



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

Franciele Fátima Machado

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

Santa Maria, RS

2022

Franciele Fátima Machado

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

Dissertação apresentada ao 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 **Mestre em Química**, área de concentração Química Analítica

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Martha Bohrer Adaime

Santa Maria, RS

2022

Machado, Franciele Fátima  
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MANGA  
EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS E UHPLC-MS/MS / Franciele  
Fátima Machado.- 2022.  
79 p.; 30 cm

Orientadora: Martha Bohrer Adaime  
Coorientadora: Renato Zanella  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Química, RS, 2022

1. Agrotóxicos 2. Preparo de amostra 3. Química  
Analítica 4. Cromatografia Líquida I. Bohrer Adaime,  
Martha II. Zanella, Renato III. Título.

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

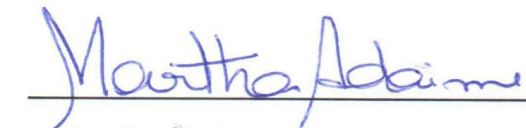
Declaro, FRANCIELE FÁTIMA MACHADO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro,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

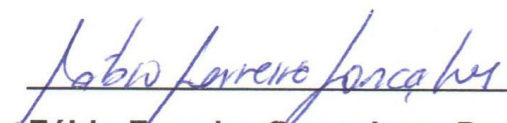
Franciele Fátima Machado

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

Dissertação apresentada ao 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 **Mestre em Química**.

Aprovada em 16 de março de 2022:

  
\_\_\_\_\_  
**Martha Bohrer Adaime, Dr. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Fábio Ferreira Gonçalves, Dr. (FURG)**

  
\_\_\_\_\_  
**Osmar Damian Prestes, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, RS

2022

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao meu pai Leonel, que não está mais presente neste plano, mas que sempre sonhou em me ver onde eu estou hoje.*

## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente quero agradecer a Deus, por ter me dado força, principalmente nos momentos em que eu mais precisei. E ao meu pai que não está mais presente neste plano, mas que eu sei que esteve sempre comigo.

Agradeço incansavelmente minha mãe Maria Líria por nunca medir esforços para me ajudar, por sempre estar disposta a fazer tudo por mim. Obrigada por não desistir de mim e dos meus sonhos e por lutar junto comigo por todos eles. Agradeço da mesma forma meu padrasto Alberi, que sempre me ajudou e me deu apoio em tudo o que eu precisei. Ao meu irmão Esmael, que sempre esteve presente durante essa trajetória, me apoiando e me dando o suporte necessário. Família, amo vocês.

Agradeço todos os demais familiares que sempre estiveram comigo, especialmente meu vô Adão, um homem do qual me orgulho e é minha inspiração. Agradeço a todos os meus amigos, que entenderam minhas ausências e me deram o apoio necessário, em especial minha amiga Ana Paula que além de tudo foi minha colega durante toda essa jornada e a minha amiga Cândida que nunca mediu esforços para que eu pudesse alcançar meu sucesso, sempre me incentivando e me ajudando em todos os momentos. Vocês foram extremamente essenciais, amo vocês.

Agradeço ao meu namorado Augusto, por estar comigo durante essa reta final, me apoiando, me incentivando e me acalmando nos momentos mais difíceis. Obrigada por tudo, teu apoio foi fundamental, amo você.

Agradeço aos meus amigos e colegas do LARP, em especial à Daniela, a Luana e a Cleusa, sem vocês eu não teria conseguido. Obrigada por tornarem esses dois anos menos difíceis e por amenizarem minha ansiedade com tudo o que estava por vir. Luana e Dani, obrigada também por me ajudarem em absolutamente tudo, sem nunca deixarem de me ajudar. Vou levar vocês para sempre no meu coração.

Um agradecimento especial a minha orientadora Martha e ao meu coorientador Renato, que não mediram esforços para me auxiliar durante toda essa trajetória. Agradeço também ao professor Osmar, por sempre estar disposto a ajudar.

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

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade e ao CNPq pela bolsa de fomento.

## RESUMO

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

AUTORA: Franciele Fátima Machado

ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Martha Bohrer Adaime

Os agrotóxicos são aplicados desde o desenvolvimento da planta até a sua produção, transporte e armazenamento. Quando não são aplicados de maneira correta essas substâncias químicas podem causar danos à saúde humana e ao meio ambiente. Dessa maneira, este estudo teve como objetivo o desenvolvimento e a validação de um método analítico para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em manga, empregando método QuEChERS original e cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS). Para a limpeza dos extratos foi empregada a técnica de extração de fase sólida dispersiva (d-SPE) utilizando como sorvente o Strata™-X. O método foi validado para 60 compostos e os resultados indicaram que o método aplicado é linear no intervalo de 0,5 a 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A precisão e a exatidão foram avaliadas em quatro níveis de fortificação, sendo eles: 5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (n= 5), apresentando recuperações entre 70 e 120%, com RSD  $\leq$  20%. Os limites de quantificação do método variaram de 5 a 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para a maioria dos agrotóxicos e os limites de detecção 1,5 a 3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Para avaliar a validação e a precisão intermediária desse método, este foi aplicado em dezesseis amostras comerciais de manga. A aplicabilidade do método foi realizada pela análise de dezesseis amostras comerciais e os resultados mostraram a presença de resíduos de agrotóxicos com concentrações abaixo do que é permitido pela legislação brasileira e agrotóxicos proibidos para cultivo de manga, como o carbendazim.

**Palavras-chave:** Manga. Agrotóxico. QuEChERS. Strata™-X. UHPLC-MS/MS



## ABSTRACT

### DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN MANGO USING QuEChERS AND UHPLC-MS/MS METHOD

AUTHOR: Franciele Fátima Machado  
ADVISOR: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Martha Bohrer Adaime

Pesticides are applied from the development of the plant to its production, transport and storage. When not applied correctly, these chemicals can cause harm to human health and the environment. Thus, this work aimed to develop and validate an analytical method for the determination multiresidue of pesticides in mango, using the original QuEChERS method and ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). The dispersive solid phase extraction (d-SPE) technique was used to clean the extracts with Strata™-X as sorbent. The method was validated for 60 compounds and the results indicated that the applied method is linear in the range of 0.5 to 20 µg L<sup>-1</sup>. Precision and accuracy were evaluated at four spike levels, namely: 5, 10, 25 and 50 µg kg<sup>-1</sup> (n= 5), showing recoveries between 70 and 120%, with RSD ≤ 20%. The method limits of quantification ranged from 5 to 10 µg kg<sup>-1</sup> for most of the pesticides and the limits of detection from 1.5 to 3 µg kg<sup>-1</sup>. To evaluate the validation and intermediate precision of this method, it was applied to sixteen commercial samples of mango. The applicability of the method was performed by analyzing sixteen commercial samples and the results showed the presence of pesticide residues with concentrations below what is allowed by Brazilian legislation and pesticides prohibited for mango cultivation, such as carbendazim.

