119	14	91	3	91	5	94	12	42	4	96	5
Saflufenacil	105	3	103	5	79	6	86	4	81	6	84	4	102	7	48	1	94	9
Simazina	104	1	94	9	83	2	96	1	87	1	108	4	103	3	52	5	91	11
Tebuconazol	101	4	94	14	77	6	86	20	64	10	91	14	54	21	57	7	147	31
Tebufenozida	105	17	91	4	89	12	117	28	88	6	108	23	120	12	38	6	94	32
Tebufenpirada	89	2	70	16	86	13	104	11	84	6	98	10	100	6	46	6	115	12
Terbufós	105	15	87	11	89	8	96	34	106	16	91	19	122	25	50	48	87	20
Tetraconazol	107	4	121	44	41	7	78	22	98	13	112	11	118	10	41	6	129	9
Tiabendazol	118	31	112	6	91	11	89	8	78	1	96	3	98	4	49	1	92	3
Tiacloprido	101	3	77	8	75	4	95	3	88	0	97	3	98	3	51	2	90	3
Tiametoxam	109	2	94	8	82	5	92	7	83	1	96	2	101	7	56	0	90	5
Tiodicarbe	114	3	80	4	73	11	53	13	61	1	108	8	35	1	47	6	75	9
Tiobencarbe	108	7	102	10	83	8	115	10	92	5	88	6	96	15	42	7	79	2
Tiofanato-metílico	97	6	87	3	83	10	119	5	67	24	-	-	75	7	46	6	104	30
Tolcofós-metílico	121	8	99	12	77	21	125	23	129	16	83	10	86	5	32	18	50	17
Tolifluanida	78	14	127	17	75	5	18	2	75	52	180	84	40	11	78	15	67	18
Triadimenol	113	6	123	46	72	17	116	39	75	29	161	22	87	33	53	17	84	8
Triazofós	177	26	58	11	90	30	120	36	105	0	112	6	100	22	48	6	96	6
Triciclazol	110	2	135	4	81	5	90	3	86	2	94	3	99	7	48	1	87	2
Trifloxissulfurom	111	1	91	13	79	6	109	15	66	21	59	16	97	13	49	2	83	11
Trifloxistrobina	113	6	92	12	72	12	119	23	84	1	101	5	72	5	48	4	88	2
Triflumurom	93	6	84	5	81	9	83	18	86	3	91	14	85	8	47	13	82	15
Vamidotiona	111	6	75	14	78	11	100	10	83	4	102	7	97	8	52	1	84	6

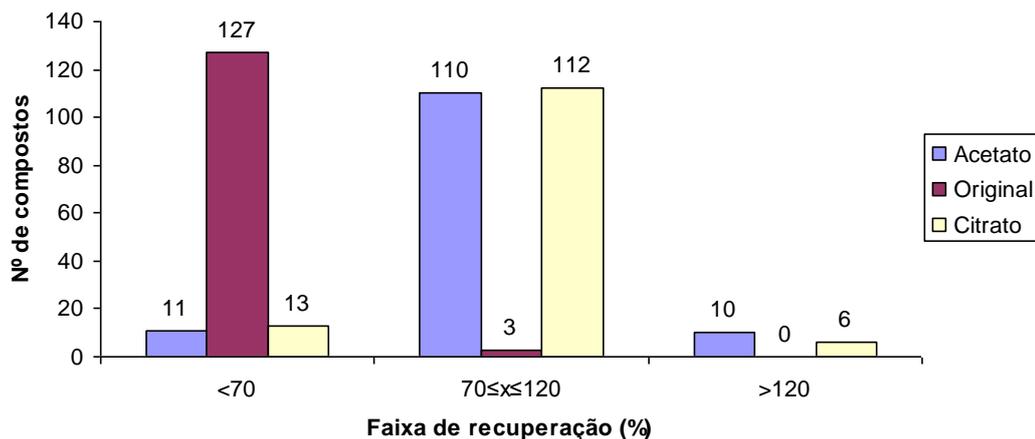
Fonte: (Autora).

Figura 14 – Gráfico do número de compostos por faixa de recuperação para a matriz beterraba pelo método QuEChERS acetato, original e citrato.



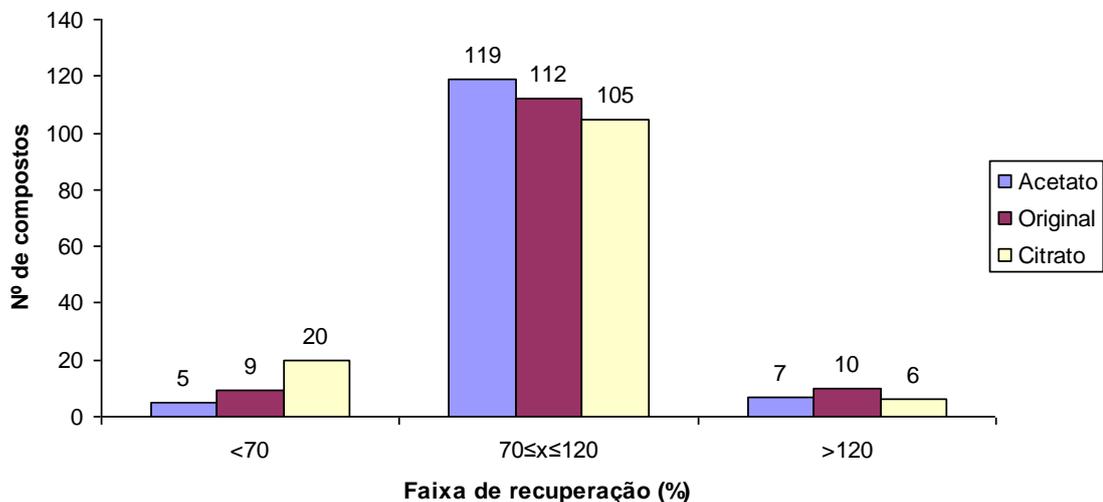
Fonte: (Autora).

Figura 15 – Gráfico do número de compostos por faixa de recuperação para a matriz cenoura pelo método QuEChERS acetato, original e citrato.



Fonte: (Autora).

Figura 16 – Gráfico do número de compostos por faixa de recuperação para a matriz tomate pelo método QuEChERS acetato, original e citrato.



Fonte: (Autora).

Os resultados de recuperação evidenciaram que os métodos tamponados obtiveram maior número de compostos com recuperações na faixa aceitável de 70-120% (SANTE, 2019) quando comparado ao método original, como fica evidenciado nas Figuras 14 a 16. Entre os compostos analisados, uma grande parte deles depende do pH do meio e assim o uso de um meio tamponado permite a extração, bem como a reprodutibilidade do método para os compostos em estudo. Neste trabalho, o método QuEChERS acetato foi escolhido, uma vez que apresentou um maior número de compostos com recuperação entre 70-120%.

Além disso, para avaliação inicial da limpeza dos extratos foram realizados testes gravimétricos em triplicata com e sem a etapa de limpeza. Para isso, 5 mL de cada extrato passou por um processo de secagem utilizando concentrador TurboVap®, sob fluxo de nitrogênio e a 70 °C. Os tubos de vidro contendo os resíduos foram então pesados para avaliação da remoção de coextrativos. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Teste gravimétrico sem a etapa de limpeza e com a etapa de limpeza, respectivamente.

	Média Tubos (g)	Média Tubos + Resíduo (g)	Diferença (g)
1TS	13,22902	13,24272	0,01370
2TS	13,22940	13,24078	0,01138
3TS	13,19252	13,20437	0,01184
1BS	13,06494	13,07113	0,00619
2BS	13,15299	13,16075	0,00776
3BS	13,11843	13,12701	0,00858
1CS	13,08231	13,08955	0,00723
2CS	13,13720	13,14413	0,00693
3CS	13,19107	13,19896	0,00790
1TC	13,15364	13,15932	0,00568
2TC	13,28500	13,28946	0,00446
3TC	13,20393	13,20832	0,00439
1BC	13,01027	13,01278	0,00251
2BC	13,18546	13,18838	0,00292
3BC	13,26630	13,26926	0,00296
1CC	12,66408	12,66685	0,00277
2CC	13,14190	13,14469	0,00279
3CC	13,16301	13,16616	0,00315

1TS, 2TS e 3TS= amostras de tomate sem limpeza; 1BS, 2BS e 3 BS= amostras de beterraba sem limpeza; 1CS, 2CS e 3CS= amostras de cenoura sem limpeza; 1TC, 2TC e 3TC= amostras de tomate com limpeza; 1BC, 2BC e 3BC= amostras de beterraba com limpeza; 1CC, 2CC e 3CC= amostras de cenoura com limpeza.

Fonte: (Autora).

A remoção de coextrativos foi calculada de acordo com a diferença em massa de coextrativos antes e depois do processo de limpeza com sorvente, de acordo com a equação 3 (SAPOZHNIKOVA & LEHOTAY, 2013). Os resultados são apresentados na Tabela 12.

$$\%Coextrativos = \frac{C_a - C_d}{C_a} \times 100 \quad (3)$$

Em que:

Ca: massa dos coextrativos antes da etapa de limpeza

Cd: massa dos coextrativos depois da etapa de limpeza

Tabela 12 – Resultados dos cálculos de % de coextrativos.

	%
	Coextrativos
1T	58,52591
2T	60,81991
3T	62,93273
1B	59,47255
2B	62,41409
3B	65,54002
1C	61,75115
2C	59,74026
3C	60,10975

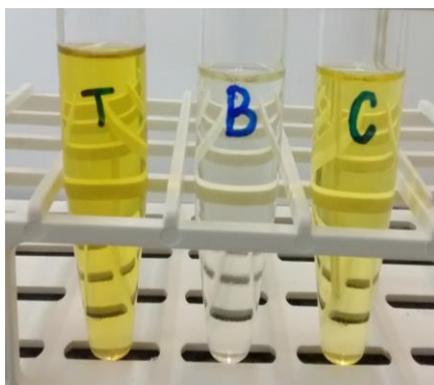
Fonte: (Autora).

O teste gravimétrico demonstrou que não há diferença entre os percentuais removidos, uma vez que o principal problema das matrizes são os pigmentos, os quais não interferem na massa em testes gravimétricos. Isso ocorre, possivelmente, devido ao caráter hidrofílico de alguns destes compostos, que acabam sendo eliminados junto com a fase aquosa.

Na sequência, foram realizados testes com o método QuEChERS acetato, utilizando diferentes sorventes e diferentes combinações de sorventes para as três matrizes. Os sorventes testados e suas respectivas quantidades, para 1 mL de extrato, foram: quitosana, 125 mg (1) (Francesquett *et al.*, 2019); Strata-X, 125 mg (2); PSA, 125 mg (3); PSA + C18, 125 mg + 250 mg (4); PSA + florisil não ativado,

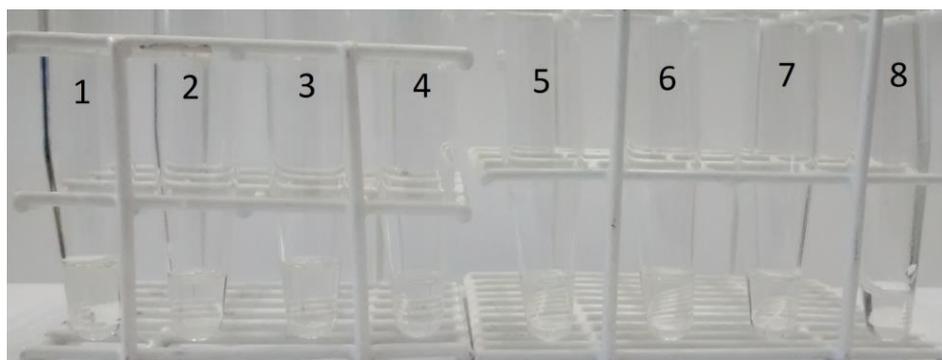
125 mg + 250 mg (5); PSA + florisil ativado, 125 mg + 250 mg (6); PSA + GCB, 125 mg + 50 mg (7); PSA + C18 + GCB, 125 mg + 250 mg + 50 mg (8). Estes testes prévios foram realizados para verificar se houve ou não alteração visual na pigmentação dos extratos, como pode ser visto nas Figuras 17 a 20. Nesta etapa não foi feita fortificação das amostras nem injeção dos extratos no equipamento.

Figura 17 – Extratos das amostras de tomate (T), beterraba (B) e cenoura (C), sem etapa de limpeza.



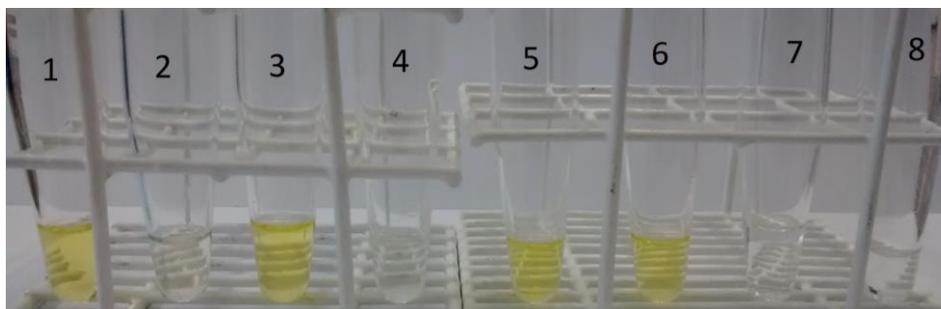
Fonte: (Autora).

Figura 18 – Extratos de beterraba após etapa de limpeza com os sorventes: quitosana (1); Strata-X (2); PSA (3); PSA + C18 (4); PSA + florisil não ativado (5); PSA + florisil ativado (6); PSA + GCB (7) e PSA + C18 + GCB (8).



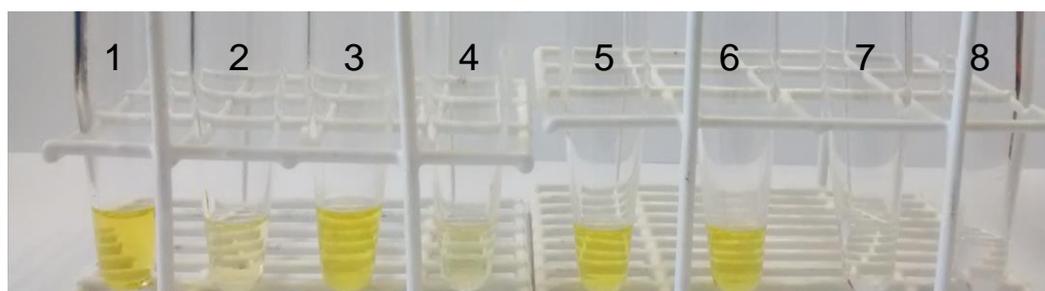
Fonte: (Autora).

Figura 19 – Extratos de cenoura após etapa de limpeza com os sorventes: quitosana (1); Strata-X (2); PSA (3); PSA + C18 (4); PSA + florisil não ativado (5); PSA + florisil ativado (6); PSA + GCB (7); PSA + C18 + GCB (8).



Fonte: (Autora).

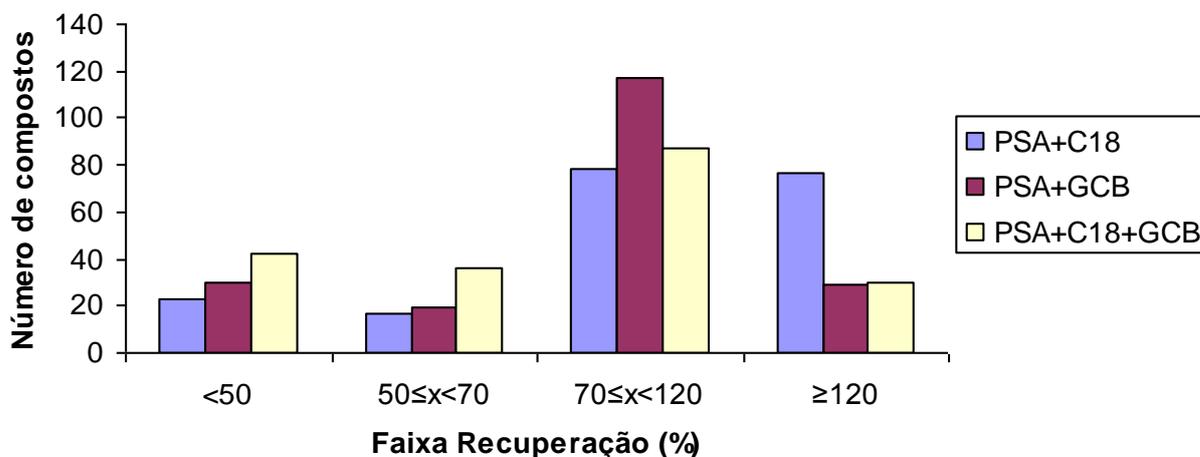
Figura 20 – Extratos de tomate após etapa de limpeza com os sorventes: quitosana (1); Strata-X (2); PSA (3); PSA + C18 (4); PSA + florisil não ativado (5); PSA + florisil ativado (6); PSA + GCB (7); PSA + C18 + GCB (8).