**Keywords:** Mango. pesticide. QuEChERS. Strata™-X. UHPLC-MS/MS

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Manga .....   | 20 |
| Figura 2 - Classificação dos agrotóxicos .....   | 25 |
| Figura 3 - Linha do tempo dos métodos multirresíduo .....  | 31 |
| Figura 4 - Principais etapas do método QuEChERS .....  | 34 |
| Figura 5 - Representação das principais versões do método QuEChERS (a) original, (b) acetato e (c) citrato .....   | 36 |
| Figura 6 - Cromatogramas de íons totais obtidos por UHPLC-MS/MS a partir de uma solução analítica de concentração $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ , preparada no solvente de extração .....             | 51 |
| Figura 7 - Avaliação das variações do método QuEChERS em termos de quantidade de compostos recuperados após a fortificação da amostra branco na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ .....   | 54 |
| Figura 8 - Pigmento dos extratos com o uso de diferentes sorventes .....   | 55 |
| Figura 9 - Resultado da análise comparativa dos sorventes .....  | 55 |
| Figura 10 - Fluxograma do método de extração multirresíduo de agrotóxicos em manga .....   | 56 |
| Figura 11 - Resultado dos compostos recuperados com 300 mg de $\text{MgSO}_4$ e 100 mg de sorvente (com exceção do carvão ativado e GCB que foram 10 mg) .....                                   | 57 |
| Figura 12 - Strata™-X .....  | 57 |
| Figura 13 - Resultado dos compostos recuperados a partir de um planejamento fatorial entre o sal secante ( $\text{MgSO}_4$ ) e o sorvente (Strata™-X) .....                                      | 58 |
| Figura 14 - Método de extração para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em manga .....   | 59 |
| Figura 15 - Cromatogramas representativos obtidos no modo SRM por UHPLC-MS/MS para o composto (a) atrazina ( $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), (b) extrato branco da matriz e (c) branco reagente ..... | 61 |
| Figura 16 - Cromatograma para o composto carbendazim na amostra A10 sobreposto ao cromatograma de fortificação no nível do LOQ ( $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) .....                                 | 69 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 - Composição da manga .....   | 21 |
| Tabela 2 - Produção brasileira de manga .....  | 22 |
| Tabela 3 - Classificação dos agrotóxicos quanto à classe agronômica e LMRs ..  | 26 |
| Tabela 4 - Preparo de amostras empregando o método QuEChERS para extração de agrotóxicos em diferentes matrizes .....  | 32 |
| Tabela 5 - Parâmetros para Validação do Método .....   | 37 |
| Tabela 6 - Relação dos compostos em estudo, com informações de classe agronômica, grupo químico e massa molar .....  | 41 |
| Tabela 7 - Gradiente da fase móvel utilizado para a determinação de agrotóxicos em manga no sistema UHPLC-MS/MS .....  | 43 |
| Tabela 8 - Método QuEChERS (a) original, (b) acetato e (c) citrato .....   | 45 |
| Tabela 9 - Planejamento fatorial entre o sulfato de magnésio e o sorvente.....   | 46 |
| Tabela 10 - Identificação das amostras adquiridas em diferentes municípios do Estado do Rio Grande do Sul (RS) .....   | 50 |
| Tabela 11 - Agrotóxicos analisados por UHPLC-MS/MS utilizando o modo de ionização ESI+, no modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção (tR), íons precursores e produtos .....                                     | 52 |
| Tabela 12 - Equação da reta e coeficientes de determinação (r <sup>2</sup> ) e efeito matriz para cada agrotóxico .....  | 62 |
| Tabela 13 - Resultados de validação do método QuEChERS original: efeito matriz (EM %), LOQ, LOD, linearidade (coeficiente de determinação, r <sup>2</sup> ), exatidão (recuperação, %) e precisão (RSD, %) para a matriz manga ..... | 65 |
| Tabela 14 - Resultados, em µg kg <sup>-1</sup> , das amostras de manga que apresentaram resíduos de agrotóxicos sendo analisadas utilizando o método QuEChERS original e UHPLC-MS/MS .....   | 68 |
| Tabela 15 - - Comparação das concentrações encontradas nas amostras com os LMRs .....  | 69 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI: Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

C18: Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano

CI: Ionização Química, do inglês *Chemical Ionization*

d-SPE: Extração em fase sólida dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*

EI: Ionização por elétrons, do inglês *Electron Ionization*

ESI: Ionização por Eletronebulização, do inglês *Electrospray Ionization*

Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EU: União europeia

GC: Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

GCB: Carbono Grafitizado, do inglês *Graphitized Carbon Black*

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

HPLC-MS/MS: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês *High Performance Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

LARP: Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas

LC-MS/MS: Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*

LMRs: Limites Máximos de Resíduos, do inglês

LOD: Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LODi: Limite de Detecção do instrumento, do inglês *Limit of Detection of the Instrument*

LODm: Limite de Detecção do método, do inglês *Limit of Detection of the Method*

LOQ: Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

LOQm: Limite de Quantificação do método, do inglês *Limit of Quantification of the Method*

MgSO<sub>4</sub>: Sulfato de magnésio anidro

M. M.: Massa Molecular

m/z: Razão massa/carga

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeCN: Acetonitrila

MRM: Monitoramento de Reações Múltiplas, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*

PARA: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PC: Padrão de controle

PI: Padrão Interno

PSA: Amina primária secundária, do inglês *Primary Secondary Amine*

QuEChERS: Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and safe*

r<sup>2</sup>: Coeficiente de determinação

rpm: Rotações por minuto

RSD: Desvio padrão relativo

RSDpi: Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

RSDr: Desvio Padrão Relativo para Repetitividade

S/R: Sinal/ruído

SANTÉ: Guia de Saúde e Proteção do Consumidor, do francês *Santé et Protection des Consommateurs*.

SIM: Monitoramento do Íon Selecionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*

SPE: Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

SRM: Monitoramento de Reação Selecionada, do inglês *Selected Reaction Monitoring*.

TPP: Trifenilfosfato, do inglês *triphenylphosphate*

t<sub>R</sub>: Tempo de retenção

v/v: Volume por volume

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....   | 18 |
| 1.1 OBJETIVOS .....  | 19 |
| 1.1.1 Objetivos específicos .....  | 19 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....  | 20 |
| 2.1 ORIGEM DA MANGA NO BRASIL .....  | 20 |
| 2.2 PRODUÇÃO DE MANGA NO BRASIL .....  | 21 |
| 2.3 AGROTÓXICOS .....  | 23 |
| 2.3.1 Classificação e toxicidade.....  | 24 |
| 2.3.2 Controle e uso de agrotóxicos na manga .....                                   | 25 |
| 2.4 DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS .....                     | 28 |
| 2.4.1 Técnicas cromatográficas para determinação multirresíduo de agrotóxicos .....  | 28 |
| 2.4.2 Preparo de amostra para a determinação multirresíduo de agrotóxicos            | 30 |
| 2.4.2.1 QuEChERS .....   | 33 |
| 2.5 VALIDAÇÃO.....   | 36 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 38 |
| 3.1 INSTRUMENTAÇÃO .....   | 38 |
| 3.3 AMOSTRAS.....  | 39 |
| 3.4 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO E DO PADRÃO DE CONTROLE .....                          | 40 |
| 3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS DOS ANALITOS SELECIONADOS.....                   | 40 |
| 3.6 SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM MANGA..... | 42 |
| 3.6.1 Escolha da fase móvel.....   | 42 |

|  |    |
|--|----|
| 3.7 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA O PREPARO DE AMOSTRA VISANDO A DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM MANGA..... | 44 |
| 3.7.1 Etapa de extração/partição .....   | 44 |
| 3.7.2 Modificações na etapa de limpeza do método QuEChERS.....   | 45 |
| 3.7.3 Planejamento fatorial 3 <sup>2</sup> .....   | 46 |
| 3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS PARA A DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM MANGA .....                             | 47 |
| 3.8.1 Seletividade .....   | 47 |
| 3.8.2 Curva analítica e faixa de trabalho.....   | 47 |
| 3.8.3 LOD e LOQ do instrumento e do método .....   | 48 |
| 3.8.4 Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão.....   | 48 |
| 3.8.5 Precisão (repetitividade e precisão intermediária) .....   | 49 |
| 3.8.6 Efeito matriz.....   | 49 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....  | 51 |
| 4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM MANGA.....                          | 53 |
| 4.2 PREPARO DE AMOSTRA.....  | 53 |
| 4.2.1 Avaliação dos ensaios de extração realizados para a determinação de multirresíduo de agrotóxicos em manga.....         | 53 |
| 4.2.2 Avaliação de sorventes utilizados na etapa de limpeza do extrato .....   | 54 |
| 4.2.3 Avaliação do planejamento fatorial .....   | 58 |
| 4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO OTIMIZADO.....   | 59 |
| 4.3.1 Seletividade .....   | 60 |
| 4.3.2 Curva analítica, faixa linear e efeito matriz .....  | 62 |
| 4.3.3 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOD) do método .   | 64 |
| 4.3.4 Exatidão (ensaios de recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária).....                             | 64 |



|  |    |
|--|----|
| 4.4 APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS REAIS .....   | 68 |
| 5 CONCLUSÃO.....                         | 71 |
| 6 DESTINO DO MULTIRRESÍDUO GERADO .....  | 72 |
| 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS ..... | 73 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....         | 74 |

## 1 INTRODUÇÃO

A manga é uma fruta que pertence à família *Anacardiaceae*, e segundo relatos históricos, originou-se no sul da Ásia. O consumo dessa fruta tem se expandido de forma gradativa, fazendo com que a sua produção aumente significativamente. O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo, perdendo apenas para a China e a Índia (EMBRAPA, 2010).

O cultivo dessa cultura está diretamente ligado ao emprego de agrotóxicos, uma vez que, durante as etapas de produção estes são utilizados com a finalidade de controlar os danos provocados por espécies indesejadas. Entretanto, essas substâncias, quando usadas de maneira incorreta, podem causar danos à saúde humana e ao meio ambiente (MARUTESCU; CHIFIRUC, 2017).

Em virtude disso, a confiança do consumidor na hora de consumir os alimentos está associada à segurança alimentar. Dessa forma, Limites Máximos de Resíduos (LMRs) foram estabelecidos e regulamentados por diversos programas governamentais. (FERMAM; ANTUNES, 2009). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) utiliza como referência os Estados Unidos e a União Europeia para estabelecer esses limites (ANVISA, 2020a). Alinhado a isso, está o Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) que funciona como um sistema nacional de vigilância sanitária, coordenado pela ANVISA e demais órgãos, que realizam análises para a determinação de multirresíduo de agrotóxicos em diversas matrizes alimentares (ANVISA, 2020b).

Dessa maneira, por isso é importante que se faça um acompanhamento regular dos limites máximos de resíduos presentes nas amostras alimentares, prezando o bem-estar da vida humana e do meio ambiente. Dessa forma, o papel do Químico Analítico é desenvolver e validar métodos que sejam eficientes, de baixo custo, satisfatórios e acima de tudo que prezem pelos princípios baseados na Química Verde.

O método QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and safe*) tem se tornado muito eficiente para a determinação de multirresíduo em matrizes alimentares. Para esse método existem três versões diferentes, o método QuEChERS original, o acetato e o citrato (ANNASTASSIADES *et al.*, 2003).

Aliado a um bom preparo de amostra está a escolha do equipamento que vai fazer a determinação dos compostos. O emprego da Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência (UHPLC) acoplada à espectrometria de massas em série (MS/MS) possibilita análises com um tempo de retenção menor, sem perda da resolução e detecção de multirresíduo em concentrações menores (MALDANER; JARDIM, 2012).

## **1.1 OBJETIVOS**

O presente trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento e a validação de um método analítico para a determinação de multirresíduo de agrotóxico em amostras comerciais de manga. As análises serão realizadas por UHPLC-MS/MS e o método de preparo de amostra será baseado no método QuEChERS.

### **1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I. Avaliar qual o melhor método de extração para a determinação de multirresíduo de agrotóxico em manga.
- II. Avaliar quais sorventes são eficazes na limpeza do extrato, sem interferir na recuperação dos analitos
- III. Validar o método desenvolvido, de maneira a atender os parâmetros da legislação brasileira (ANVISA) para a determinação de agrotóxicos em matrizes alimentares;
- IV. Aplicar o método desenvolvido e validado em amostras comerciais de diferentes mercados.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ORIGEM DA MANGA NO BRASIL

A mangueira (*Mangifera indica* L.) pertence à família *Anacardiaceae* e originou-se no sul da Ásia, mas com o passar do tempo foi sendo introduzida em vários lugares, inclusive no Brasil. É conhecida por ser uma fruta de polpa firme, com sabor e aroma muito agradáveis e faz parte do grupo de frutas tropicais com maior importância econômica, além de ser uma fruta rica em minerais, carboidratos e carotenoides (BRANDÃO *et al.*, 2003). A sua comercialização é geralmente *in natura*, mas pode ser feita de diversas maneiras, como sucos, geleias, compotas, sorvetes e outros.

A fruticultura vem tendo um espaço cada vez mais importante na economia brasileira, uma vez que, o consumo desses alimentos tem crescido progressivamente e conseqüentemente houve o aumento das produções. Atualmente, o Brasil é o terceiro país que mais produz frutas, equivalendo a cerca de 45 milhões de toneladas ao ano, sendo que 65% dessa produção é destinada ao mercado interno e 35% ao mercado externo. A mangicultura se expandiu no Brasil inicialmente no Estado de São Paulo e depois se difundiu pelas demais regiões, predominando as regiões nordeste do país, sobretudo o Vale do São Francisco, localizado na Bahia. (EMBRAPA, 2010).

Figura 1 - Manga



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

A composição da manga varia de acordo com as condições a que a cultura foi submetida e qual o estágio de maturação. Entretanto, ela é basicamente constituída

de água, carboidratos, ácidos orgânicos, sais minerais, proteínas, vitaminas, e etc. A tabela 1 apresenta os principais macronutrientes da manga.

Tabela 1 - Composição da manga

| <b>Macronutrientes</b> | <b>Unidade</b> |       | <b>%VD*</b> |
|------------------------|----------------|-------|-------------|
| Energia                | kcal           | 72    | 3,6%        |
| Carboidrato            | g              | 19,35 | 6,55%       |
| Proteína               | g              | 0,41  | 0,5%        |
| Gorduras totais        | g              | 0,17  | 0,3%        |
| Fibra alimentar        | g              | 1,63  | 6,5%        |
| Água                   | g              | 79,74 | -           |

Fonte: Tabela nutricional TACO

\* Valores Diários de referência com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8400 kJ. Os valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.

## 2.2 PRODUÇÃO DE MANGA NO BRASIL

A produção de manga no Brasil tem aumentado nos últimos anos, favorecendo a economia brasileira. Apesar da pandemia no início 2020 os recordes de exportação dessa matriz superaram os anos anteriores. (EMBRAPA, 2021). A região do Vale do São Francisco, localizada em pleno semiárido do Nordeste é a região que mais produz esse alimento, chegando a 212,2 mil toneladas no último ano (EMBRAPA, 2021).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2020) no ano de 2019 o Brasil produziu cerca de 1.414.338 toneladas de manga, ocupando uma área de 67.328 hectares.

A tabela 2 evidencia que os estados da região Nordeste do Brasil foram os que mais produziram manga no ano de 2019, equivalendo a uma produção de 1.414.338 toneladas, tendo um rendimento superior a 20 toneladas por hectare.

Tabela 2 - Produção brasileira de manga

| <b>ESTADOS</b>      | <b>ÁREA COLHIDA<br/>(ha)</b> | <b>PRODUÇÃO (t)</b> | <b>RENDIMENTO<br/>(ton ha<sup>-1</sup>)</b> |
|---------------------|------------------------------|---------------------|---|
| Pernambuco          | 14.174                       | 518231              | 36,56                                       |
| Bahia               | 24.096                       | 442233              | 18,35                                       |
| São Paulo           | 10.763                       | 206854              | 19,22                                       |
| Minas Gerais        | 5.062                        | 84638               | 16,72                                       |
| Rio Grande do Norte | 2.682                        | 46922               | 17,50                                       |
| Ceará               | 4.391                        | 42701               | 9,72  |
| Sergipe             | 901                          | 19417               | 21,55                                       |
| Espírito Santo      | 1.202                        | 14282               | 11,88                                       |
| Alagoas             | 1.309                        | 11495               | 8,78  |
| Paraíba             | 1.193                        | 8811                | 7,39  |
| Paraná              | 408                          | 6049                | 14,83                                       |
| Piauí               | 389                          | 3667                | 9,43  |
| Rio de Janeiro      | 170                          | 3101                | 18,24                                       |
| Mato Grosso         | 73                           | 1372                | 18,79                                       |
| Goiás               | 86                           | 1208                | 14,05                                       |
| Distrito Federal    | 72                           | 960                 | 13,33                                       |
| Rio Grande do Sul   | 127                          | 827                 | 6,51  |
| Tocantins           | 105                          | 780                 | 7,43  |
| Maranhão            | 100                          | 387                 | 3,87  |
| Pará                | 15                           | 203                 | 13,53                                       |
| Roraima             | 10                           | 200                 | 20,00                                       |
| Acre                | -                            | -                   | -   |
| Amapá               | -                            | -                   | -   |
| Amazonas            | -                            | -                   | -   |
| Mato Grosso do Sul  | -                            | -                   | -   |
| Rondônia            | -                            | -                   | -   |
| Santa Catarina      | -                            | -                   | -   |
| <b>Brasil</b>       | <b>67.328</b>                | <b>1414338</b>      | <b>21,01</b>                                |

Fonte: IBGE - Produção Agrícola, 2019.