Fonte: (Autora).

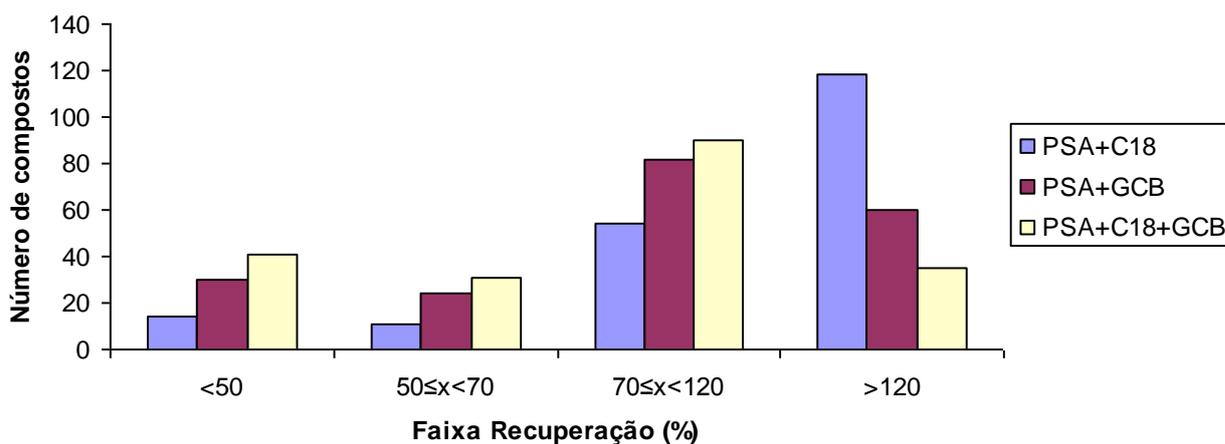
Como pode ser visto nas Figuras 18, 19 e 20, as combinações de sorventes que apresentaram melhor remoção dos pigmentos dos extratos foram: PSA + C18, PSA + GCB e PSA + C18 + GCB. A partir destas combinações de sorventes para d-SPE, ensaios de fortificação foram realizados e avaliados de forma pontual com a concentração final de $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados foram divididos em faixas de recuperação, para verificar quantos compostos estavam dentro de um intervalo aceitável de recuperação, como pode ser visto nos gráficos das Figuras 21 e 22. Uma tabela com as médias de recuperação também é apresentada a seguir (Tabela 13). Estes testes não foram realizados para a matriz beterraba, pois todos os extratos obtidos apresentaram-se límpidos após a etapa de limpeza, possivelmente devido a hidrossolubilidade das betaleínas na fase aquosa e sua instabilidade com variações de pH (SCHIOZER & BARATA, 2007; VOLP *et al.*, 2009).

Figura 21 – Gráfico do número de compostos por faixa de recuperação (%) para a matriz cenoura.



Fonte: (Autora).

Figura 22 – Gráfico do número de compostos por faixa de recuperação (%) para a matriz tomate.



Fonte: (Autora).

Tabela 13 – Médias de recuperação dos compostos para as matrizes cenoura e tomate utilizando as combinações de sorventes PSA+C18, PSA+GCB e PSA+C18+GCB.

	Recuperação média (RSD) (%)		
	PSA+C18	PSA+GCB	PSA+C18+GCB
Cenoura	118 (7)	92 (2)	81 (13)
Tomate	134 (9)	112 (8)	92 (14)

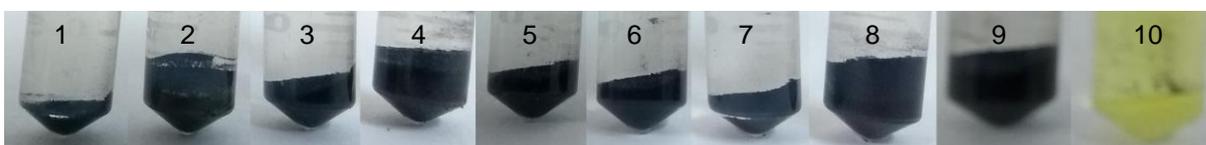
Fonte: (Autora).

Como se pode observar na Tabela 13, os sorventes PSA+C18 e PSA+GCB foram os que apresentaram as melhores médias de recuperação, com um maior número de compostos na faixa de 70 a 120% de recuperação.

Os resultados de recuperação e a avaliação visual dos extratos permitiram concluir que a combinação dos sorventes PSA e GCB é a ideal quando comparada as demais combinações empregadas, uma vez que foi possível a extração da maioria dos compostos e a maior remoção de pigmentos.

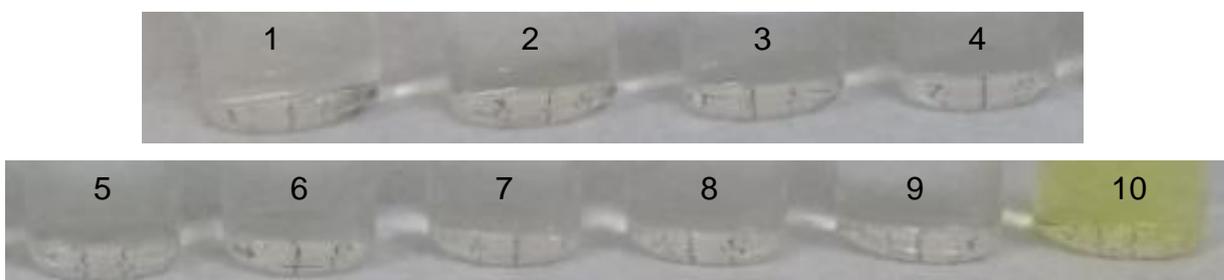
Após selecionada a combinação de sorventes a ser utilizada, foi realizado um planejamento fatorial em que os resultados foram avaliados em função das áreas obtidas dos picos cromatográficos, bem como considerando a pigmentação dos extratos finais visualmente, como pode ser observado nas Figuras 23 a 26. O extrato número 10 não continha GCB e foi o único que não ficou limpo. Portanto, um mínimo de GCB deve ser utilizado na etapa de limpeza para uma melhor remoção dos pigmentos.

Figura 23 – Extratos de tomate após etapa de limpeza e centrifugação para os ensaios da Tabela 7.



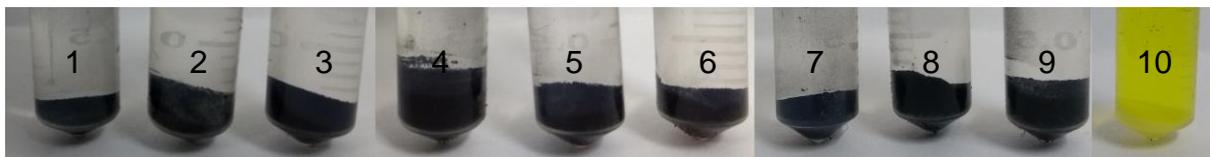
Fonte: (Autora).

Figura 24 – Extratos de tomate após etapa de filtração para os ensaios da Tabela 7.



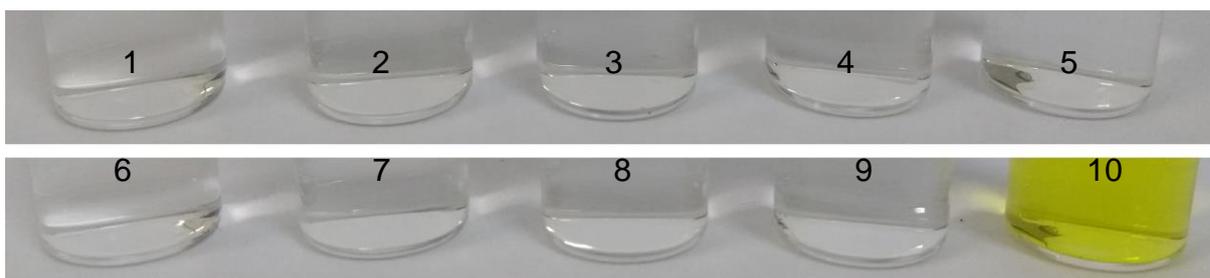
Fonte: (Autora).

Figura 25 – Extratos de cenoura após etapa de limpeza e centrifugação para os ensaios da Tabela 7.



Fonte: (Autora).

Figura 26 – Extratos de cenoura após etapa de filtração dos ensaios da Tabela 7.



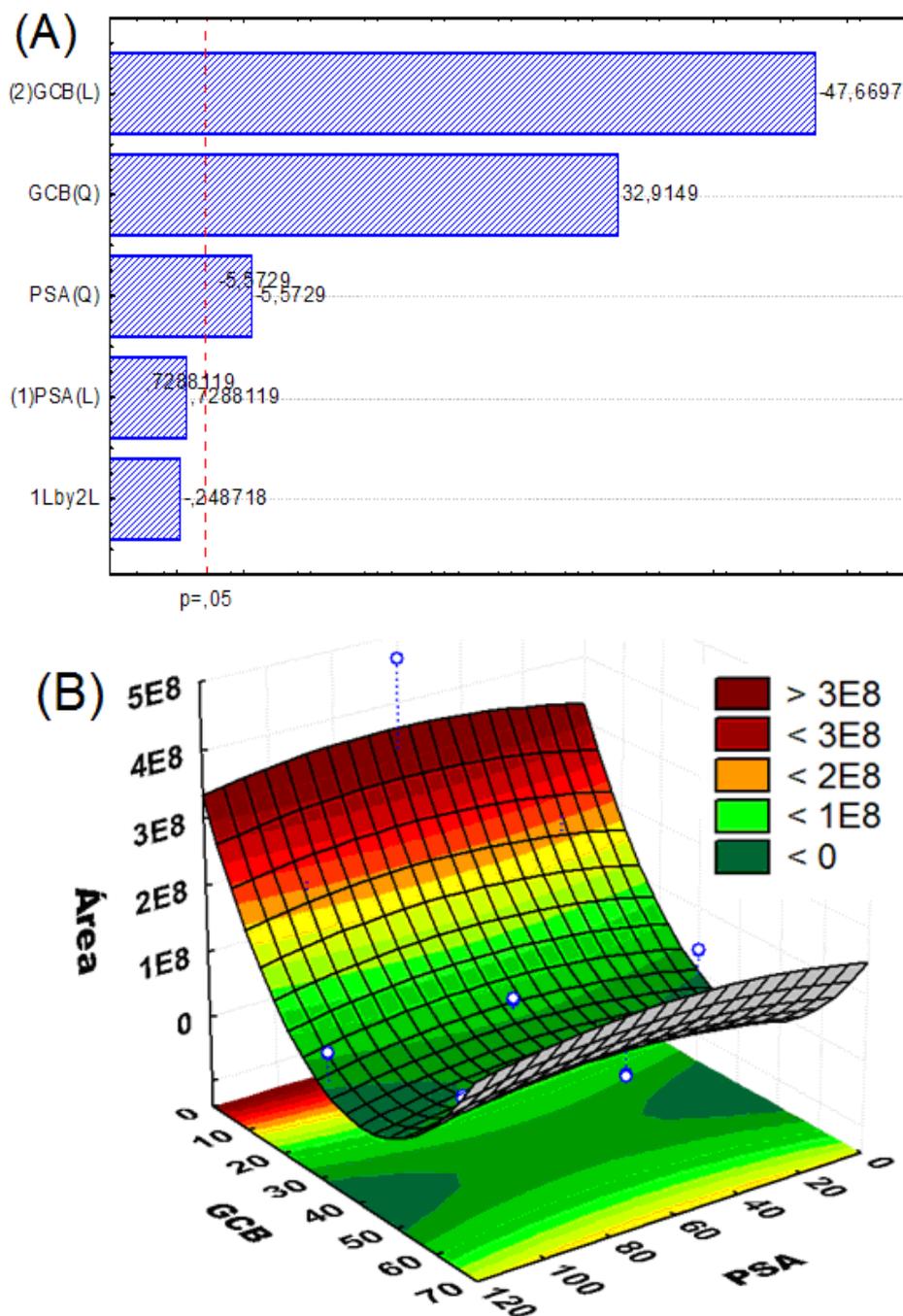
Fonte: (Autora).

A fim de verificar a influência das variáveis PSA e GCB, foram gerados gráficos de Pareto e, após, geradas superfícies de resposta para indicar as melhores condições. Os resultados, de forma geral, apresentaram as mesmas características, que podem ser divididas em dois grupos: os compostos nos quais não há diferença nas respostas empregando GCB e aqueles que são afetados por este sorvente. Os compostos azinfós-etil, carbendazim, clorpirifós, deltametrina, fosadona, fosmete, terbufós, tebuconazol, tiabendazol, entre outros, apresentaram diminuição de áreas quando utilizado GCB, enquanto que para os demais compostos não há diferença em termos de resposta. Isto ocorre, pois os compostos citados são planares e são conhecidos por ficarem retidos no GCB.

Na Figura 27 pode ser visto o diagrama de Pareto (A) e o gráfico de superfície de resposta (B), gerado pelo *software* Statistica, para o composto carbendazim. Neste gráfico (Figura 27B), pode se observar que o GCB exerce efeito negativo sendo estatisticamente significantes com nível de confiança de 95% ($p = 0,05$). A influência do GCB sobre a resposta é confirmada quando avaliadas as superfícies de respostas (Figura 27A) que indicam que melhores áreas são obtidas no instrumento quando são utilizadas baixas quantidades de GCB. Por outro lado, a superfície indica que a quantidade de PSA não influencia nas áreas obtidas. Dessa

forma, optamos por utilizar 5 mg de GCB e 50 mg de PSA para 1 mL de extrato visando obter extratos limpos e com a maior resposta (área) possível.

Figura 27 – Gráfico de Pareto (A) e superfície de resposta (B) resultantes do planejamento composto central para o composto carbendazim.



Fonte: (Autora).

Para se certificar de que a escolha do sorvente (PSA+GCB) estava adequada, foram realizados mais alguns testes utilizando o método QuEChERS acetato, com outros sorventes, para as três matrizes. Os sorventes utilizados e suas respectivas

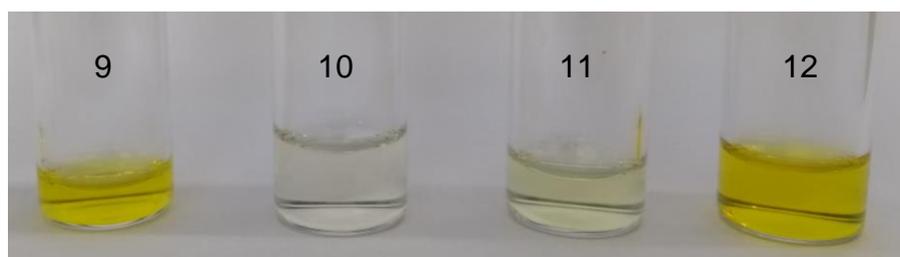
quantidades, para 1 mL de extrato, foram: celite, 100 mg (9); GCB, 5 mg (10); C18, 150 mg (11) e fase fluorada, 75 mg (12) (Martins *et al.*, 2017). Nestes testes também foi verificado se houve ou não alteração visual na pigmentação dos extratos, como pode ser visto nas Figuras 28 a 30. Foram realizados ensaios de fortificação das amostras. Os extratos foram injetados no equipamento e avaliados de forma pontual com a concentração final de $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados foram divididos em grupos, para verificar quantos compostos estavam dentro de uma faixa aceitável de recuperação, como pode ser visto na Tabela 14.

Figura 28 – Extratos de beterraba após etapa de limpeza com os sorventes: celite (9); GCB (10); C18 (11); fase fluorada (12).