### 2.3 AGROTÓXICOS

A legislação brasileira a partir da Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, estabelece que agrotóxicos sejam definidos como:

Produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; bem como, as substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989).

Avaliar como os agrotóxicos são definidos ajuda a compreender melhor quais as características desses produtos comercializados e utilizados no pré-tratamento, no tratamento intermediário e no pós-tratamento das produções. O *Codex Alimentarius* (2018), fórum internacional de normatização do comércio de alimentos, estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU) define agrotóxico como sendo uma substância utilizada com o intuito de prevenir, destruir, atrair ou controlar qualquer peste, controlando assim plantas e/ou animais (vertebrados e invertebrados) que possam afetar a produção agrícola. Portanto, são compostos que podem ser utilizados durante a etapa de produção, armazenamento, transporte, distribuição e processamento do alimento ou ração animal.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2019), define que agrotóxico é um produto ou/e um agente de processos físicos, químicos ou biológicos, que são utilizados para alterar a composição da flora ou da fauna, de modo a evitar a ação de outros seres vivos nocivos. As principais classes de agrotóxicos são: inseticidas (insetos), herbicidas (ervas daninhas), fungicidas (fungos), acaricidas (ácaros), moluscicidas (moluscos) e rodenticidas (roedores). Essa classificação é feita a partir das propriedades físico-químicas de cada composto, da estrutura molecular, do modo de ação etc.

O uso dos agrotóxicos para a produção agrícola brasileira tem se mostrado eficiente, uma vez que, estes contribuem para o controle de pragas (plantas ou animais) que atacam a planta em alguma etapa da produção. Porém, de acordo com estudos científicos o uso indiscriminado desses compostos pode afetar severamente a saúde humana e o meio ambiente, já que a maioria dessas substâncias apresenta uma alta toxicidade (PRESTES, 2012).

Com o propósito de promover a segurança do alimento, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) funciona como um sistema Nacional de vigilância sanitária, coordenado pela ANVISA e demais órgãos, que realiza análises anuais em amostras *in natura* para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em diversas matrizes alimentares (ANVISA, 2020).

### **2.3.1 Classificação e toxicidade**

A classificação quanto a toxicidade dos agrotóxicos também é monitorada pela ANVISA que antigamente definia que a toxicidade fosse dividida em quatro classes. Atualmente, o grau toxicológico dos agrotóxicos passou por uma reclassificação, passando para cinco classes e produto não classificado.

Ficou definido que as classes extremamente e altamente tóxicas sejam representadas pela cor vermelha. A classe medianamente tóxica é representada pela cor amarela e a cor azul representa as classes de pouca toxicidade e produto improvável de causar dano agudo. Já a classe seis se refere a produtos que não são classificados (ANVISA, 2019).



Figura 2 - Classificação dos agrotóxicos



Fonte: ANVISA, 2019

As informações a respeito da toxicidade dos agrotóxicos são importantes porque podem permitir ao consumidor o controle do uso desses compostos bem como garantir sua própria segurança, utilizando o equipamento de proteção individual adequado e fazendo o descarte correto das embalagens. Os consumidores também são aparados pela Lei nº 7.802 de 1989 que obriga os comerciantes a exibirem no rótulo dessas substâncias suas formulações e o risco que cada uma representa (BRASIL, 1989).

### 2.3.2 Controle e uso de agrotóxicos na manga

No decorrer do plantio da mangueira esta é atacada por pragas que provocam a diminuição da produtividade, e conseqüentemente gerando um valor econômico negativo. As pragas que mais causam prejuízo a esta cultura são as moscas-das-frutas (*Anastrepha sp.*, *Ceratitis capitata*. Díptera. Tephritidae), as cochonilhas (*Aulacaspis tubercularis*) e os ácaros (*Eriophyes mangiferae*, *Eriophyidae*). (ANVISA, 2009). Nessa perspectiva, o uso de agrotóxicos se torna

necessário, já que esses compostos ajudam a diminuir esses problemas (ANVISA, 2012).

O uso dos agrotóxicos na cultura da manga é inspecionado pela ANVISA, que atualmente permite o uso de 47 agrotóxicos. Na tabela 3 é possível acompanhar a classificação desses compostos e o limite máximo de resíduo (LMR) permitido para cada um (ANVISA, 2012). A classe agrônômica corresponde a finalidade do agrotóxico, ou seja, qual praga, seja ela um animal ou uma planta, o agrotóxico vai atacar. O LMR equivale a quantidade de resíduo que pode ser encontrada desse composto em matrizes alimentares.

Tabela 3 - Classificação dos agrotóxicos quanto à classe agrônômica e LMRs

(Continua)

| <b>Composto</b>   | <b>LMR (mg/kg)</b> | <b>Classe agrônômica</b> |
|-------------------|--------------------|--------------------------|
| Abamectina        | 0,01               | Acaricida, inseticida    |
| Acetamiprido      | 0,01               | Fungicida                |
| Alfa-cipermetrina | 0,7                | Inseticida               |
| Azoxistrobina     | 6                  | Fungicida                |
| Beta-cipermetrina | 0,7                | Inseticida               |
| Bifentrina        | 0,1                | Inseticida, formicida    |
| Boscalida         | 1                  | Fungicida                |
| Brometo de metila | 20                 | Inseticida, formicida    |
| Bromuconazol      | 0,05               | Fungicida                |
| Buprofenzina      | 0,3                | Inseticida, acaricida    |
| Cresoxim-metilico | 0,3                | Fungicida                |
| Deltrametrina     | 0,1                | Inseticida e formicida   |
| Difenoconazol     | 0,2                | Fungicida                |
| Espinetoram       | 0,07               | Inseticida               |
| Espinosade        | 0,01               | Inseticida               |
| Espiromesifeno    | 0,7                | Inseticida e acaricida   |
| Etefom            | 0,1                | RC*                      |
| Etofenproxi       | 0,3                | Inseticida               |
| Fenpiroximato     | 0,1                | Inseticida               |
| Fludioxonil       | 6                  | Fungicida                |
| Flupiradifurona   | 0,5                | Inseticida               |
| Flutriafol        | 0,5                | Fungicida                |
| Fluxaproxade      | 0,7                | Fungicida                |

(Conclusão)

| <b>Compostos</b>   | <b>LMR (mg/kg)</b> | <b>Classe agrônômica</b> |
|--------------------|--------------------|--------------------------|
| Formetanato        | 0,02               | Inseticida e acaricida   |
| Glifosato          | 0,1                | Herbicida                |
| Hexitiazoxi        | 0,1                | Acaricida                |
| Imazalil           | 1                  | Fungicida                |
| Imidacloprido      | 0,7                | Inseticida               |
| Indaziflam         | 0,01               | Herbicida                |
| Indoxacarbe        | 0,07               | Fungicida e cupinicida   |
| Lambda-cialotrina  | 0,1                | Inseticida               |
| Mancozebe          | 1                  | Fungicida e acaricida    |
| Mandipropamida     | 2                  | Fungicida sistêmico      |
| Metomil            | 0,01               | Inseticida e acaricida   |
| Paclobutrazol      | 0,02               | RC*                      |
| Picoxistrobina     | 0,7                | Fungicida                |
| Piriproxifem       | 0,05               | Inseticida               |
| Saflufenacil       | 0,03               | Herbicida                |
| Tebuconazol        | 0,1                | Fungicida                |
| Teflubenzurom      | 0,7                | Inseticida               |
| Tetraconazol       | 0,1                | Fungicida                |
| Tiabendazol        | 2                  | Fungicida                |
| Tiametoxam         | 0,05               | Inseticida               |
| Tiofanato-metílico | 2                  | Fungicida                |
| Trifloxistrobina   | 0,05               | Fungicida                |
| Triflumizol        | 0,1                | Fungicida                |

\*Regulador de crescimento

Fonte: ANVISA

No ciclo do Plano Plurianual de 2017 a 2020 o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) realizou a análise de diversas culturas, dentre elas, amostras de manga. O resultado dessas análises comprovou que 318 amostras de manga estavam dentro dos limites máximos de resíduos de agrotóxicos estabelecidos pela ANVISA, 216 não apresentaram resíduos dos agrotóxicos estudados e 102 apresentaram concentrações superiores à estabelecida pelo programa (PARA, 2020).