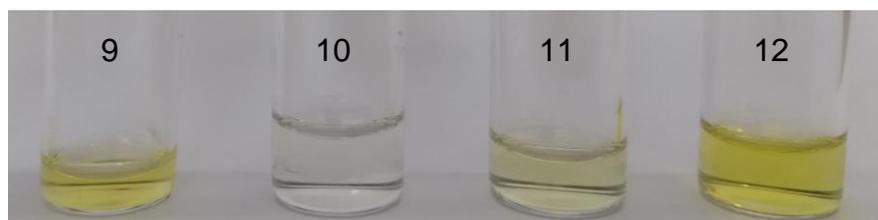
Fonte: (Autora).

Figura 29 – Extratos de cenoura após etapa de limpeza com os sorventes: celite (9); GCB (10); C18 (11); fase fluorada (12).



Fonte: (Autora).

Figura 30 – Extratos de tomate após etapa de limpeza com os sorventes: celite (9); GCB (10); C18 (11); fase fluorada (12).



Fonte: (Autora).

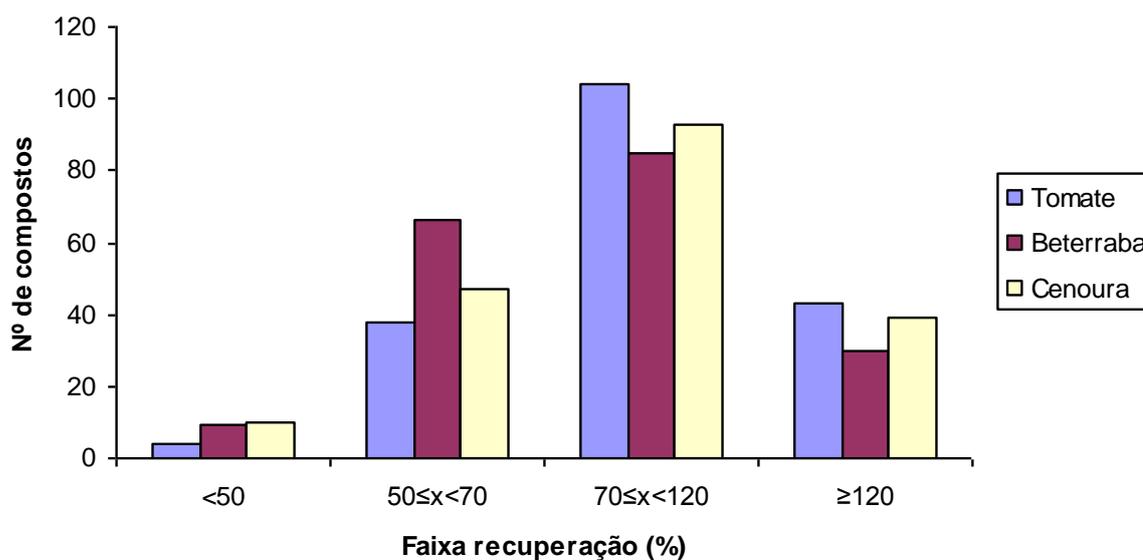
Tabela 14 – Número de compostos por faixa de recuperação de cada sorvente para as matrizes beterraba, cenoura e tomate.

	Nº de compostos por faixa de recuperação															
	Celite				GCB				C18				Fase fluorada			
	<50%	50<x<70%	70<x<120%	>120%	<50%	50<x<70%	70<x<120%	>120%	<50%	50<x<70%	70<x<120%	>120%	<50%	50<x<70%	70<x<120%	>120%
Beterraba	9	66	85	30	26	64	73	28	14	59	84	34	9	67	80	34
Cenoura	10	47	93	39	11	45	94	41	12	45	91	43	9	42	96	44
Tomate	4	38	104	43	21	54	88	27	18	59	86	28	6	57	89	38

Fonte: (Autora).

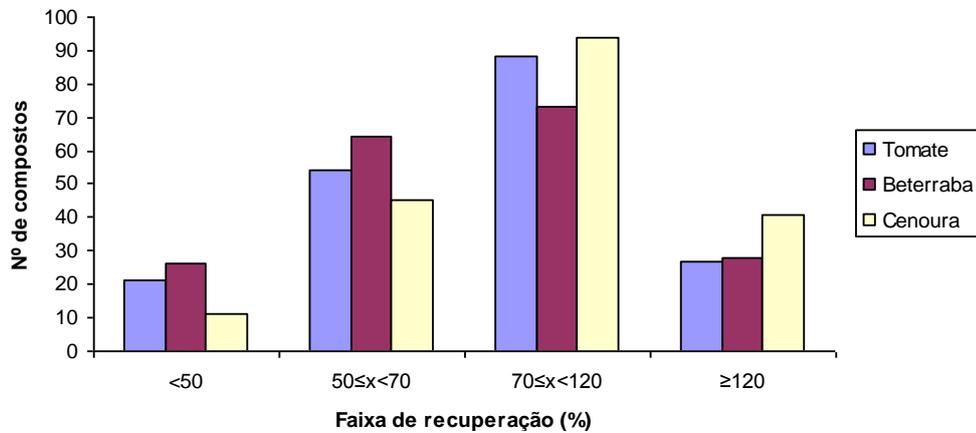
Como pode ser observado visualmente (Figuras 28 a 30), a pigmentação da beterraba foi completamente removida em todos os testes. Já para cenoura e tomate, o teste com GCB foi o mais eficiente. Com relação a recuperação (Tabela 14), um maior número de compostos foi recuperado na faixa de 70 a 120% e pode-se observar um mesmo perfil de comportamento em todos os testes e para todas as matrizes, como ilustrado graficamente nas Figuras 31 a 34.

Figura 31 – Gráfico do número de compostos por faixa de recuperação (%) para as três matrizes, utilizando celite como sorvente.



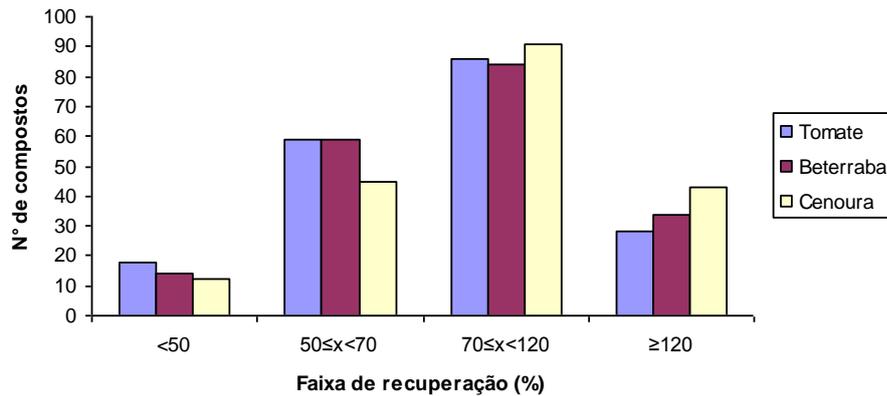
Fonte: (Autora).

Figura 32 – Gráfico do número de compostos por faixa de recuperação (%) para as três matrizes, utilizando GCB como sorvente.



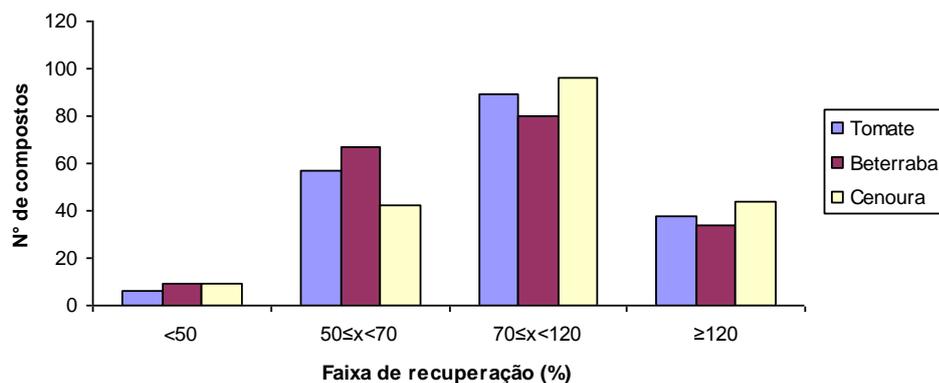
Fonte: (Autora).

Figura 33 – Gráfico do número de compostos por faixa de recuperação (%) para as três matrizes, utilizando C18 como sorvente.



Fonte: (Autora).

Figura 34 – Gráfico do número de compostos por faixa de recuperação (%) para as três matrizes, utilizando fase fluorada como sorvente.

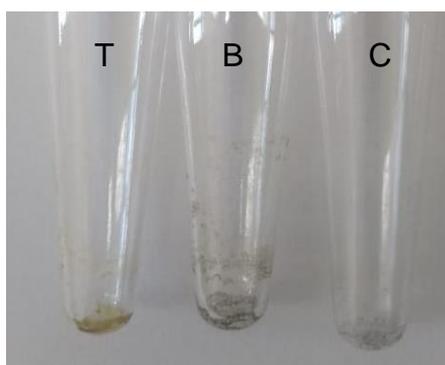


Fonte: (Autora).

Dessa forma, os resultados de recuperação e a avaliação visual dos extratos permitiram concluir que apenas o uso de GCB na etapa de limpeza seria suficiente, uma vez que foi possível a extração de um número significativo de compostos dentro da faixa de concentração considerada ideal (70-120%) e uma boa remoção de pigmentos, simultaneamente.

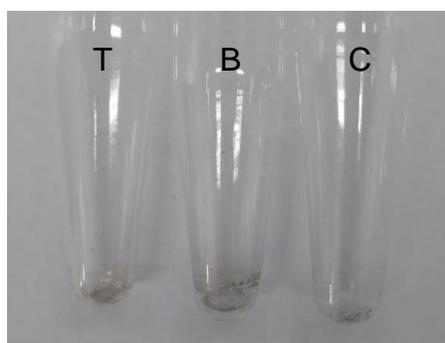
Para auxiliar na avaliação da necessidade de uma etapa de limpeza, foram realizados testes de evaporação do solvente dos extratos obtidos após etapa de limpeza com GCB, após a etapa de limpeza com PSA+GCB e sem a etapa de limpeza. Os resíduos obtidos das matrizes beterraba, cenoura e tomate foram analisados visualmente, conforme Figuras 35 a 37 a seguir.

Figura 35 – Resíduo do teste de evaporação utilizando apenas GCB na etapa de limpeza para as matrizes tomate (T), beterraba (B) e cenoura (C).



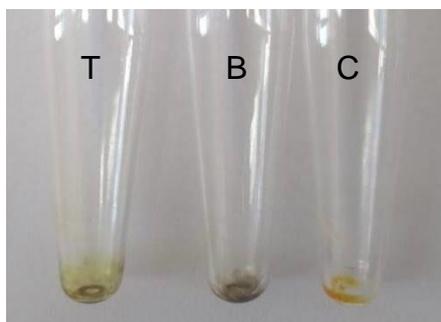
Fonte: (Autora).

Figura 36 – Resíduo do teste de evaporação utilizando mistura de PSA e GCB na etapa de limpeza para as matrizes tomate (T), beterraba (B) e cenoura (C).



Fonte: (Autora).

Figura 37 – Resíduo do teste de evaporação sem realizar a etapa de limpeza para as matrizes tomate (T), beterraba (B) e cenoura (C).



Fonte: (Autora).

Tendo em vista que o tomate foi a matriz que apresentou maior quantidade de resíduos, optou-se por fazer um teste de diluição apenas para esta matriz. Visando uma etapa simples de preparo de amostra para comparação, os extratos sem a etapa de limpeza foram testados após diferentes diluições de: 10x (1+9); 5x (1+4); 3,33x (1+2,3); 2,5x (1+1,5) e 2x (1+1) em fase móvel. Estes extratos foram injetados no equipamento, além de um padrão adicionado na matriz (na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$) e um no solvente, para avaliação do efeito matriz.

Realizou-se a avaliação do efeito matriz do extrato de tomate através da comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas no solvente (acetonitrila) e das soluções preparadas no extrato da matriz. Utilizou-se a equação 4 para a realização dos cálculos (PUCCI *et al.*, 2009).

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (4)$$

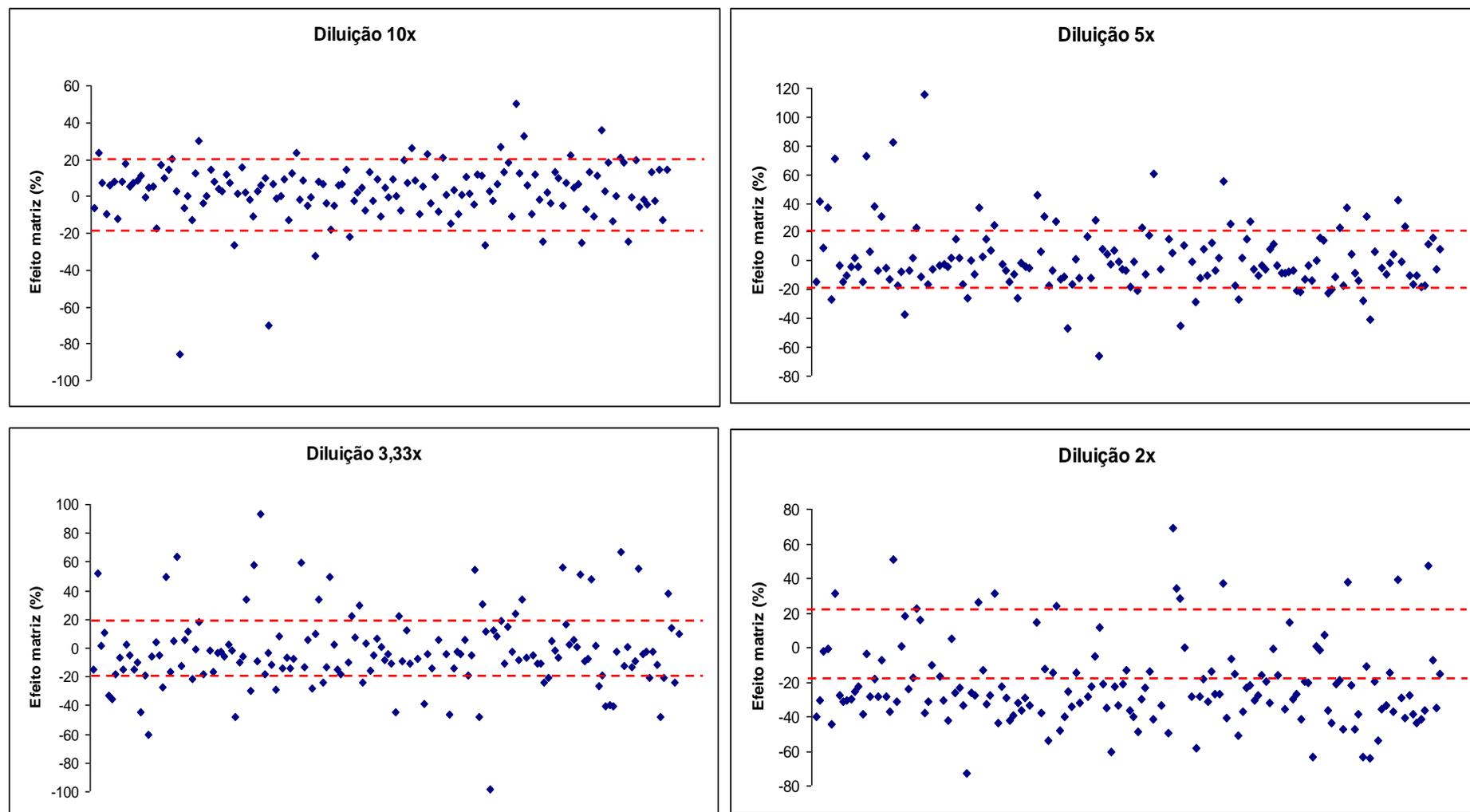
Onde:

X_1 : média das áreas da solução analítica de cada composto avaliado, preparado no extrato da matriz, numa dada concentração;

X_2 : média das áreas da solução analítica de cada composto avaliado preparada no solvente, numa dada concentração.

Cabe ressaltar que um percentual entre -20 e +20% não é considerado efeito matriz, uma vez que essa variação é próxima dos valores de repetibilidade. Valores entre -50 e -20% ou +20 e +50% representam um efeito matriz médio e valores abaixo de -50% e acima de +50% indicam um forte efeito matriz (FERRER *et al.*, 2011).

Figura 38 – Gráfico do efeito matriz para a diluição de 10x (concentração final: $1 \mu\text{g L}^{-1}$); 5x (concentração final: $2 \mu\text{g L}^{-1}$); 3,3x (concentração final: $3 \mu\text{g L}^{-1}$) e 2x (concentração final: $5 \mu\text{g L}^{-1}$).

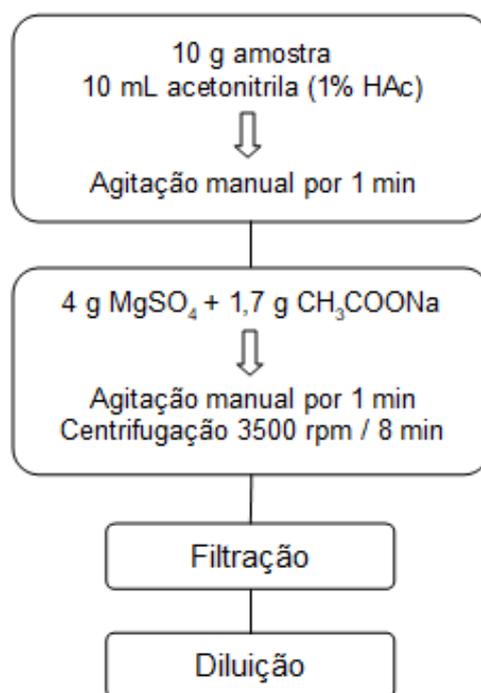


Fonte: (Autora).

Como pode ser observado na Figura 38, um maior número de compostos ficou distribuído na faixa de -20 a +20% para os extratos diluídos 10 vezes, ou seja, numa concentração final de $1 \mu\text{g L}^{-1}$, observando-se também o formato dos picos e o sinal analítico. Dessa forma, a diluição de 10x foi definida como a mais apropriada para a etapa de preparo de amostra.

Sendo assim, devido a eficiência e a facilidade da diluição de 10x quando comparada ao uso de sorventes para limpeza do extrato, aliada ao bom desempenho da instrumentação analítica, optou-se por eliminar a etapa de limpeza no preparo da amostra e manter apenas a etapa de extração com diluição. A Figura 39 apresenta um fluxograma do método QuEChERS modificado otimizado.

Figura 39 – Fluxograma do preparo de amostra utilizando o método QuEChERS modificado otimizado.



Fonte: (Autora).

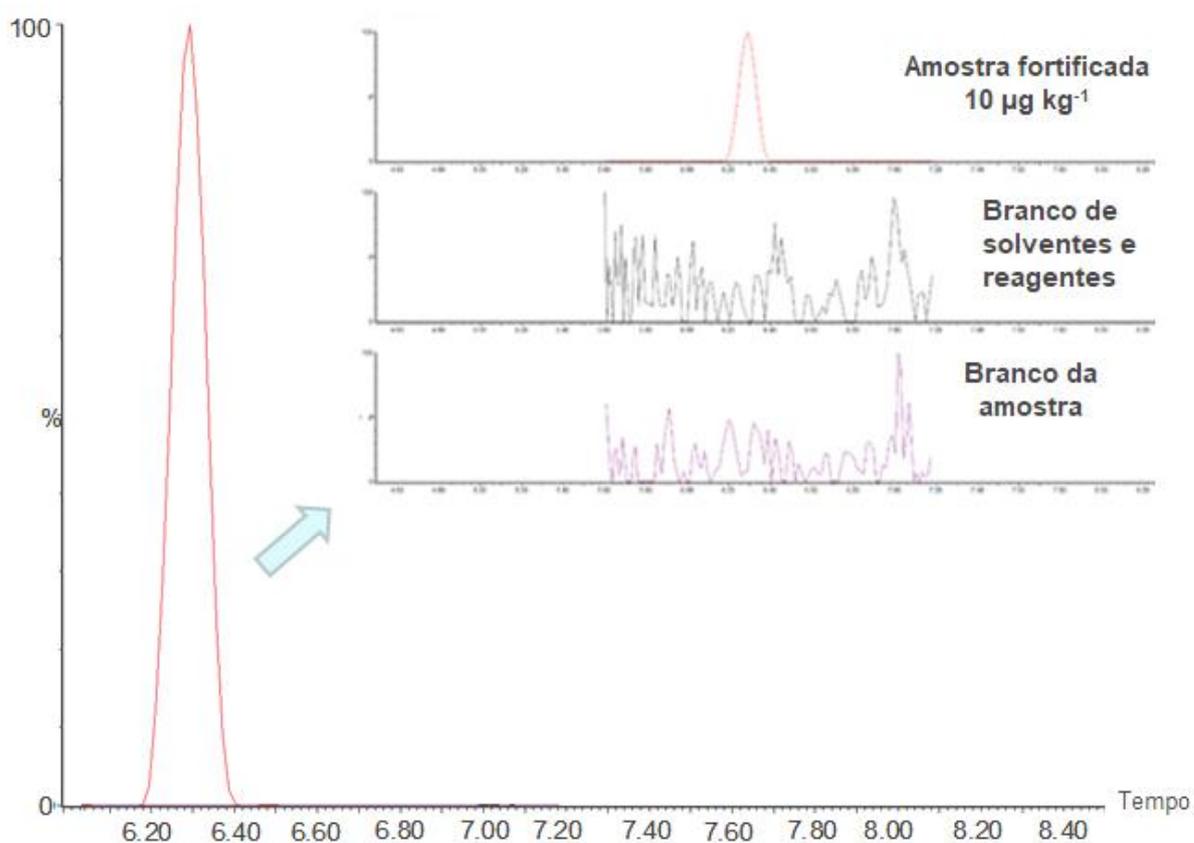
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO SEM ETAPA DE LIMPEZA

A validação do método foi realizada para a matriz tomate e estendeu-se o escopo do método para as matrizes beterraba e cenoura. Os dados de validação para a matriz tomate pelo método de diluição são apresentados na Tabela 15 e para as demais hortaliças na Tabela 16.

4.3.1 Seletividade

Pôde-se garantir a seletividade do método pela ausência de compostos interferentes no mesmo tempo de retenção, e com os mesmos íons de quantificação e de identificação dos compostos em estudo, para as três matrizes, como pode ser visto no exemplo da Figura 40.

Figura 40 – Comparação dos cromatogramas obtidos do branco de amostra, do reagente branco, e da amostra de tomate fortificada com $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o composto flutolanil.



Fonte: (Autora).

Uma vez que não foi identificada a presença de nenhum resíduo de agrotóxico com valores acima do LOD do método, a amostra de tomate avaliada foi utilizada para a confecção da curva analítica na matriz e nos ensaios de fortificação.

4.3.2 Linearidade

A linearidade foi obtida através de curvas preparadas no extrato da matriz de 0,5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, apresentando coeficiente de determinação (r^2) entre 0,9904 e 0,9999 para todas as matrizes, exceto para acetamiprido em tomate, que apresentou 0,9892 (Tabela 15).

4.3.3 Efeito matriz

Para a matriz tomate, o efeito matriz se manteve entre $\pm 20\%$ para a maioria dos compostos. No entanto, os compostos aldicarbe, clomazona, cianazina, cialofope-butílico, duflubenzurom, etoxissulfurom, fenazaquina, fentiona, imazalil, metiocarbe, metoxifenzida, molinato, piperonil butóxido, piriproxifeno, prometrina, piraclostrobina, quinclorac, saflufenacila, terbufós, tiodicarbe e tiofanato-metílico apresentaram valores entre -85 e 50%, indicando a necessidade de realizar a calibração no extrato em branco de tomate, conforme Tabela 15. Assim, a calibração foi realizada utilizando extratos branco da matriz, para compensar o efeito matriz na etapa de determinação.

Para beterraba, o efeito matriz apresentou maiores variações. No entanto, a utilização de padrões no extrato branco da matriz compensou esse efeito. No caso da cenoura, o efeito matriz se manteve entre $\pm 20\%$ para a maioria dos compostos. Porém, os compostos diclosulam, fenazaquim, fenoxicarbe, fluazafope-p-butílico, flutolanil, malationa, paraoxom etílico, parationa-etílica, piriproxifeno, profenofós, tiametoxam e tiofanato metílico apresentaram valores entre -31 e 34%. Tal efeito também foi compensado pela utilização de padrões no extrato branco na matriz para a curva analítica.

4.3.4 Exatidão e precisão

A exatidão e a precisão (repetitividade) do método foram avaliadas nos níveis de fortificação de 10, 20 40 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para a matriz tomate. A maioria dos compostos apresentaram recuperações satisfatórias, na faixa de 70 a 120%, e com RSD $\leq 20\%$, exceto para acetamiprido e imazapir, que apresentaram recuperações entre 48 e 64% nos níveis mais altos. Alguns compostos apresentaram baixos

valores de recuperação nos níveis mais baixos de fortificação, mas isto não afetou os resultados.

A exatidão para as matrizes beterraba e cenoura foi avaliada em termos de recuperação no nível de fortificação de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$. A maioria dos compostos também apresentou recuperações satisfatórias, na faixa de 70 a 120%, com $\text{RSD} \leq 20\%$, exceto para diclorvós, para cenoura, e para imazamoxi, imazapique, imazapir e quinclorac, para ambas as matrizes, que apresentaram faixas entre 31 e 158%.

A precisão intermediária foi avaliada em dias diferentes, através de ensaios de recuperação no nível de fortificação de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($n= 7$), apresentando resultados satisfatórios na faixa de 70 a 120%, com $\text{RSD} \leq 20\%$, para todos os compostos.

4.3.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ para a maioria dos compostos, exceto para famoxadona, paraoxom-etílico, terbufós e triadimenol com valor de LOQ de $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$, e para fluroxipir e triadimefom com LOQ de $0,04 \text{ mg kg}^{-1}$ (Tabela 15). Para o LOQ, foi considerado o nível mais baixo com exatidão e precisão aceitáveis. O limite de detecção foi calculado dividindo-se o LOQ por 3,3. Portanto, o LOD foi de $0,003 \text{ mg kg}^{-1}$ para para a maioria dos compostos, exceto para famoxadona, paraoxom-etílico, terbufós e triadimenol com valor de LOD de $0,006 \text{ mg kg}^{-1}$, e para fluroxipir e triadimefom com LOD de $0,012 \text{ mg kg}^{-1}$ (Tabela 15).

Assim, os resultados de validação do método QuEChERS modificado sem a etapa de limpeza mostraram-se satisfatórios para a análise multiresíduo de agrotóxicos em beterraba, cenoura e tomate por UHPLC-MS/MS.

Tabela 15 – Resultados de validação do método QuEChERS modificado sem etapa de limpeza com tempo de retenção (t_R), íons precursores e íons produto, energia de colisão, linearidade (coeficiente de determinação, r^2), efeito matriz (%), limite de quantificação (LOQ), limite de determinação (LOD), exatidão (recuperação, %) e precisão (RSD, %) para matriz tomate.

(continua)

Compostos	t_R (min)	Transições MRS, m/z		Lineari- dade r^2	LOD $mg\ kg^{-1}$	LOQ $mg\ kg^{-1}$	Efeito matriz (%)	Nível de fortificação ($\mu g\ kg^{-1}$) para testes de exatidão e precisão intermediária				
		(energia de colisão, eV)						10	20	40	50	40
		Quantificação	Identificação					Rec \pm RSD (%), repetibilidade				Rec \pm RSD (%), prec. interm.
Acetamiprido	3,69	223>126 (20)	223>56 (15)	0,9892	0,003	-	-6	77(20)	97(3)	48(1)	62(1)	38(4)
Aldicarbe	4,35	208 >89 (7)	208 >116 (7)	0,9973	0,003	0,01	23	97(18)	99(12)	96(11)	104(6)	105(7)
Ametrina	5,65	228>186 (18)	228>68 (36)	0,9992	0,003	0,01	8	96(11)	93(3)	90(2)	93(9)	93(4)
Atrazina	5,54	216>174 (18)	216>96 (23)	0,9966	0,003	0,01	-9	76(5)	87(2)	83(3)	86(8)	84(2)
Azaconazol	5,71	300>152 (28)	300>131 (18)	0,9985	0,003	0,01	6	74(12)	84(6)	96(5)	97(5)	91(6)
Azametifós	4,72	325>112 (35)	325>139 (24)	0,9997	0,003	0,01	8	104(20)	102(13)	95(6)	95(9)	91(4)
Azinfós-etílico	6,98	346>132 (16)	346>77 (36)	0,9916	0,003	0,01	-12	109(8)	86(12)	103(17)	119(19)	118(15)
Azinfós-metílico	5,83	318>160 (8)	318>261 (8)	0,9971	0,003	0,01	8	76(12)	70(18)	91(17)	93(12)	99(10)
Azoxistrobina	5,99	404>329 (30)	404>372 (15)	0,9999	0,003	0,01	17	81(14)	92(6)	79(8)	88(7)	89(4)
Boscalida	6,21	343>307 (20)	343>140 (20)	0,9982	0,003	0,01	5	118(19)	109(15)	87(14)	92(6)	94(6)
Bromofós-metílico	8,07	365>147 (26)	365>309 (12)	0,9970	0,003	0,01	7	99(14)	99(6)	88(4)	92(5)	85(3)
Buprofezina	7,53	306>201 (12)	306>57.4 (20)	0,9950	0,003	0,01	9	71(8)	76(14)	93(5)	93(10)	101(4)
Carbaril	5,16	202>145 (22)	202>117 (28)	0,9999	0,003	0,01	11	71(7)	85(7)	89(1)	93(6)	94(4)
Carbendazim	2,80	192>160 (18)	192>132 (28)	0,9997	0,003	0,01	-1	81(11)	83(15)	79(2)	84(7)	85(4)
Carbofurano	4,95	222>165 (16)	222>123 (16)	0,9970	0,003	0,01	5	73(7)	85(3)	89(2)	92(4)	95(6)
Carbofurano-3-OH	3,68	238>163 (16)	238>181 (10)	0,9995	0,003	0,01	5	71(15)	81(6)	89(4)	89(7)	93(4)
Carboxina	5,10	236>143 (16)	236>87 (22)	0,9978	0,003	0,01	-17	76(10)	85(2)	87(2)	90(6)	93(5)
Clorantniliprole	5,81	482>451 (22)	482>284 (14)	0,9997	0,003	0,01	-7	95(7)	87(16)	70(20)	100(19)	95(18)
Clorfenvinfós	6,99	359>99 (30)	359>155 (12)	0,9983	0,003	0,01	0	74(15)	96(8)	97(11)	104(5)	104(15)
Clorprofam	6,37	214> 154 (20)	214> 171 (18)	0,9939	0,003	0,01	17	112(15)	85(13)	89(15)	95(20)	112(19)
Clorpirifós	7,73	350>97 (32)	350>198 (20)	0,9997	0,003	0,01	10	81(16)	81(10)	88(9)	85(7)	93(7)
Clorpirifós-metílico	7,24	322>125 (20)	322>289 (16)	0,9996	0,003	0,01	14	80(19)	89(19)	91(18)	104(19)	98(20)
Clomazona	5,92	240>125 (18)	240>89 (46)	0,9996	0,003	0,01	-85	81(8)	86(6)	81(3)	89(7)	87(1)