Ainda, segundo o PARA (2020), cerca de 31 amostras continham agrotóxicos que não são permitidos para essa cultura. Dentre os agrotóxicos não autorizados para manga, o glifosato, o ometoato e o acefato foram os mais

detectados. Em 32 amostras o LMR estava acima do permitido, sendo o formetanato o mais detectado.

## 2.4 DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

### 2.4.1 Técnicas cromatográficas para determinação multirresíduo de agrotóxicos

Atualmente, a principal técnica para a separação de multirresíduo de agrotóxicos é a cromatografia. De maneira simples a cromatografia consiste em uma técnica de duas fases que estão em contato. Uma das fases permanece estacionária (FE), enquanto a outra se desloca através dela, sendo está a fase móvel (FM). As principais técnicas cromatográficas são a cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*) e a cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*). A cromatografia em fase gasosa se baseia na análise de compostos que sejam voláteis ou semivoláteis (COLLINS *et al.*, 2006).

Como a maioria dos compostos não são voláteis ou semivoláteis, a cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*) se tornou a principal técnica para a análise de multirresíduo, já que o principal critério para ser analisado nessas condições é que os compostos interajam com a fase móvel. A LC também é conhecida por ser uma técnica de alta eficiência e seletividade. De acordo com HIGSON e colaboradores (2009) “a alta eficiência diz respeito a capacidade da LC de oferecer separações seletivas e, portanto, de alta qualidade, em um tempo mínimo”.

Está técnica pode ser de fase reversa, quando a fase estacionária é apolar ou fracamente polar em relação ao solvente da fase móvel ou de fase normal, quando a fase estacionária é polar em relação ao solvente da fase móvel que é menos polar (COLLINS *et al.*, 2006). A fase móvel (FM) desempenha um papel importante na cromatografia líquida porque a sua composição auxilia no processo de separação dos analitos.

A espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) é uma técnica analítica que permite a identificação e quantificação de uma variedade de compostos químicos, como nas análises de multirresíduo de agrotóxicos, por exemplo. De maneira simplificada, o princípio básico de um espectrômetro de

massas se divide em três partes principais: fonte de íons, analisador de massas e detector. Em suma é uma técnica que vai gerar os íons dos compostos orgânicos e inorgânicos em fase gasosa, de maneira que se realize a separação dos íons a partir da sua razão massa/carga ( $m/z$ ) e haja a detecção desses íons de forma quantitativa e/ou qualitativa.

No acoplamento da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*), com a espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*), a fonte de íons geralmente utilizada é uma fonte de eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray ionization*) ou uma fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure photoionization*) (LANÇAS, 2009).

A ionização por eletronebulização tem sido a fonte de ionização mais utilizada quando há o acoplamento dessas técnicas. De maneira geral, o analito passa por um tubo capilar metálico que está dentro da fonte de ionização e ao sair vai produzir um fino spray com as gotículas da amostra. Um potencial é aplicado entre a ponta do tubo capilar e um contra-eletrodo que está posicionado a milímetros de distância. Dessa maneira, as gotículas vão atravessar um campo elétrico e finalmente serão ionizadas (HIGSON; SILVA; SILVA, 2009).

A técnica de HPLC é muito empregada para a determinação de multirresíduo de agrotóxicos em matrizes alimentares, havendo uma maior adequabilidade para analitos que sejam polares e não voláteis ou termicamente instáveis (MALDANER; JARDIM, 2012). Quando se tem o acoplamento desta técnica com o espectrômetro de massas em série a seletividade do equipamento é melhorada, a separação dos compostos é mais eficiente e a detectabilidade é aumentada (OSHITA; JARDIM, 2015).

O espectrômetro de massas do tipo quadrupolo é formado pela união de três quadrupolos em sequência, entretanto, o segundo quadrupolo não faz a separação dos íons, mas atua como cela de colisão, de maneira que o íon sofra nova fragmentação por colisão com os íons do  $N_2$  e Ar. Os quadrupolos são controlados para que haja a transmissão de íons de uma única razão  $m/z$  ou de um intervalo de razões  $m/z$  afim de gerar informação analítica mais precisa (CHIARADIA et al., 2008).

Para que se tenha o espectro de massas em MS/MS, algumas técnicas de varredura são utilizadas, como a técnica de varredura completa (FS, do inglês *full scan*), a técnica de monitoramento dos íons selecionados (SIM, do inglês *selected ion monitoring*), a varredura de íon produto (do inglês *product ion scan*), a varredura de íon precursor e o monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*). Se na amostra há a presença de componentes que não são conhecidos, o tipo de varredura *full scan* é comumente utilizada, pois pode se realizar um *screening* em uma ampla faixa de m/z. Dessa maneira, o cromatograma nessas condições é conhecido como um cromatograma de íon total (TIC, do inglês *total ion chromatogram*) (STASHENKO; MARTINEZ, 2010; STACHNIUK; FORNAL, 2016).

O modo SIM é utilizado normalmente quando se tem apenas um quadrupolo, entretanto, pode ser utilizado também no sistema triplo quadrupolo. Se operado no modo SIM, a sensibilidade pode ser aumentada, uma vez que, pode-se escolher um único íon a ser monitorado ou vários íons característicos do analito alvo de interesse (STACHNIUK; FORNAL, 2016).

#### **2.4.2 Preparo de amostra para a determinação multirresíduo de agrotóxicos**

Métodos para a determinação de multirresíduo de agrotóxicos tem sido analisado e explorado afim de que se tenha um método cada vez mais preciso e eficaz. Um método satisfatório precisa determinar o maior número de compostos orgânicos de maneira simultânea e o método de Mills foi o primeiro a ser desenvolvido com este objetivo. A extração era feita com acetonitrila e éter de petróleo, sendo um método mais eficiente para a determinação de organoclorados em amostras não gordurosas (ZANELLA *et al.* 2015). O método de Storherr surgiu como uma adaptação do método de Mills e a acetonitrila se manteve como solvente de extração, porém, o éter de petróleo foi substituído pelo diclorometano.

Com o aumento de novas classes de agrotóxicos, principalmente os mais polares, em 1975 o método de Luke foi desenvolvido. Consistia em uma extração de 100 g de amostra com 200 mL de acetona, seguido de uma adição de éter de petróleo e diclorometano afim de promover a partição dos solventes.

Contudo estes métodos ainda apresentavam algumas desvantagens, como a elevada quantidade de amostra, várias etapas analíticas, aumento do tempo de execução, alto consumo de reagentes etc. Em virtude disso e da pressão por mais sustentáveis, Anastassiades e colaboradores, em 2003, otimizou um novo método de preparo de amostra, no qual denominou-se QuEChERS (do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged, safe*).

Figura 3 - Linha do tempo dos métodos multirresíduo



Fonte: autoria própria

O método se mostrou tão eficiente que com o passar dos anos foi ganhando melhorias que variam conforme a matriz, obtendo assim resultados cada vez mais satisfatórios. Na literatura é possível encontrar técnicas utilizadas para o preparo de amostra referente a extração de resíduo de agrotóxicos em manga, conforme a tabela 4.