Compostos	t _R (min)	Transições MRS, m/z		Lineari- dade r ²	LOD mg kg ⁻¹	LOQ mg kg ⁻¹	Efeito matriz (%)	Nível de fortificação (µg kg ⁻¹) para testes de exatidão e precisão intermediária				
		(energia de colisão, eV)						10	20	40	50	40
		Quantificação	Identificação									
Clotianidina	3,38	250>132 (18)	250>169 (12)	0,9961	0,003	0,01	-13	71(16)	89(8)	75(5)	84(7)	70(5)
Cianazina	4,66	241>214 (17)	241>96 (25)	0,9996	0,003	0,01	30	81(7)	88(9)	92(4)	93(7)	99(7)
Ciazofamida	6,62	325>108 (20)	325>261 (10)	0,9951	0,003	0,01	-4	70(18)	88(14)	96(11)	108(8)	97(8)
Cialofope-butílico	7,25	358>256 (20)	358>158 (57)	0,9993	0,003	0,01	21	107(13)	86(4)	72(7)	94(10)	105(12)
Cimoxanil	3,92	199>111 (18)	119>128 (8)	0,9949	0,003	0,01	3	90(8)	93(3)	94(3)	97(6)	94(4)
Ciproconazol	6,49	292>125 (24)	292>70 (18)	0,9992	0,003	0,01	0	88(20)	79(14)	77(12)	77(21)	78(16)
Deltametrina	8,02	523>281 (18)	523>506 (11)	0,9982	0,003	0,01	15	117(18)	106(13)	117(7)	108(15)	120(4)
Demeton-S-metil- sulfona	2,81	263>169 (17)	263>121 (17)	0,9991	0,003	0,01	8	78(13)	87(2)	92(3)	95(8)	93(4)
Diazinon	6,98	305>97 (35)	305>169 (22)	0,9994	0,003	0,01	4	72(11)	89(11)	92(7)	94(10)	98(4)
Diclosulam	5,25	406>161 (30)	406>378 (15)	0,9999	0,003	0,01	3	77(14)	102(16)	91(17)	87(15)	81(14)
Dicrotofós	3,22	238>193 (10)	238>112 (10)	0,9991	0,003	0,01	12	104(14)	95(4)	91(4)	93(9)	94(6)
Difenoconazol	7,22	406>251 (25)	406>111 (60)	0,9998	0,003	0,01	8	90(8)	92(16)	71(2)	83(8)	76(6)
Diflubenzurom	6,73	311> 158 (12)	311> 141 (28)	0,9903	0,003	0,01	-27	115(18)	98(14)	99(13)	96(15)	99(17)
Dimetoato	3,66	230>125 (20)	230>199 (10)	0,9977	0,003	0,01	2	78(7)	87(5)	92(5)	93(4)	96(3)
Dimoxistrobina	6,81	327>116 (21)	327>205 (10)	0,9986	0,003	0,01	16	86(15)	93(10)	96(6)	97(8)	104(9)
Diniconazol	7,22	326>70 (25)	326>159 (34)	0,9990	0,003	0,01	2	119(13)	105(2)	88(18)	93(14)	113(18)
Diuron	5,66	233>72 (18)	233>46 (14)	0,9917	0,003	0,01	-2	79(10)	83(13)	88(4)	90(12)	84(8)
EPN	7,23	324 > 296 (15)	324> 157 (20)	0,9905	0,003	0,01	-11	89(12)	88(18)	100(5)	97(10)	87(12)
Epoconazole	6,58	330>101 (50)	330>121 (22)	0,9955	0,003	0,01	3	72(15)	85(16)	93(6)	94(10)	98(11)
Espinosade A	7,05	732>142 (31)	732>98 (59)	0,9995	0,003	0,01	6	104(4)	99(4)	93(5)	93(9)	96(5)
Espinosade D	7,28	746> 142.0 (55)	746> 98 (31)	0,9988	0,003	0,01	10	100(17)	93(17)	96(5)	100(9)	98(6)
Etiofencarbe	5,26	226> 107 (20)	226> 164 (20)	0,9990	0,003	0,01	7	76(12)	94(6)	84(7)	83(8)	89(5)
Etoprofós	6,58	243>97 (31)	243>131 (20)	0,9932	0,003	0,01	-1	79(11)	92(7)	91(4)	96(12)	98(6)
Etoxissulfurom	6,32	399>261 (16)	399>218 (24)	0,9944	0,003	0,01	-70	72(11)	92(18)	82(15)	77(14)	79(11)
Famoxadona	6,98	392 > 331 (18)	392> 238 (10)	0,9971	0,006	0,02	0	85(19)	74(16)	82(17)	70(13)	88(19)
Fenamidona	6,13	312 > 92 (25)	312>236 (14)	0,9991	0,003	0,01	10	83(13)	88(14)	102(10)	102(9)	95(12)
Fenamifós	6,71	304>202 (36)	304>217 (24)	0,9904	0,003	0,01	-13	72(18)	92(4)	95(3)	98(6)	94(6)

Compostos	t _R (min)	Transições MRS, m/z		Lineari- dade r ²	LOD mg kg ⁻¹	LOQ mg kg ⁻¹	Efeito matriz (%)	Nível de fortificação (µg kg ⁻¹) para testes de exatidão e precisão intermediária				
		(energia de colisão, eV)						10	20	40	50	40
		Quantificação	Identificação									
Fenarimol	6,57	331>268 (22)	331>81 (34)	0,9999	0,003	0,01	13	70(12)	91(21)	103(20)	103(15)	90(12)
Fenazaquim	8,08	307>57 (25)	307>161 (19)	0,9993	0,003	0,01	23	104(14)	95(7)	85(6)	87(7)	91(6)
Fenhexamida	6,52	302>97 (22)	302>55 (38)	0,9995	0,003	0,01	-2	114(20)	112(16)	78(10)	79(16)	76(5)
Fenoxicarbe	6,76	302>88 (20)	302>116 (11)	0,9981	0,003	0,01	8	90(13)	83(3)	104(14)	88(18)	116(5)
Fenpropimorfe	6,06	304>147 (28)	304>57 (30)	0,9992	0,003	0,01	-5	104(11)	93(7)	85(2)	88(6)	90(5)
Fenpiroximato	7,88	422>366 (15)	422>138 (32)	0,9988	0,003	0,01	0	96(18)	97(4)	100(5)	99(8)	105(6)
Fentiona	6,91	279>169 (16)	279>247 (13)	0,9944	0,003	0,01	-32	71(11)	74(18)	92(11)	96(11)	89(13)
Fipronil	6,77	435> 250 (26)	435> 330 (16)	0,9939	0,003	0,01	8	84(16)	91(17)	77(18)	89(14)	100(14)
Fluazifope-p- butílico	7,45	384>282 (22)	384>328 (16)	0,9987	0,003	0,01	7	74(15)	94(7)	102(2)	105(7)	94(9)
Fluquinconazol	6,49	376>307 (30)	376>349 (18)	0,9993	0,003	0,01	-4	88(15)	112(17)	82(6)	86(10)	82(16)
Fluoxipir	4,66	255>209 (16)	255>181 (22)	0,9966	0,012	0,04	-18	106(67)	106(82)	70(14)	79(20)	81(16)
Flusilazol	6,73	316>165 (28)	316>247 (18)	0,9907	0,003	0,01	-5	70(7)	85(18)	99(6)	95(15)	84(11)
Flutolanil	6,30	324>65 (40)	324>262 (18)	0,9936	0,003	0,01	6	92(14)	95(12)	89(12)	92(10)	83(13)
Furatiocarbe	7,47	383>195 (18)	383>252 (12)	0,9986	0,003	0,01	7	71(8)	82(8)	91(5)	96(4)	91(7)
Hexitiazoxi	7,72	353>168 (26)	353>228 (14)	0,9992	0,003	0,01	15	90(5)	93(7)	91(4)	91(10)	92(5)
Imazalil	5,50	297>159 (22)	297>69 (22)	0,9965	0,003	0,01	-22	71(10)	81(12)	78(4)	86(6)	84(7)
Imazamoxi	3,93	306>218 (30)	306>278(25)	0,9971	0,003	0,01	-2	71(10)	78(8)	80(4)	82(9)	84(6)
Imazapique	3,99	276> 231 (20)	276> 248 (35)	0,9957	0,003	0,01	2	77(7)	81(3)	80(3)	84(8)	78(4)
Imazapir	3,28	262> 69 (26)	262> 86 (27)	0,9998	-	-	5	78(1)	70(3)	64(4)	71(4)	61(4)
Imazaquim	4,90	312> 267 (20)	312> 86(29)	0,9920	0,003	0,01	-7	76(11)	83(4)	90(4)	92(7)	84(5)
Imzetapir	4,57	290< 169 (38)	290< 245 (35)	0,9963	0,003	0,01	13	85(12)	89(3)	85(4)	90(5)	87(4)
Imidacloprido	3,34	256>175 (20)	256>209 (15)	0,9984	0,003	0,01	-3	81(18)	90(5)	85(4)	87(11)	89(6)
Iprovalicarbe	6,49	321>119 (16)	321>203 (10)	0,9959	0,003	0,01	9	84(13)	88(5)	84(7)	89(9)	92(7)
Cresoxim-metilico	6,83	314>206 (7)	314>116 (12)	0,9991	0,003	0,01	13	78(16)	104(17)	87(21)	114(20)	76(19)
Linuron	6,10	249>160 (18)	249>181 (16)	0,9997	0,003	0,01	-11	73(18)	93(5)	87(6)	89(6)	94(4)
Malationa	6,30	331>99 (24)	331>127 (12)	0,9996	0,003	0,01	4	111(15)	117(12)	94(19)	99(19)	99(19)
Mecarbam	6,55	330>227 (8)	330>97 (35)	0,9999	0,003	0,01	0	80(19)	86(16)	70(9)	74(19)	80(15)

Compostos	t _R (min)	Transições MRS, m/z		Lineari- dade r ²	LOD mg kg ⁻¹	LOQ mg kg ⁻¹	Efeito matriz (%)	Nível de fortificação (µg kg ⁻¹) para testes de exatidão e precisão intermediária				
		(energia de colisão, eV)						10	20	40	50	40
		Quantificação	Identificação									
Mefosfolam	4,83	270>140 (24)	270>75 (22)	0,9996	0,003	0,01	9	92(10)	92(4)	93(3)	98(8)	94(5)
Mepronil	6,31	270>91 (44)	270>119 (28)	0,9939	0,003	0,01	0	77(20)	88(5)	90(5)	94(8)	85(7)
Metalaxil	5,65	280>192 (17)	280>220 (13)	0,9949	0,003	0,01	-8	72(5)	87(6)	89(5)	94(10)	89(5)
Metconazol	7,09	320>70 (22)	320>125 (36)	0,9979	0,003	0,01	20	117(14)	88(10)	102(8)	93(12)	94(13)
Metidationa	5,74	303>145 (10)	303>85 (20)	0,9999	0,003	0,01	7	82(16)	99(6)	97(9)	101(5)	94(9)
Metiocarbe	6,13	226 > 169 (10)	226> 121 (22)	0,9994	0,003	0,01	26	108(17)	93(13)	103(10)	113(13)	110(5)
Metiocarbe sulfona	3,83	258>107 (38)	258>122 (19)	0,9997	0,003	0,01	9	80(8)	93(16)	90(2)	91(6)	95(4)
Metiocarbe sulfóxido	3,52	242>122 (28)	242>185 (14)	0,9996	0,003	0,01	-10	86(9)	89(5)	91(2)	91(5)	97(4)
Metomil	2,68	163>106 (10)	163>88 (10)	0,9993	0,003	0,01	6	84(14)	88(4)	93(5)	94(8)	94(8)
Metoxifenzida	6,29	369>149 (19)	369>313 (8)	0,9993	0,003	0,01	23	110(15)	96(16)	88(7)	93(16)	94(20)
Metribuzim	4,83	215>131 (18)	215>89 (20)	0,9988	0,006	0,02	-4	70(15)	94(19)	105(20)	112(17)	92(20)
Metsulfurom- metílico	4,89	382> 199 (22)	382> 167 (16)	0,9978	0,003	0,01	10	79(17)	87(11)	94(10)	96(13)	102(7)
Mevinfós	3,68	225>127 (15)	225>193 (8)	0,9996	0,003	0,01	-8	100(15)	88(13)	88(4)	94(6)	92(4)
Molinato	6,36	188 > 126 (13)	188 > 55 (24)	0,9970	0,003	0,01	21	99(19)	99(16)	93(15)	111(21)	88(20)
Monocrotofós	3,01	224>127 (16)	224>98 (12)	0,9996	0,003	0,01	1	90(11)	99(10)	89(3)	91(5)	92(6)
Monolinuron	5,26	215>99 (34)	215>126 (22)	0,9959	0,003	0,01	-15	73(15)	85(3)	91(8)	93(10)	96(7)
Miclobutanil	6,40	289> 70 (18)	289> 125 (32)	0,9930	0,003	0,01	4	101(7)	105(14)	90(13)	97(19)	101(12)
Nicosulfurom	4,82	411> 106 (32)	411> 182 (22)	0,9945	0,003	0,01	-10	81(9)	86(2)	89(1)	93(8)	87(3)
Nuarimol	6,06	315>252 (22)	315>81 (28)	0,9990	0,003	0,01	1	73(3)	99(5)	91(8)	88(12)	95(15)
Oxadixil	4,56	279>132 (34)	279>219 (10)	0,9964	0,003	0,01	11	116(20)	108(7)	97(7)	100(11)	96(5)
Paraoxom-etílico	5,49	276>220 (17)	276>248 (16)	0,9923	0,006	0,02	1	47 (12)	71(7)	80(2)	86(7)	86(4)
Parationa-etílica	6,79	292>236 (14)	292>110 (33)	0,9975	0,003	0,01	-4	104(20)	97(19)	109(18)	120(19)	92(13)
Pencicurom	7,17	329>125 (22)	329>125 (40)	0,9996	0,003	0,01	12	116(13)	96(13)	100(7)	105(11)	106(4)
Penconazol	6,90	284>159 (34)	284>70 (16)	0,9991	0,003	0,01	11	74(19)	79(19)	91(12)	92(4)	99(4)
Penoxsulam	5,20	482>109 (40)	482>179 (25)	0,9947	0,003	0,01	-27	90(8)	102(8)	102(6)	111(15)	94(7)

Compostos	t _R (min)	Transições MRS, m/z		Lineari- dade r ²	LOD mg kg ⁻¹	LOQ mg kg ⁻¹	Efeito matriz (%)	Nível de fortificação (µg kg ⁻¹) para testes de exatidão e precisão intermediária				
		(energia de colisão, eV)						10	20	40	50	40
		Quantificação	Identificação									
Fosalone	7,08	368> 182 (12)	368> 322 (6)	0,9961	0,003	0,01	3	118(20)	84(21)	92(18)	96(10)	100(15)
Fosmet	5,85	318>160 (22)	318>77 (46)	0,9959	0,003	0,01	-2	87(15)	86(7)	93(4)	94(10)	90(4)
Picoxistrobina	6,76	368>145 (22)	368>205 (10)	0,9933	0,003	0,01	7	78(19)	93(17)	97(5)	98(7)	83(9)
Piperonil butóxido	7,59	356> 119 (37)	356> 176 (11)	0,9992	0,003	0,01	27	120(10)	104(7)	96(4)	100(7)	100(5)
Pirimicarbe	4,51	239>182 (15)	239>72 (18)	0,9997	0,003	0,01	13	80(8)	87(3)	89(2)	91(6)	97(4)
Pirimifós-etílico	7,56	334>198 (23)	334>182 (25)	0,9994	0,003	0,01	18	107(10)	98(4)	104(3)	108(12)	105(4)
Pirimifós-metílico	7,07	306>108 (32)	306>164 (22)	0,9996	0,003	0,01	-11	69(13)	83(14)	92(5)	92(7)	96(5)
Piriproxifeno	7,65	322> 227 (14)	322>116 (14)	0,9982	0,003	0,01	50	112(15)	107(5)	81(5)	90(8)	92(16)
Profenofós	7,47	373>128 (40)	373>303 (20)	0,9928	0,003	0,01	13	74(6)	90(7)	99(3)	102(8)	100(4)
Prometrina	6,21	242>158 (25)	242>200 (17)	0,9947	0,003	0,01	33	103(13)	96(5)	71(4)	81(11)	85(6)
Propanil	6,11	218>162 (16)	218>127 (22)	0,9933	0,003	0,01	6	79(19)	89(8)	94(11)	100(11)	99(6)
Propargito	7,82	368> 231 (9.5)	368> 175 (12)	0,9996	0,003	0,01	-10	73(7)	77(16)	88(2)	91(7)	96(3)
Propiconazol	7,00	342>159 (34)	342>69 (22)	0,9973	0,003	0,01	12	71(12)	88(5)	96(5)	99(6)	92(2)
Propoxur	4,90	210>111 (160)	210>168 (10)	0,9947	0,003	0,01	-2	74(9)	80(19)	93(2)	95(8)	96(4)
Piraclostrobina	7,03	388>163 (25)	288>194 (12)	0,9958	0,003	0,01	-24	70(14)	88(11)	88(8)	91(6)	91(7)
Pirazofós	7,07	374>194 (32)	374>222 (22)	0,9979	0,003	0,01	2	74(9)	95(4)	94(5)	99(7)	93(8)
Piridabem	8,07	365>147 (24)	365>309 (12)	0,9988	0,003	0,01	-4	80(5)	90(10)	89(3)	93(7)	89(4)
Piridafentiona	6,39	341>189 (22)	341>92 (34)	0,9986	0,003	0,01	13	78(7)	87(10)	91(4)	90(7)	92(8)
Piridato	8,26	379>207 (18)	379>351 (10)	0,9996	0,003	0,01	10	73(8)	89(20)	92(8)	87(13)	98(7)
Pirimetanil	5,85	200>107 (24)	200>82 (24)	0,9997	0,003	0,01	-5	97(16)	92(4)	88(6)	96(9)	101(6)
Quinalfos	6,80	299>97 (30)	299>163 (24)	0,9941	0,003	0,01	7	96(9)	92(18)	88(11)	93(19)	103(13)
Quinclorac	4,27	242> 161 (37)	242> 224 (13)	0,9999	0,003	0,01	22	76(4)	72(6)	72(5)	75(7)	77(6)
Quinoxifen	7,71	308>162 (44)	308>97 (32)	0,9995	0,003	0,01	5	86(10)	89(5)	85(4)	89(5)	96(6)
Quizalofope-p-etílico	7,43	373> 91 (18)	373> 299 (18)	0,9987	0,003	0,01	6	88(12)	91(15)	95(3)	102(8)	95(3)
Saflufenacil	5,89	501> 198 (49)	501> 349 (30)	0,9937	0,003	0,01	-25	86(9)	86(17)	101(3)	104(7)	99(5)
Simazina	4,88	202>96 (22)	202>124 (16)	0,9989	0,003	0,01	-7	72(17)	90(7)	89(10)	95(5)	100(6)
Tebuconazol	6,93	308>70 (22)	308>125 (40)	0,9918	0,003	0,01	13	111(9)	102(17)	76(20)	88(14)	94(16)

Compostos	t _R (min)	Transições MRS, m/z		Lineari- dade r ²	LOD mg kg ⁻¹	LOQ mg kg ⁻¹	Efeito matriz (%)	Nível de fortificação (µg kg ⁻¹) para testes de exatidão e precisão intermediária				
		(energia de colisão, eV)						10	20	40	50	40
		Quantificação	Identificação									
Tebufenozida	6,73	353>133 (20)	353>297 (8)	0,9909	0,003	0,01	-11	71(13)	88(17)	99(6)	100(8)	93(5)
Tebufenpirada	7,51	334>117 (34)	334>145 (28)	0,9989	0,003	0,01	11	97(13)	81(18)	105(5)	117(14)	97(6)
Terbufós	7,54	289> 103 (10)	289> 57(10)	0,9997	0,006	0,02	36	84(18)	75(15)	90(19)	107(19)	104(18)
Tetraconazol	6,62	372>159 (30)	372>70 (20)	0,9987	0,003	0,01	3	83(18)	74(15)	93(11)	101(14)	90(12)
Tiabendazol	3,16	202>175 (25)	202>131 (30)	0,9965	0,003	0,01	18	96(9)	88(20)	84(3)	87(8)	91(3)
Tiacloprido	4,03	253>126 (20)	253>90 (40)	0,9957	0,003	0,01	-13	71(7)	87(3)	89(2)	93(6)	93(4)
Tiametoxam	2,84	292>132 (22)	292>211 (12)	0,9994	0,003	0,01	0	94(5)	99(7)	70(2)	82(12)	70(2)
Tiodicarbe	5,25	255>88 (16)	255>108 (16)	0,9998	0,003	0,01	21	95(17)	102(19)	94(17)	92(11)	96(11)
Tiofanato-metílico	4,84	343>151 (21)	343>311 (11)	0,9913	0,003	0,01	-25	90(18)	91(7)	97(3)	101(5)	95(6)
Tiobencarbe	7,16	258>125 (17)	258>100 (12)	0,9994	0,003	0,01	18	96(14)	92(7)	103(6)	110(8)	108(5)
Tolclofós-metílico	7,10	301> 174.5 (20)	301> 125 (20)	0,9991	0,003	0,01	0	72(18)	86(15)	86(15)	99(19)	99(13)
Tolilfluanida	6,86	347> 137 (28)	347> 238 (10)	0,9974	0,003	0,01	20	97(12)	82(14)	88(7)	86(14)	81(14)
Triadimefom	6,37	294>69 (20)	294>197 (15)	0,9991	0,012	0,04	-6	38(33)	53(40)	80(15)	95(9)	93(17)
Triadimenol	6,48	296>70.2 (10)	296>99 (15)	0,9996	0,006	0,02	-2	87(17)	89(13)	110(13)	106(18)	108(16)
Triazofós	6,44	314>162 (35)	314>119 (18)	0,9982	0,003	0,01	-4	75(18)	92(10)	93(11)	93(8)	102(12)
Triciclazol	4,18	190> 137 (27)	190> 163 (60)	0,9992	0,003	0,01	13	106(11)	95(3)	93(4)	95(8)	95(2)
Trifloxistrobina	7,27	409>145 (40)	409>186 (16)	0,9998	0,003	0,01	14	71(10)	93(6)	95(4)	96(7)	109(3)
Trifloxissulfurom	5,52	438> 139 (45)	438> 182 (20)	0,9990	0,003	0,01	-2	80(17)	87(11)	101(11)	111(4)	98(5)
Triflumurom	7,06	259>139 (35)	259>156 (16)	0,9966	0,003	0,01	-13	100(14)	92(18)	92(8)	104(11)	85(12)
Vamidotiona	3,66	288>118 (28)	288>146 (10)	0,9995	0,003	0,01	14	70(20)	75(8)	82(7)	87(13)	92(11)

Fonte: (Autora).

Tabela 16 – Resultados de validação para o método QuEChERS modificado sem etapa de limpeza para as matrizes beterraba e cenoura: linearidade (r^2), efeito matriz (%), exatidão (em termos de recuperação).

(continua)

Compostos	Beterraba				Cenoura			
	r^2	Efeito matriz (%)	Rec (%)	RSD (%)	r^2	Efeito matriz (%)	Rec (%)	RSD (%)
Acetamiprido	0,9964	-83	83	3	0,9963	-4	76	3
Aldicarbe	0,9956	-83	75	10	0,9995	0	81	7
Ametrina	0,9989	-78	80	4	0,9998	0	78	4
Atrazine	0,9934	-8042	71	4	0,9972	11	78	3
Azaconazol	0,9986	-79	75	4	0,9994	-6	77	5
Azametifós	0,9987	-79	75	8	0,9996	-4	81	6
Azinfós etílico	0,9964	-74	87	19	0,9957	-17	86	14
Azinfós metílico	0,9973	-170	71	11	0,9945	2	76	17
Azoxistrobina	0,9984	5009	77	3	0,9998	1	84	3
Boscalida	0,9998	558	71	3	0,9993	12	88	10
Bromofós metílico	0,9967	-62	74	7	0,9990	-1	83	6
Buprofezina	0,9986	1351	73	4	0,9990	6	82	3
Carbaril	0,9988	899	82	4	0,9992	6	85	4
Carbendazim	0,9991	1208	82	2	0,9987	2	80	2
Carbofurano	0,9962	1597	73	1	0,9959	4	80	3
Carbofurano-3-OH	0,9967	3030	76	3	0,9961	1	75	5
Carboxina	0,9991	630	73	3	0,9997	5	77	2
Clorprofam	0,9938	382	53	9	0,9989	-2	76	12
Clorpirifós	0,9990	592	83	10	0,9998	8	85	7
Clorpirifós-metílico	0,9970	-355	77	19	0,9957	17	110	18
Cialofope butílico	0,9996	-141	119	12	0,9964	1	82	9
Cimoxanil	0,9959	-65	71	2	0,9987	2	79	2
Clomazona	0,9997	-42	83	4	1,0000	5	86	3
Clorantranilipore	0,9952	-82	77	19	0,9991	8	83	19
Clorfenvinfós	0,9983	-33	75	13	0,9921	13	79	10
Clotianidina	0,9909	-94	75	9	0,9987	-14	85	8
Cresoxim-metílico	0,9963	-67	73	11	0,9931	-16	94	11
Cianazina	0,9998	-148	86	4	0,9997	-1	86	4
Ciazofamida	0,9985	-31	88	13	0,9922	9	83	14
Ciproconazol	0,9925	-58	70	10	0,9997	-20	77	11
Deltametrina	0,9996	752	85	4	1,0000	2	90	5
Demeton-S-metil-sulfona	0,9971	-70	74	3	0,9985	-3	76	3
Diazinom	0,9995	1039	81	6	0,9986	9	83	5
Diclorvós	0,9956	-135	82	5	0,9913	2	158	15
Diclosulam	0,9975	-168	70	9	0,9986	-28	94	21
Dicrotofós	0,9990	-80	79	3	1,0000	-3	81	4
Difenoconazol	0,9994	660	75	4	0,9990	-4	83	6

Compostos	Beterraba				Cenoura			
	r ²	Efeito matriz (%)	Rec (%)	RSD (%)	r ²	Efeito matriz (%)	Rec (%)	RSD (%)
Diflubenzurom	0,9929	-156	78	14	0,9927	5	82	19
Dimetoato	0,9960	815	73	2	0,9958	2	81	4
Dimoxistrobin	0,9971	-54	73	6	0,9999	6	80	9
Diniconazol	0,9943	-158	78	6	0,9998	-17	70	14
Diuron	0,9961	-53	72	6	0,9924	5	70	9
EPN	0,9906	-55	70	4	0,9972	-20	82	14
Epoxiconazol	0,9950	-148	76	7	0,9990	-11	90	6
Espinosade A	0,9981	-79	74	4	0,9997	1	79	7
Espinosade D	0,9993	-150	87	6	0,9999	-6	82	5
Etoxissulfurom	0,9941	-160	78	9	0,9991	-18	106	14
Etiofencarbe	0,9993	-73	75	4	0,9999	-2	77	6
Etoprofós	0,9936	-59	71	6	0,9962	1	84	4
Famoxadona	0,9983	-128	89	19	0,9956	0	100	21
Fenamidona	0,9933	-85	71	3	0,9974	-8	76	6
Fenamifós	0,9939	-58	70	3	0,9931	2	71	6
Fenarimol	0,9955	-274	78	8	0,9970	2	75	18
Fenazaquim	0,9997	-43	74	5	0,9996	26	74	5
Fenhexamida	0,9945	-82	90	5	0,9956	6	74	14
Fenoxicarbe	0,9946	-32	70	8	0,9996	29	75	19
Fenpropimorfe	0,9991	1394	77	4	1,0000	1	86	2
Fenpiroximato	0,9982	-146	87	5	0,9995	-3	86	6
Fentiona	0,9998	1225	70	20	0,9945	9	79	11
Fipronil	0,9975	-267	101	19	0,9942	-15	90	21
Fluazafope-p-butílico	0,9925	-48	70	3	0,9998	24	78	3
Fluquiconazol	0,9942	-973	70	17	0,9901	-12	85	12
Fluroxipir	0,9984	-282	74	10	0,9988	3	71	6
Flusilazol	0,9971	-60	78	5	0,9971	1	87	12
Flutolanil	0,9947	568	90	6	0,9983	-25	100	8
Flutriafol	0,9973	-138	79	15	0,9991	-3	81	16
Furatiocarbe	0,9953	-72	71	7	0,9996	12	81	7
Hexitiazoxi	0,9986	-72	74	4	0,9997	3	80	4
Imazalil	0,9980	470	74	6	0,9985	4	73	8
Imazamoxi	0,9999	-84	61	3	0,9998	-14	66	3
Imazapique	0,9983	-91	63	3	0,9971	-1	50	3
Imazapir	0,9987	-80	31	4	0,9993	-4	35	5
Imazaquim	0,9979	-82	74	5	0,9970	-19	75	3
Imzetapir	0,9987	-92	74	4	0,9996	-9	70	3
Imidacloprido	0,9995	302	78	3	0,9971	-1	78	5
Iprovalicarbe	0,9956	-63	77	6	0,9989	-2	79	5
Linuron	0,9988	-1202	80	4	0,9988	8	92	6
Malationa	0,9942	-51	72	4	0,9986	-24	80	11
Mecarbam	0,9976	-94	70	10	0,9947	-2	101	9
Mefosfolam	0,9986	-75	76	5	0,9987	-2	78	4

Compostos	Beterraba				Cenoura			
	r ²	Efeito matriz (%)	Rec (%)	RSD (%)	r ²	Efeito matriz (%)	Rec (%)	RSD (%)
Mepronil	0,9905	-1064	78	6	0,9928	-3	83	3
Metalaxil	0,9978	4467	83	5	0,9973	3	78	7
Metconazol	0,9956	414	70	7	0,9998	-2	97	8
Metidationa	0,9976	-47	72	15	0,9969	3	76	6
Metiocarbe	0,9998	-66	71	14	0,9963	12	99	16
Metiocarbe sulfona	0,9987	1018	77	1	0,9995	0	81	1
Metiocarbe sulfóxido	0,9987	785	78	2	0,9978	4	78	3
Metomil	0,9991	-81	80	4	0,9990	-1	83	4
Metoxifenoazida	0,9938	-140	70	4	0,9999	-1	84	11
Metribuzim	0,9949	-120	81	19	0,9950	3	90	7
Metsulfurom metílico	0,9991	343	78	11	0,9981	-1	80	9
Mevinfós	0,9989	579	76	5	0,9989	2	80	4
Molinato	0,9955	-70	93	8	0,9928	1	93	21
Monocrotofós	0,9994	482	80	2	0,9993	1	80	2
Monolinuron	0,9972	2708	79	4	0,9953	5	76	3
Miclobutanil	0,9943	-3713	86	19	0,9945	-11	117	15
Nicosulfurom	0,9979	-72	73	3	0,9980	-13	74	2
Nuarimol	0,9958	-124	86	8	0,9994	-5	82	14
Oxadixil	0,9936	-74	76	6	0,9997	-8	80	11
Paraoxom etílico	0,9921	-958	73	3	0,9995	-26	84	2
Parationa-etílica	0,9947	-86	72	17	0,9979	26	88	10
Pencicurom	0,9950	-81	71	7	0,9990	4	76	5
Penconazol	0,9966	-127	70	9	0,9999	-2	88	10
Penoxsulam	0,9900	-78	70	4	0,9996	-11	84	6
Forato	0,9994	-141	85	12	0,9984	1	76	17
Fosalona	0,9931	-53	78	15	0,9973	15	74	7
Fosmet	0,9976	-70	76	3	0,9987	-3	78	8
Picoxistrobina	0,9978	-67	76	9	0,9988	8	74	14
Piperonil butóxido	0,9996	-97	77	2	0,9998	12	85	5
Pirimicarbe	0,9991	856	80	2	0,9997	-2	85	1
Pirimifós-etílico	0,9985	-58	70	4	0,9993	7	78	6
Pirimifós-metílico	0,9982	589	73	5	0,9993	9	85	4
Piriproxifeno	0,9997	-50	73	5	0,9988	21	89	6
Profenofós	0,9938	-37	80	3	0,9998	34	85	8
Prometrina	0,9985	-85	83	4	0,9997	17	82	4
Propanil	0,9930	-73	87	4	0,9966	-1	89	16
Propargito	0,9990	937	79	1	0,9999	8	87	1
Propiconazol	0,9984	178934	81	7	0,9979	0	87	5
Propoxur	0,9956	-1173	75	3	0,9950	2	81	3
Piraclostrobina	0,9945	2157	71	5	0,9953	8	86	5
Pirazofós	0,9962	799	70	14	0,9962	1	81	6
Piridabem	0,9960	1759	75	2	0,9987	-2	83	4
Piridafentiona	0,9970	1005	71	3	0,9968	6	82	5

Compostos	Beterraba				Cenoura			
	r ²	Efeito matriz (%)	Rec (%)	RSD (%)	r ²	Efeito matriz (%)	Rec (%)	RSD (%)
Piridato	0,9979	315	70	4	0,9992	20	77	3
Pirimetanol	0,9997	618	83	7	0,9988	-2	91	7
Quinalfos	0,9995	-47	73	15	0,9997	20	89	10
Quinclorac	0,9996	-74	42	5	0,9997	-7	58	5
Quinoxifem	0,9992	1113	80	2	0,9999	11	84	4
Quizalofop-p-etílico	0,9950	-119	73	3	0,9997	11	71	4
Saflufenacil	0,9988	-203	80	3	0,9986	-19	77	4
Simazina	0,9969	840	89	5	0,9994	-22	90	7
Tebuconazol	0,9985	598	87	18	0,9992	1	90	15
Tebufenozida	0,9906	-37	79	10	0,9951	5	80	15
Tebufenpirada	0,9933	-65	71	9	0,9988	0	72	9
Terbufós	0,9962	-154	83	8	0,9946	9	82	12
Tetraconazol	0,9985	845	80	15	0,9934	0	73	16
Tiabendazol	0,9995	-83	75	3	1,0000	-1	79	3
Tiacloprido	0,9966	4003	76	2	0,9966	2	82	1
Tiametoxam	0,9949	517	70	4	0,9969	-25	81	8
Tiodicarbe	0,9992	-241	81	7	0,9971	-2	73	12
Tiobencarbe	0,9974	-67	70	8	0,9969	7	74	5
Tiofanato metílico	0,9980	-35	77	4	0,9970	-31	74	7
Tolcofós metílico	0,9995	6292	78	8	0,9921	11	92	17
Tolifluanida	0,9921	-52	83	10	0,9980	10	79	18
Triadimefom	0,9934	-251	81	8	0,9932	2	83	14
Triadimenol	0,9919	360	83	11	0,9958	-11	73	17
Triazofós	0,9957	1346	74	3	0,9964	4	76	12
Triciclazol	0,9989	-65	78	3	0,9997	-1	79	3
Trifloxissulfurom	0,9996	-161	90	10	0,9991	-5	72	5
Trifloxistrobina	0,9973	610	73	3	0,9996	2	91	6
Triflumurom	0,9931	-73	71	9	0,9990	-13	82	13
Vamidotiona	0,9997	483	79	6	0,9985	-1	75	6

Fonte: (Autora).