Tabela 4 - Preparo de amostras empregando o método QuEChERS para extração de agrotóxicos em diferentes matrizes

| MATRIZ                                 | ANALITOS | EQUIPAMENTO   | MÉTODO DE EXTRAÇÃO  | LOQ                            | Referência                       |
|--|----------|---|---|--------------------------------|----------------------------------|
| Sucos de uva e manga                   | 5        | Cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massa de alta resolução (UPLC-HRMS) | Extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) usando nano tubos de carbono com paredes múltiplas (MWCNTs). | 0,1–0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$   | PRAGNEY <i>et al.</i> (2014)     |
| Banana, manga, melão, mamão e abacaxi. | 5        | Cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons (GC-ECD)   | Dispersão em fase sólida da matriz (MSPD)   | 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$       | SILVIA <i>et al.</i> (2018)      |
| Manga e Goiaba                         | 8        | Cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (ECD) e detecção termiônica (FTD)                     | QuEChERS original   | 0,01 $\text{mg kg}^{-1}$       | MOHAMMAD <i>et al.</i> (2020)    |
| Mangas verdes e maduras                | 113      | GC-MS/MS e UHPLC-MS/MS  | QuEChERS modificado   | 1-10 $\mu\text{g kg}^{-1}$     | PINGPING <i>et al.</i> (2018)    |
| Manga                                  | 68       | UHPLC acoplada com quadrupolo-tempo de voo espectrometria de massa (UHPLC-Q-TOF/MS).                            | Extração líquido-líquido  | 2 a 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$   | SIVAPERUMAL <i>et al.</i> (2017) |
| Manga                                  | 7        | Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)  | QuEChERS citrato  | 0,008–0,03 $\text{mg kg}^{-1}$ | MARTINS <i>et al.</i> (2018)     |
| Maçã, manga, tomate, pepino e morango  | 41       | GC/MS-MS  | QuEChERS modificado   |                                | LACHTERA <i>et al.</i> (2020)    |

Fonte: autoria própria



A Tabela 4 apresenta a utilização do método QuEChERS para a determinação de diferentes tipos de frutas, sucos e etc. Por exemplo, Martins e colaboradores (2018) utilizaram o método QuEChERS citrato para a extração de 7 agrotóxicos na matriz manga. Já LACHTERA (2020) utilizou o método QuEChERS modificado para a determinação de 41 agrotóxicos em matrizes diferentes (maçã, manga, tomate, pepino e morango).

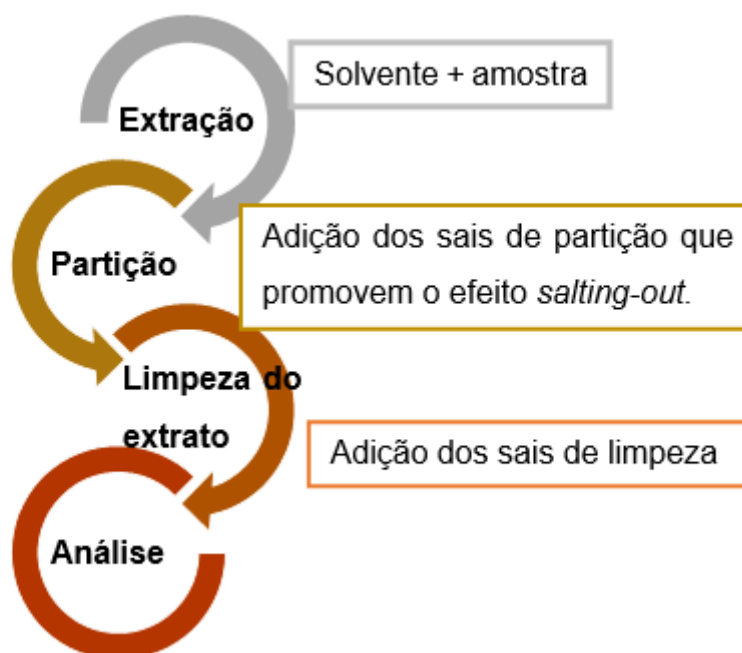
Sem dúvidas as inúmeras aplicações do método QuEChERS devem estar atribuídas ao fato deste método apresentar vantagens se comparado com demais métodos tradicionais de extração. Uma das vantagens é o elevado percentual de recuperação, resultados mais precisos, método mais rápido, etc (BARBIERI et al., 2019). De acordo com BUAH-KWOFIE e HUMPHRIES (2019), a combinação deste método de preparo de amostra com outras técnicas cromatográficas pode gerar resultados ainda mais satisfatórios.

#### 2.4.2.1 QuEChERS

O desenvolvimento de métodos analíticos que sejam mais eficientes, precisos e baratos é um desafio para os químicos analíticos e alinhado a isso aumentou-se também a preocupação com questões ambientais, uma vez que, existem métodos que fazem o uso de materiais e solventes que são agressivos a esse meio. Nessa perspectiva, muitos métodos foram elaborados e se tornaram promissores, como o método QuEChERS.

O método QuEChERS original sugerido por Anastassiades e colaboradores (2003), baseia-se em três principais etapas: **extração**, utilizando como solvente extrator a acetonitrila, **partição** gerada pela adição de sais (*salting out*) e **limpeza do extrato** que ocorre através de uma técnica conhecida como Fase Sólida Dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid phase extraction*). A figura 4 representa de maneira simplificada as principais etapas deste processo.

Figura 4 - Principais etapas do método QuEChERS



Fonte: autoria própria

O uso da acetonitrila como solvente extrator promoveu uma extração com menos interferentes da matriz, como as ceras, as gorduras ou os pigmentos. Além disso, a chance de ter uma extração com uma grande faixa de analitos de diferentes polaridades é maior.

O *salting out* promovido pela adição de sais, pode ser utilizado em uma variedade de métodos para multirresíduo. Na etapa de extração o *salting out* ocorre quando um solvente miscível em água, como a acetonitrila, e a adição de um sal são adicionados a matriz. A concentração salina começa a aumentar e consequentemente a solubilidade das moléculas presentes no solvente aquoso vão diminuir, levando a formação de um sistema bifásico, conhecido como separação de fases induzidas por sal. A partir desse sistema, os analitos vão começar a migrar da fase aquosa em direção a fase orgânica.

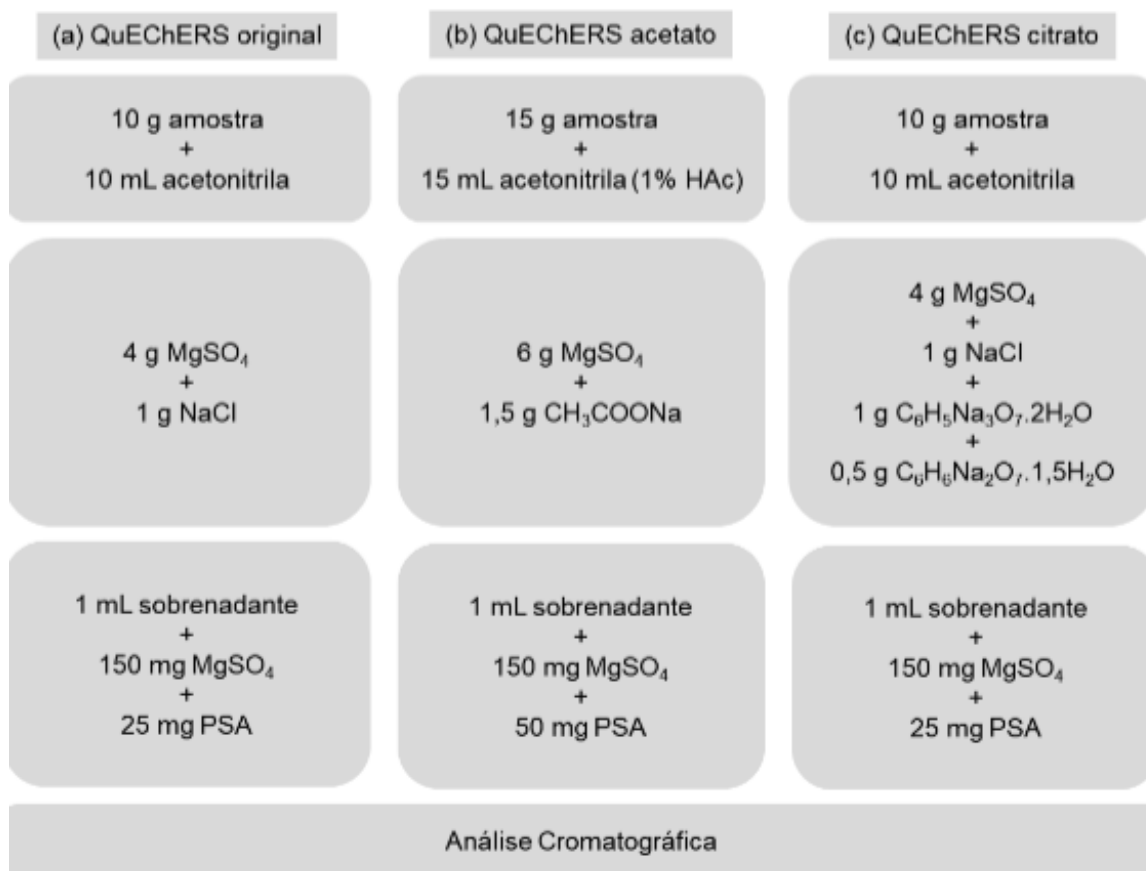
A adição de sais secantes ao processo ocorreu porque estes conseguem melhorar a recuperação dos analitos. O sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) foi escolhido durante o desenvolvimento do método QuEChERS porque ele conseguia remover a água com mais facilidade. O primeiro método QuEChERS ficou conhecido como original, e apesar de apresentar resultados satisfatórios alguns estudos mostraram que ele não era capaz de recuperar alguns compostos na condição proposta (BORGES *et al.*, 2015).