4.4 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS COMERCIAIS

O método validado foi aplicado em 12 amostras comerciais, sendo 6 de tomate, 3 de beterraba e 3 de cenoura do Rio Grande do Sul. A Tabela 17 apresenta os resultados da aplicação do método para estas amostras para avaliar a performance do método em análises de rotina. Oito compostos foram encontrados nas amostras e apenas duas delas não apresentaram resíduos dos compostos avaliados.

Tabela 17 – Resultados das análises em amostras reais de tomate, beterraba e cenoura.

Compostos	LOQ (mg kg ⁻¹)	MRL (mg kg ⁻¹)			Concentração dos agrotóxicos (mg kg ⁻¹)											
					Tomate						Cenoura			Beterraba		
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		ANVISA	EU	CODEX												
Azoxistrobina	0,01	0,5	3	-	<0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Clorantraniliprole	0,01	NA	0,02	0,06	0,011	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Clotianidina	0,01	0,1	-	-	<0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Diflubenzurom	0,01	NA	0,01	NA	0,063	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Famoxadona	0,02	NA	0,01	NA	n.d.	n.d.	0,023	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Imidacloprido	0,01	0,5	0,5	0,5	0,098	n.d.	n.d.	0,016	n.d.	0,012	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Piraclostrobina	0,01	NA	0,01	NA	0,238	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,012	n.d.	n.d.
Tiametoxam	0,01	1	0,2	NA	0,011	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

* n.d. – Não detectado

Fonte: (Autora).

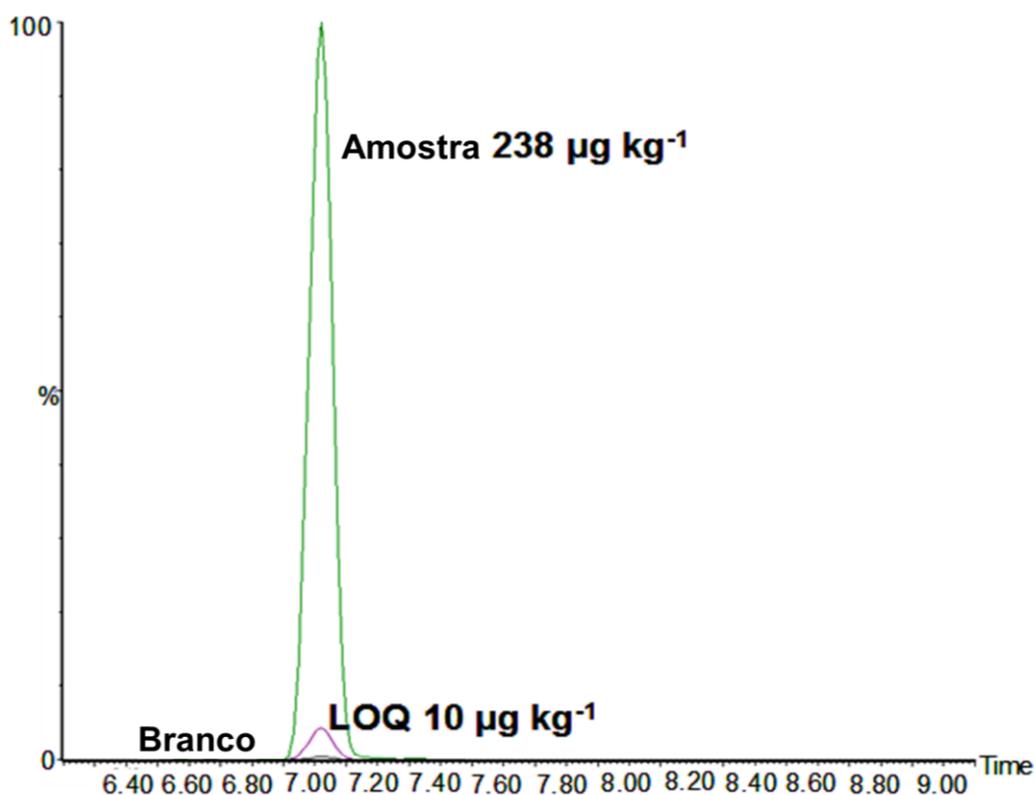
As amostras de tomate analisadas apresentaram resíduos de 8 agrotóxicos com concentrações entre $<0,01$ (LOQ) e $0,238 \text{ mg kg}^{-1}$. Os compostos encontrados foram: clorantraniliprole ($0,011 \text{ mg kg}^{-1}$), diflubenzurom ($0,063 \text{ mg kg}^{-1}$), famoxadona ($0,023 \text{ mg kg}^{-1}$), imidacloprido ($0,098$; $0,016$ e $0,012 \text{ mg kg}^{-1}$), piraclostrobina ($0,238 \text{ mg kg}^{-1}$) e tiametoxam ($0,011 \text{ mg kg}^{-1}$). Sendo assim, os fungicidas piraclostrobina e famoxadona, e o inseticida diflubenzurom estão presentes nas amostras acima do LMR estabelecido pela União Europeia e não são autorizados no Brasil. No entanto, os compostos azoxistrobina e clotianidina permaneceram com concentrações abaixo do LOQ ($0,010 \text{ mg kg}^{-1}$). O composto clorantraniliprole também foi detectado na amostra, mas não é autorizado no Brasil para tomate. Os compostos azoxistrobina, clorianidina, imidacloprido, piraclostrobina e tiametoxam também foram detectados no último monitoramento realizado pelo PARA, mas em concentrações regulares, ou seja, abaixo do LMR estabelecido pela Anvisa.

Ainda, em uma amostra de beterraba foi quantificado resíduo de piraclostrobina, agrotóxico não autorizado no Brasil para beterraba, na concentração de $0,012 \text{ mg kg}^{-1}$. Tal composto também foi detectado em 5 das 357 amostras de beterraba analisadas no último PARA, porém em concentrações abaixo do LMR estabelecido pela Anvisa. Além deste, azoxistrobina, diflubenzurom e imidacloprido também foram detectados em concentrações abaixo do LMR para beterraba no último PARA.

Uma amostra de cenoura também apresentou resíduos de azoxistrobina e de diflubenzurom, mas em concentração $<0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ (LOQ). Tais compostos não foram detectados nas amostras de cenoura analisadas no último PARA. Porém, foram detectados azoxistrobina, imidacloprido e piraclostrobina de forma regular (abaixo do LMR) e tiametoxam de forma irregular (em apenas uma amostra das 353 analisadas).

A Figura 41 apresenta o cromatograma comparativo do sinal analítico do branco de solvente e reagentes, da amostra branco de tomate fortificada com piraclostrobina e da amostra de tomate contendo este agrotóxico.

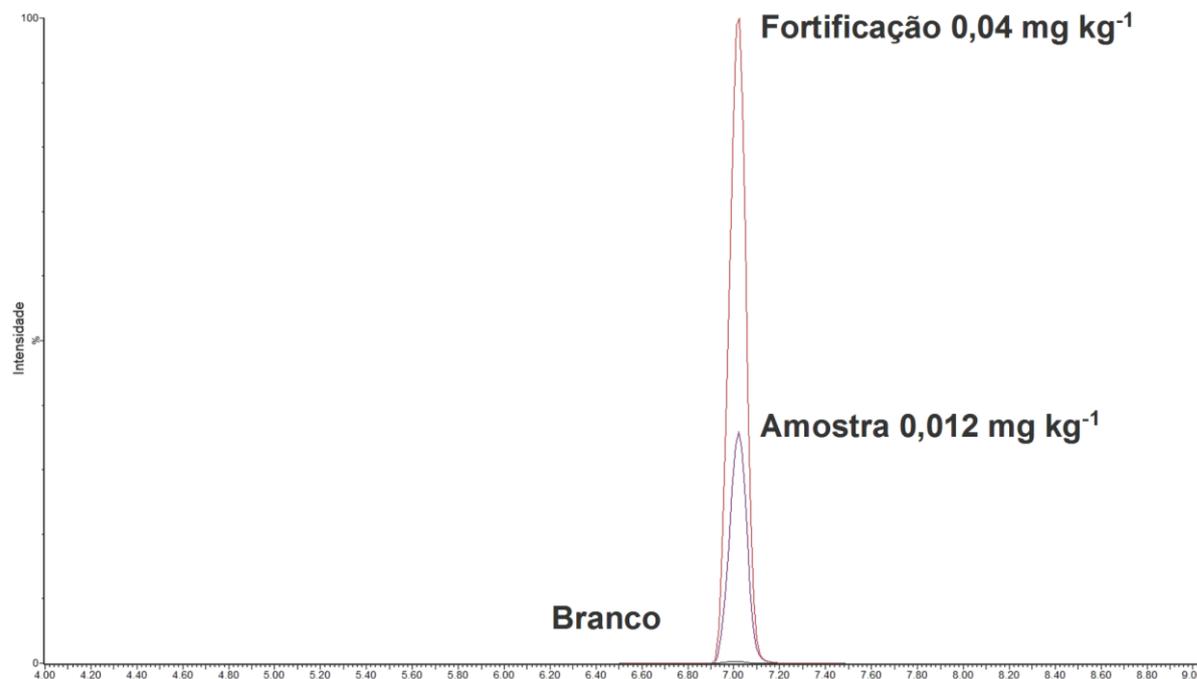
Figura 41 – Cromatograma comparando o sinal do branco de solvente e reagentes (linha preta), da amostra branco de tomate fortificada com piraclostrobina a $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ (linha roxa) e de uma amostra de tomate (linha verde) contendo $0,238 \text{ mg kg}^{-1}$ de piraclostrobina.



Fonte: (Autora).

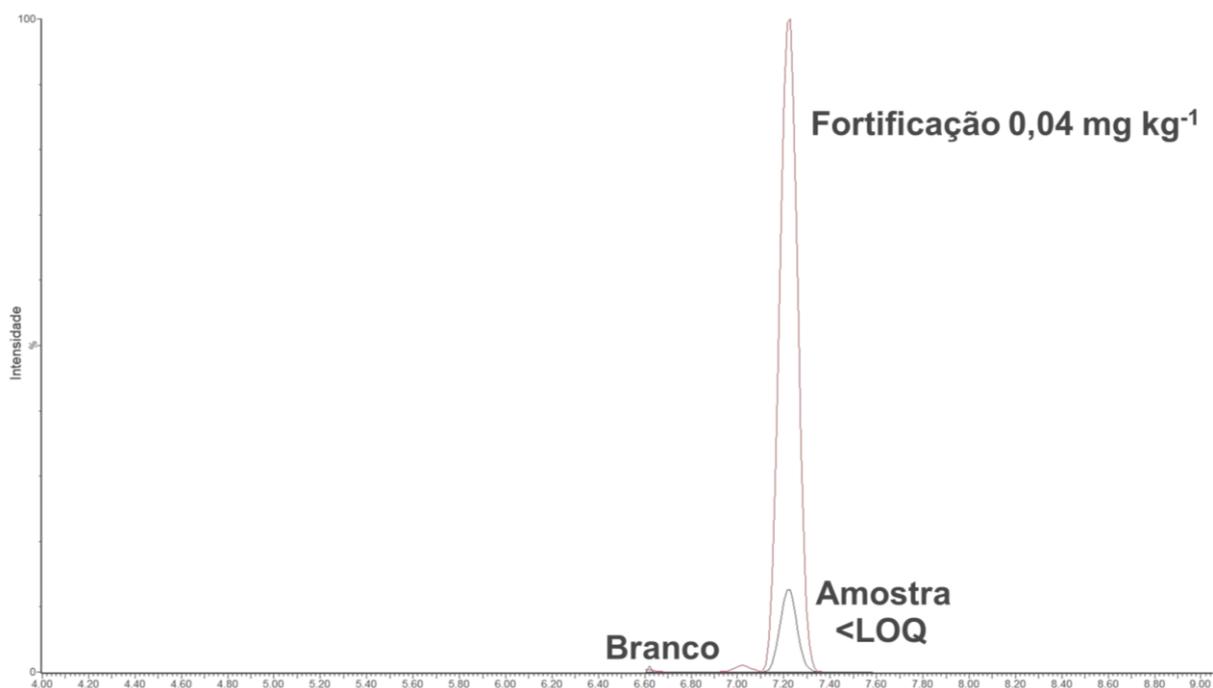
A Figura 42 apresenta o cromatograma comparativo do sinal analítico do branco de solvente e reagentes, da amostra branco de beterraba fortificada com piraclostrobina e da amostra de beterraba contendo este agrotóxico. A Figura 43 apresenta o cromatograma do sinal analítico do branco de solvente e reagentes, da amostra branco de cenoura fortificada com difenoconazol e da amostra de cenoura contendo este agrotóxico em concentração $< \text{LOQ}$.

Figura 42 – Cromatograma comparando o sinal do branco de solvente e reagentes (linha preta), da amostra branco de beterraba fortificada com piraclostrobina a $0,04 \text{ mg kg}^{-1}$ (linha vermelha) e de uma amostra de beterraba (linha roxa) contendo $0,012 \text{ mg kg}^{-1}$ de piraclostrobina.



Fonte: (Autora).

Figura 43 – Cromatograma comparando o sinal do branco de solvente e reagentes (linha roxa), da amostra branco de cenoura fortificada com difenoconazol a $0,04 \text{ mg kg}^{-1}$ (linha vermelha) e de uma amostra de cenoura (linha preta) contendo difenoconazol em concentração $<0,01 \text{ mg kg}^{-1}$.



Fonte: (Autora).

5 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos, é possível concluir que o método QuEChERS acetato modificado sem a etapa de limpeza do extrato, seguido de análise por UHPLC-MS/MS, mostrou-se eficiente para a determinação dos agrotóxicos estudados em beterraba, cenoura e tomate.

Neste estudo, a etapa de limpeza foi substituída por uma maior diluição do extrato em fase móvel, mostrando-se extremamente importante durante o desenvolvimento do trabalho, uma vez que um extrato com menor quantidade de interferentes é imprescindível para a manutenção do sistema de UHPLC-MS/MS, além de ter influência na recuperação dos analitos. Dessa forma, o uso do maior fator de diluição (10x) aumentou a detectabilidade e também agilizou o procedimento de extração.

Resultados de validação satisfatórios foram obtidos para o método proposto, o qual apresentou sensibilidade suficiente para ser aplicado em amostras de análise de rotina e programas de monitoramento, com base no baixo LOQ do método ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) obtido para a maioria dos compostos. O método foi validado de acordo com a SANTE (2019). Parâmetros de seletividade, linearidade, efeito matriz, exatidão e precisão foram avaliados. Dos 131 compostos avaliados, apenas dois (acetamiprido e imazapir) não apresentaram resultados satisfatórios de recuperação e/ou RSD. Por isso, estes compostos não foram considerados na validação.

A análise de amostras reais de beterraba, cenoura e tomate pelo método proposto demonstra uma grande preocupação com a contaminação dos alimentos, uma vez que 8 compostos foram quantificados em concentração de até $238 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o composto piraclostrobina em uma amostra de tomate. Das 6 amostras de tomate analisadas, 4 estavam contaminadas com pelo menos um agrotóxico. Uma das amostras de beterraba também apresentou contaminação por um agrotóxico e uma das amostras de cenoura apresentou resíduo de dois compostos em concentrações <LOQ.