Em 2005, Lehotay e colaboradores otimizou o método, adicionando a ele uma etapa de tamponamento. O método ficou conhecido como QuEChERS acetato, utilizando a acetonitrila acidificada com 1% (v/v) de ácido acético como solvente de extração e o acetato de sódio na etapa de partição, capaz de promover o tamponamento. O método foi tão promissor, que em 2007 ficou reconhecido como método oficial da Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para a determinação de multirresíduo de agrotóxicos em alimentos (BORGES *et al*, 2015).

Somando a isso, Anastassiades e colaboradores (2007) propôs outro método, que ficou conhecido como QuEChERS citrato. Diferente dos outros métodos, que tinham somente dois sais na etapa de partição, este possui quatro sais: citrato de sódio di-hidratado ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ), hidrogenocitrato sesqui-hidratado ( $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1,5H_2O$ ), sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) e cloreto de sódio (NaCl). Os sais citrato de sódio di-hidratado e hidrogenocitrato sesqui-hidratado são os responsáveis pelo efeito tamponante (pH 5,0-5,5).

Seguindo as etapas do processo, a limpeza do extrato se mostrou eficiente, uma vez que, promove a robustez e confiabilidade dos resultados, visto que, componentes da matriz que sejam voláteis não vão ficar aderidos ao sistema de injeção e também na coluna. A técnica d-SPE proposta por Anastassiades e colaboradores (2003) utiliza sorventes capazes de remover interferentes que vão afetar o resultado analítico. Os principais sorventes utilizados são: o PSA, capaz de remover açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos e pigmento; o C18 remove lipídios e coextrativos apolares e o GCB remove pigmentos, esteróis e coextrativos apolares. A figura 5 demonstra de maneira comparativa os métodos QuEChERS encontrados na literatura.

Figura 5 - Representação das principais versões do método QuEChERS (a) original, (b) acetato e (c) citrato



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

## 2.5 VALIDAÇÃO

Segundo LANÇAS (2004) validação é

O ato ou efeito de validar, de dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal. Visa diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado.

O INMETRO (2016) defini validação como um método que precisa atender as necessidades de uma determinada aplicação ou área de aplicação. Dessa forma é dever do laboratório informar quais foram os resultados obtidos a partir do procedimento utilizado para a validação e emitir uma declaração se o método é ou não pertinente.

Para que a validação seja eficiente e confirme que o método é apropriado para o uso pretendido, alguns parâmetros precisam ser atendidos, conforme podemos observar na tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros para Validação do Método

| <b>Parâmetros<sup>1</sup></b> | <b>Definição</b>   |
|-------------------------------|--|
| Exatidão                      | Indica o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro.  |
| Precisão                      | É a concordância entre vários resultados que foram obtidos da mesma forma.   |
| Limite de detecção            | O limite de detecção corresponde a menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada com um valor exato.  |
| Limite de quantificação       | O limite de quantificação corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e uma fidelidade determinada.  |
| Seletividade                  | A seletividade corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis ne interferirem na determinação.                       |
| Efeito matriz                 | Aumento ou diminuição na resposta do detector na presença do analito do extrato da matriz em relação ao solvente.  |
| Faixa Linear                  | Capacidade de uma técnica analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo especificado como curva analítica. |

Como citado anteriormente a validação de um método analítico é importante porque garante que outros analistas possam repetir este mesmo método sem sofrer nenhuma ou parcialmente alguma alteração. Os parâmetros avaliados vão garantir essa resposta e tornar o método mais confiável.

<sup>1</sup> INMETRO (2017), SANTÉ (2015)

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho abordou o desenvolvimento e a validação de um método de preparo de amostra empregando o método QuEChERS para a extração multirresíduo de agrotóxicos em amostras de manga e quantificação por UHPLC-MS/MS. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

#### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO

- Agitador multiturbo vórtex, modelo Fisher Scientific;
- Agitador vortex, modelo VX 38;
- Centrífuga refrigerada, modelo NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- Centrífuga modelo 80-2B (Centribio, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha)
- Sistema de purificação de água, Mili-Q Direct UV3R (Millipore, Bedford, MA, EUA);
- Processador de alimentos;
- Sistema UHPLC-MS/MS Waters, modelo XEVO TQ (EUA) contendo espectrômetro de massas triplo quadrupolo e amostrador automático sample manager (Acquity), coluna analítica ACQUITY UPLC BEH C18 (50x2,1 mm; 1,7  $\mu\text{m}$ ) -e sistema de aquisição de dados Mass Lynx v 4.1 (Waters, EUA);
- Compressor de ar Atlas Copco, modelo SF2FF (Bélgica);
- Sistema gerador de nitrogênio Peak, modelo NM30L-MS (Reino Unido);
- Gás argônio 6.0 (White Martins, Brasil) usado como gás de colisão no sistema UHPLC-MS/MS;

#### 3.2 REAGENTES, SOLVETENTES E DEMAIS MATERIAIS UTILIZADOS

- Acetonitrila grau UHPLC;
- Acetona grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- Hexano (95% n-hexano) (J.T. Baker, EUA);
- Ácido acético glacial 100% (J. T. Baker, EUA);
- Água ultrapura, purificada em sistema Mili-Q Direct UV3R (resistividade de 18,2  $\text{M}\Omega\text{ cm}$ );

- Sulfato de magnésio anidro p.a. (J.T. Baker, Japão);
- Cloreto de sódio p.a. (Sigma Aldrich, EUA);
- Acetato de Sódio (J.T, Barker, EUA);
- Citrato de sódio diidratado (Sigma Aldrich, EUA);
- Hidrogenocitrato de sódio sesquidratado (Sigma Aldrich, EUA);
- Sorvente Bondesil C18 com diâmetro de partícula (d.p) de 40 µm (Agilent, EUA);
- Sorvente Bondesil PSA com d.p de 40 µm (Agilent, EUA);
- Amino com d.p 45 µm (Sigma Aldrich, EUA);
- Alumina neutra 100-125 mesh (Sigma Aldrich, EUA);
- Sílica com d.p 50 µm (Sigma Aldrich, EUA);
- Quitosana (obtida e caracterizada no Laboratório de operações Unitárias da Escola de Química e Alimentos da FURG, a partir de camarão rosa *Farfantepenaeus brasilliensis*) com d.p de 62-76 µm (Rio Grande, Brasil);
- Florisil 60-120 mesh (J.T Baker, EUA);
- Oasis HLB 60mg/3mL, d.p 30 µm (Waters, EUA);
- Strata™-X 500 mg/6mL, d.p 33 µm (Phenomenex, EUA);
- Fase fluorada, d.p 35-70 µm, diâmetro de poro 60 nm, 9% de carbono (Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas /SP – Brasil);
- Filtros de nylon de 13 mm e porosidade de 0,2 µm (Agilent, EUA);
- Tubos de polipropileno, com tampas de rosca com capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- Microtubo, tipo Eppendorff, capacidade de 2 mL (Axygen Scientific, EUA);
- Frascos de vidro (vial) com capacidade de 2 mL (Agilent, EUA);
- Extran neutro e alcalino (Merck, Brasil);
- Padrões sólidos dos compostos em estudo (LGC standards, Alemanha);
- Vidraria comum de laboratório.