Dessa forma, conclui-se que o método proposto mostrou ser adequado para a análise de 129 compostos e pode ser facilmente aplicado nas análises de rotina de laboratórios.

6 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

Em atividades laboratoriais, resíduos sólidos e líquidos são gerados em uma quantidade significativa durante a realização dos ensaios e, portanto, devem ser tratados ou descartados de forma adequada.

Dessa forma, os resíduos líquidos gerados durante o desenvolvimento deste trabalho foram armazenados em recipientes adequados e devidamente identificados, separados de acordo com sua classificação (halogenados e não halogenados). Os resíduos sólidos foram descartados em saco plástico devidamente identificado.

Ambos os tipos de resíduos foram encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da UFSM, que é responsável pela destinação final dos resíduos gerados, para posteriormente serem tratados e descartados por uma empresa terceirizada e capacitada nesta área.

7 PROPOSTAS FUTURAS DA TESE

- Desenvolver um outro método de preparo de amostra e validar;
- Comparar os resultados obtidos com o método já validado;
- Aplicação dos métodos em amostras comerciais obtidas de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul;
- Analisar amostras com e sem casca, com e sem lavagem com água ou outros métodos de limpeza;
- Avaliar a influência do pH de cada extrato para verificar se tem alguma influência.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAVANJA, M. C. R.; HOPPIN, J. A.; KAMEL, F. Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. **Public Health**, v. 25, p. 155-197, 2004.

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

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

ANDERLINI, R. **A cultura do tomate**. Portugal, Litexa, 1982.

ANDRADE, G. C. R. M.; MONTEIRO, S. H.; FRANCISCO, J. G.; FIGUEIREDO, L. A.; BOTELHO, R. G.; TORNISIELO, V. L. Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry and dynamic multiple reaction monitoring method for determining multiple pesticide residues in tomato. **Food Chemistry**, v. 175, p. 57-65, 2015.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2019. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. Relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018. Primeiro ciclo do Plano Plurianual 2017-2020. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+%E2%80%93+PARA+2017-2018_Final.pdf/e1d0c988-1e69-4054-9a31-70355109acc9>. Acesso em: 6 fev. 2020.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Monografias autorizadas. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>>. Acesso em: 6 fev. 2020.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Publicada reclassificação toxicológica de agrotóxicos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/publicada-reclassificacao-toxicologica-de-agrotoxicos-/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9%20qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageld=en_US>. Acesso em: 25 abr. 2020.

ARIAS, J. L. O.; SCHNEIDER, A.; ANDRADE, J. A. B.; VIEIRA, A. A.; GEHRKE, V. R.; CAMARGO, E. R.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Evaluation of dilute-and-shoot and solid-phase extraction methods for the determination of S-metolachlor and metolachlor-AO in runoff water samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 9, p. 5777-5783, 2017.

AUGUSTO, F. SAMPAIO, B. R. T.; RIBEIRO, F. A. L.; ALEME, H. G.; HANTAO, L. W.; NOROSKA, M. F. F.; MOGOLLON, G. S.; PRATA, P. S.; LIMA, P. F.; BRAGA, S. C. G. N. Microextração em fase sólida: princípios, métodos, sorventes e acoplamento com a cromatografia gasosa. In: BORGES, K. B. *et al.* **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1. ed. Rio de Janeiro, LTC, 2015. cap. 16.

BANDEIRA, D. D.; MUNARETTO, J. S.; RIZZETTI, T. M.; FERRONATO, G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R.; ADAIME, M. B. Determinação de resíduos de agrotóxicos em leite bovino empregando método QuEChERS modificado e GC-MS/MS. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 900-907, 2014.

BERGOUGNOUX, V. The history of tomato: From domestication to biopharming. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 170-189, 2014.

BORGUINI, R. G.; TORRES, E. A. F. S. Tomatoes and tomato products as dietary sources of antioxidants. **Food Reviews International**, v. 25, p. 313-325, 2009.

BRASIL, 1989. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm>. Acesso em: 10 mar. 2019.

BRASIL, 2002. **Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm#art98>. Acesso em: 10 mar. 2019.

BRASIL, 2011. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília-DF, 2011.

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

CABRERA, L. C.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R. Evaluation of alternative sorbents for dispersive solid-phase extraction clean-up in the QuEChERS method for the determination of pesticide residues in rice by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v.39, p.1945-1954, 2016.

CABRERA, L. C.; MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Extração em fase sólida dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 227-240, 2012.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduo de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CAMEL, V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 229-248, 2000.

CARNEIRO, F. F.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. **Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro/São Paulo, Editora Expressão Popular, 2015.

CARVALHO, J. O. M.; VIEIRA, J. V.; UTUMI, M. M.; LIMA, L. M. L. de; LOCATELLI, M. Produtividade de cultivares de cenoura no Município de Vilhena-RO, em dois períodos de cultivo. **Circular Técnica 82, EMBRAPA**, 2006.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análise de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CODEX ALIMENTARIUS. Pesticide Index. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/>>. Acesso em: 06 fev. 2020.

CODEX ALIMENTARIUS. Recommended methods of sampling for the determination of pesticide residues for compliance with MRLs CAC/GL 33-1999. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXG%2B33-1999%252FCXG_033e.pdf>. Acesso em: 06 fev. 2020.

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

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

DAHAMNA, S.; BENCHEIKH, F.; HARZALLAH, D.; BOUSSAHEL, S.; BELGEIT, A.; MERGHEM, M.; BOURICHE, H. Cypermethrin toxic effects on spermatogenesis and male mouse reproductive organs. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, v. 75, n. 2, p. 209-16, 2010.

de MATOS E. M. C.; RIBEIRO L. C.; PRESTES, O. D.; da SILVA, J. A. G.; de FARIAS, B. S.; PINTO, L. A. de A.; ZANELLA, R. Multiclass method for the determination of pesticide residues in oat using modified QuEChERS with alternative sorbent and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Food Anal Methods**, v. 12, p. 2835-2844, 2019.

DÓREA, H. S.; LOPES, W. G. Aplicação da técnica de Disperção da Matriz em Fase Sólida (DMFS) na análise de pesticidas em quiabo por GC-MS. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 892-896, 2004.

EATON, D. L.; DAROFF, R. B.; AUTRUP, H.; BRIDGES, J.; BUFFLER, P.; COSTA, L. G.; COYLE, J.; MCKHANN, G.; MOBLEY, W. C.; NADEL, L.; NEUBERT, D.; SCHULTE-HERMANN, R.; SPENCER, P. S. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 2, p. 1-125, 2008.

EUROPEAN COMMISSION. EU Pesticides Database. Disponível em: <<https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN>>. Acesso em: 6 fev. 2020.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. **Eurachem Guide**, 2^a ed., 2014.

FERRER, C.; LOZANO, A.; AGUERA, A. A.; JIMÉNEZ, G.; ALBA, A. R. F. Overcoming matrix effects using dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. **Jurnal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7634-7639, 2011.

FRANCESQUETT, J. Z.; RIZZETTI, T. M.; CADAVAL, T. R. S. J.; PRESTES, O. D., ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Simultaneous determination of the quaternary ammonium pesticides paraquat, diquat, chlormequat, and mepiquat in barley and wheat using a modified quick polar pesticides method, diluted standard addition

calibration and hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1592, p. 101-111, 2019.

GALLI, A.; SOUZA, D. de; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. B. F.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.

GEBREHIWOT, W. H.; ERKMEN, C.; USLU, B. A novel HPLC-DAD method with dilute-and-shoot sample preparation technique for the determination of buprofezin, dinobuton and chlorothalonil in food, environmental and biological samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 99, p. 1-15, 2019.

GOLGE, O.; KABAK, B. Evaluation of QuEChERS sample preparation and liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry method for the determination of 109 pesticide residues in tomatoes. **Food Chemistry**, v. 176, p. 319-322, 2015.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro:LTC, 2005, cap. 22.

IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**, 2019. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 24 mar. 2019.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, DOQ-CGCRE-008, revisão 07, 2020.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**, 2^a ed. ("Gold Book). Compilado por A. D. McNaught e A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org>>. Acesso em: 04 mar. 2018.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: Fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. A.; QUEIROZ, S. C. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

JOBIM, P. F. C; NUNES, L. N.; GIUGLIANI, R.; CRUZ, I. B. M. da. Existe uma associação entre mortalidade por câncer e uso de agrotóxicos? Uma contribuição ao debate. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 1, p. 277-288, 2010.

KEMMERICH, M.; RIZZETTI, T. M.; MARTINS, M. L.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Optimization by Central Composite Design of a modified QuEChERS method for extraction of pesticide multiresidue in sweet pepper and analysis by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 8, p. 728-739, 2015.

KJAERSTAD, M. B.; TAXVIG, C.; NELLEMAN, C.; VINGGAARD, A. M.; ANDERSEN, H. R. Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. **Reproductive Toxicology**, v. 30, n. 4, p. 573-82, 2010.

KOCAMAN, A. Y.; TOPAKTAŞ, M. The in vitro genotoxic effects of a commercial formulation of alpha-cypermethrin in human peripheral blood lymphocytes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 50, n. 1, p. 27-36, 2009.

KOIFMAN, S.; HATAGIMA, A. Disruptores endócrinos no ambiente: efeitos biológicos potenciais (Editorial). **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 13, n. 1, p. 9-11, 2003.

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

LANÇAS, F. M.; PELISSON, L. Extração por fluído supercrítico (SFE). In: BORGES, K. B. *et al.* **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1. ed. Rio de Janeiro, LTC, 2015. cap. 22.

LARA, M. C. R. **Determinação dos agrotóxicos procimidona, haloxyfop-metil e linuron em cenoura por ESL-PBT e CG-MS**. 2014. 55 p. Dissertação (Pós-graduação em Agronomia - Produção Vegetal)-Universidade Federal de Viçosa, Rio Paranaíba, MG, 2014.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of the AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 615-629, 2005.

LOPES, S. B.; FERREIRA, N. A.; CARVALHO, P. G. B. de; MATTOS, L. M.; MORETTI, C. L.; MALDONADE, I. R. Aproveitamento do resíduo gerado na produção de mini beterrabas para a produção de farinha. **Comunicado Técnico 80, EMBRAPA**, 2011.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 197-207, 2012.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Agrofit, 2020. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 25 abr. 2020.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). PNCRC/Vegetal, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/copy_of_pncrc-vegetal>. Acesso em: 25 abr. 2020.

MARTINS, M. L.; KEMMERICH, M.; PRESTES, O. D.; MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F.; ZANELLA, R. Evaluation of an alternative fluorinated sorbent for dispersive solid-phase extraction clean-up of the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method for pesticide residues analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1514, p. 36-43, 2017.

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

MELO, A.; CUNHA, S. C.; MANSILHA, C.; AGUIR, A.; PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. I. V. O. Monitoring pesticide residues in greenhouse tomato by combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1071-1077, 2012.

NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos. 4ª ed., Bookman, 2010, cap. 26.

NOGUEIRA, J. M. F. Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE): uma metodologia inovadora para microextração estática. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 4, p. 259-269, 2012.

OLIVEIRA, M. A. L.; PORTO, B. L. S.; VAZ, F. A. S.; SATO, R. T. Planejamento de experimentos aplicado ao preparo de amostras. In: BORGES, K. B. *et al.* **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1. ed. Rio de Janeiro, LTC, 2015. cap. 4.

PINHEIRO, J. B. Nematoides na cultura da beterraba. **Circular Técnica 85, EMBRAPA**, 2011.

PUCCI, V.; DI PALMA, S.; ALFIERI, A.; BONELLI, F.; MONTEAGUDO, E. A novel strategy for reducing phospholipids-based matrix effect in LC-ESI-MS bioanalysis by means of HybridSPE. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, n. 5, p. 867-871, 2009.

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

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

RAKITSKY, V. N.; KOBLYAKOV, V. A.; TURUSOV, V.S. Nongenotoxic (epigenetic) carcinogens: pesticides as an example: a critical review. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 229-40, 2000.

REIS, H. S. **Avaliação do teor de pigmentos naturais em diferentes espécies de tomate cherry**. 2016. 42 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2016.

RESENDE, G. M.; CORDEIRO, G. G. Uso da água salina e condicionador de solo na produtividade de beterraba e cenoura no semi-árido do submédio São Francisco. **Comunicado Técnico 128, EMBRAPA**, 2007.

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

RIBAS, M. C.; MANTOVANI, D.; AWADALLAK, J. A.; CANEVESI, R. L.; TAZINAFO, N. M.; FILHO, L. C.; PALÚ, F.; SILVA, E. A. Study of candeia oil extraction using pressurized fluids and purification by adsorption process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 177-782, 2014.

RIZZETTI, T. M.; KEMMERICH, M.; MARTINS, M. L.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 196, p. 25-33, 2016.

RODRIGUES, S. A. **Otimização e validação de métodos empregando MSPD, QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola**. 2010. 122 p. Dissertação (Pós-graduação em Química Tecnológica e Ambiental)-Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2010.

SAMPAIO, M. R. F. **Otimização e validação de métodos empregando QuEChERS modificado, LC-DAD e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em derivados da cana-de-açúcar**. 2011. 121 p. Dissertação (Pós-

graduação em Química Tecnológica e Ambiental)-Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2011.

SANTE. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. SANTE/12682/2019. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2019-12682.pdf>. Acesso em: 7 mar. 2020.

SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, lowpressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 758, p. 80-92, 2013.

SAPOZHNIKOVA, Y. Development of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for analysis of polyphenolic compounds in liquid samples of grape juice, green tea and coffee. **Food Chemistry**, v. 150, p. 87-93, 2014.

SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. S. Estabilidade de corantes e pigmentos de origem vegetal. **Revista Fitos**, v. 3, n. 2, p. 6-24, 2007.

SHARMA, K. D.; KARKI, S.; THAKUR, N. S.; ATTRI, S. Chemical composition, functional properties and processing of carrot - a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 22-32, 2012.

SILVA, A. C. B.; SCHUQUEL, L. C. S.; SILVA, C. O.; PASCOAL, G. B. Qualidade nutricional e físico-química em cenoura (*Daucus carota L.*) *in natura* e minimamente processada. **Demetra: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 11, n. 2, p. 355-367, 2016.

SILVA, J. M. da; SILVA, E. N.; FARIA, H. P.; PINHEIRO, T. M. M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, n. 4, p. 891-903, 2005.

SILVA, L. P.; MADUREIRA, F.; VARGAS, E. A.; FARIA, A. F.; AUGUSTI, R. Development and validation of a multianalyte method for quantification of mycotoxins and pesticides in rice using a simple dilute and shoot procedure and UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 270, p. 420-427, 2019.

SINDAG. Sobre o uso crescente de agrotóxicos e evolução da produção agrícola no Brasil. Disponível em: <<http://sindag.org.br/sobre-o-uso-crescente-de-agrotoxicos-e-evolucao-da-producao-agricola-no-brasil/>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

SINDIVEG (2018). O que você deve saber sobre defensivos agrícolas. Disponível em: < <http://sindiveg.org.br/wp-content/uploads/2018/08/oquevoceprecisasabersobredefensivosagricolas.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

SINDIVEG (2015). Balanço 2015 - Setor de agroquímicos confirma queda de vendas. Disponível em: < <http://www.sindiveg.org.br/docs/balanco-2015.pdf>>. Acesso em: 06 fev. 2018.

STOLARCZYK, J.; JANICK, J. Carrot: History and Iconography. **Chronica Horticulturae**, v. 51, n. 2, p. 13-18, 2011.

TACO, **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**, Campinas-SP, 4ª Edição Revisada e Ampliada, 2011. Disponível em: < http://www.cfn.org.br/wp-content/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2018.

TOMASINI, D.; SAMPAIO, M. R. F.; CARDOSO, L. V.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction and the modified QuEChERS method for the determination of fipronil in honey by high performance liquid chromatography with diode-array detection. **Analytical Methods**, v. 3, p. 1893-1900, 2011.

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

VITTI, M. C. D.; KLUGE, R. A.; YAMAMOTTO, L. K.; JACOMINO, A. P. Comportamento da beterraba minimamente processada em diferentes espessuras de corte. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 623-626, 2003.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

WOLANSKY, M. J.; GENNINGS, C.; CROFTON, K. M. Relative potencies for acute effects of pyrethroids on motor function in rats. **Toxicological Sciences**, v. 89, n. 1, p. 271-7, 2006.

WOLANSKY, M. J.; HARRILL, J. A. Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: a critical review. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 30, p. 55-78, 2008.

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