### 3.3 AMOSTRAS

A amostra “branco”, utilizada para o desenvolvimento do método e para as curvas analíticas em matriz branco, foi produzida sem a utilização dos agrotóxicos em estudo. As mangas foram processadas e armazenadas no freezer a uma temperatura de aproximadamente -20 °C. Na etapa do processamento as amostras

foram homogeneizadas em mixer e acondicionadas em frascos de plástico. Para a realização dos ensaios as amostras foram deixadas na bancada até atingir a temperatura ambiente.

O método desenvolvido foi aplicado em 16 amostras de manga adquiridas no comércio de diferentes municípios e regiões do Estado do Rio Grande do Sul.

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

O padrão interno (PI) e o padrão de controle (PC) são adicionados na amostra em etapas diferentes e também são avaliados de maneira diferente e individual. A adição desses padrões garante uma análise com mais segurança e resultados mais confiáveis, verificando possíveis fontes de erro.

O padrão de controle é adicionado em cada amostra no início da extração, avaliando a própria extração e a limpeza do extrato. O volume a ser adicionado pode variar conforme a concentração desejada. Já o padrão interno é adicionado somente no final do procedimento para avaliar a análise. Ambos os padrões emitem um sinal analítico que pode ser acompanhado no sistema cromatográfico.

O trifenilfosfato (TPP, do inglês *triphenylphosphate*) foi o padrão interno adicionado. A solução foi preparada em acetonitrila, em uma concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>. A atrazina deuterada d-5 foi o padrão de controle adicionado. A solução deste também foi preparada em acetonitrila, em uma concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>.

### 3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS DOS ANALITOS SELECIONADOS

Alguns agrotóxicos avaliados são de uso autorizado pela ANVISA para a cultura da manga, outros foram selecionados a partir do resultado das análises do ciclo Plurianual de 2017-2020 do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da ANVISA e compostos permitidos pela União Europeia para a cultura da manga. Estes podem ser consultados na tabela 6.



Tabela 6 - Relação dos compostos em estudo, com informações de classe agrônômica, grupo químico e massa molar

(Continua)

| <b>Compostos</b>    | <b>Grupo Químico</b>            | <b>Classe agrônômica</b>                      |
|---------------------|---------------------------------|---|
| Acefato             | Organofosforado                 | Inseticida                                    |
| Acetaprimido        | Neonicotinóide                  | Inseticida                                    |
| Ametrina            | Triazina                        | Herbicida                                     |
| Atrazina            | Triazina                        | Herbicida                                     |
| Azinfós metílico    | Organofosforado                 | Inseticida                                    |
| Azoxistrobia        | Estrobilurina                   | Fugicida                                      |
| Biteranol           | Triazol                         | Fungicida                                     |
| Bromuconazol        | Triazol                         | Fungicida                                     |
| Carbaril            | Metilcarbamato de naftila       | Inseticida                                    |
| Carbendazim         | Benzimidazol                    | Fungicida                                     |
| Carbofurano-3-OH    | Carbamato                       | Inseticida                                    |
| Carbofurano         | Metilcarbamato de benzofuranila | Inseticida, cupinícida, acaricidae nematocida |
| Carboxim            | Oxatina                         | Fungicida                                     |
| Cianazina           | Triazina                        | Herbicida                                     |
| Clomazona           | Isoxazolidinona                 | Herbicida                                     |
| Clorprofam          | Carbamato                       | Herbicida                                     |
| Dimetoato           | Organofosforado                 | Inseticida e acaricida                        |
| Diazinona           | Organofosforado                 | Herbicida, inseticida                         |
| Diuron              | Uréia                           | Herbicida, inseticidae e acaricida            |
| Epoxiconazol        | Triazol                         | Fungicida                                     |
| Fempropimorfe       | Morfolina                       | Fungicida                                     |
| Fenarimol           | Pirimidinil carbinol            | Fungicida                                     |
| Fluquinconazol      | Triazol                         | Fungicida                                     |
| Flutolanil          | Carboxamida                     | Fungicida                                     |
| Flutriafol          | Triazol                         | Fungicida                                     |
| Fenamifós           | Organofosforado                 | Nematocida                                    |
| Fostiazato          | Organofosforado                 | Inseticida e nematocida                       |
| Fluxapiraxade       | Carboxamida                     | fungicida                                     |
| Imazalil            | Imidazol                        | Fungicida                                     |
| Imidacloprido       | Neotinotínóide                  | Inseticida                                    |
| Iprovalicarbe       | Carbamato                       | Fungicida                                     |
| Linurom             | Uréia                           | Herbicida                                     |
| Melationa           | Organofosforado                 | Acaricida e inseticida                        |
| Mecarbam            | Organofosforado                 | Acaricida e inseticida                        |
| Mepronil            | Carboxamida                     | Fungicida                                     |
| Metalaxil           | Acilalaninato                   | Acaricida, fungicida e inseticida             |
| Metconazol          | Itraconazol                     | Acaricida e inseticida                        |
| Metsulfurommetílico | Sulolinuréia                    | herbicida                                     |
| Monocrotofós        | Organofosforado                 | Inseticida                                    |
| Monolinurom         | Uréia                           | Herbicida                                     |
| Oxamil              | Carbamato                       | Acaricida, inseticida e nematocida            |

(conclusão)

| <b>Compostos</b>   | <b>Grupo Químico</b>     | <b>Classe agrônômica</b>                      |
|--------------------|--------------------------|---|
| Ometoato           | Organofosforado          | Inseticida                                    |
| Piridafentiona     | Organofosforado          | Acaricida e Inseticida                        |
| Pirimetanil        | Anilinopirimidina        | Fungicida                                     |
| Pirimicarbe        | Dimetilcarbamato         | Inseticida                                    |
| Piroproxifeno      | Éter piridiloxipropílico | Inseticida                                    |
| Propiconazol       | Triazol                  | Fungicida                                     |
| Propizamida        | Amidas                   | Herbicida                                     |
| Propoxur           | Carbamato                | Inseticida                                    |
| Simazina           | Triazina                 | Herbicida                                     |
| Tebuconazol        | Triazol                  | Fungicida                                     |
| Terbutilazina      | Triazina                 | Herbicida                                     |
| Tetraconazol       | Triazol                  | Fungicida                                     |
| Tiacloprido        | Neonicotinóide           | Inseticida                                    |
| Tiametoxam         | Neonicotinóide           | Inseticida                                    |
| Tiodicarbe         | Metilcarbamato de oxima  | Inseticida                                    |
| Tiofanato metílico | Benzimidazol             | Fungicida                                     |
| Triadimienol       | Triazol                  | Fungicida, inseticida, acaricida e nematocida |
| Triazofós          | Organofosforado          | Fungicida                                     |
| Vamitidiona        | Organofosforado          | Inseticida                                    |

Fonte: arquivo pessoal

Foram preparadas 10 mL de solução estoque individual em acetonitrila para cada composto, com uma concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup>. Para cada solução é realizado um cálculo que leva em consideração a pureza do composto, identificando em gramas a quantidade de padrão sólido comercial que será necessário. Por fim, a solução estoque individual de cada composto é armazenada em frascos âmbar a uma temperatura de -10 °C. A partir das soluções estoque preparou-se duas misturas na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>, contendo um total de 60 analitos.

### 3.6 SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM MANGA

#### 3.6.1 Escolha da fase móvel

A escolha da fase móvel é importante porque sua composição influencia de maneira direta a separação dos compostos. Dessa maneira, afim de melhorar a otimização dos compostos analisados neste trabalho, através dos sistemas

UHPLC-MS/MS, utilizou-se duas substâncias para o preparo da fase móvel, tanto aquosa quanto orgânica, sendo eles ácido fórmico e o formiato de amônio. O resultado então consistiu em: A) solução aquosa 2% metanol (v/v), com ácido fórmico (v/v) e formiato de amônio 5 mmol L<sup>-1</sup> e B) metanol com ácido fórmico 0,1% (v/v) e formiato de amônio 5 mmol L<sup>-1</sup>, conforme gradiente descrito na tabela 7. O tempo total de corrida foi de 10 min.

Tabela 7 - Gradiente da fase móvel utilizado para a determinação de agrotóxicos em manga no sistema UHPLC-MS/MS

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

Vazão constante de 0,225 mL min<sup>-1</sup>

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

As condições do sistema MS/MS são essenciais para um bom resultado na análise das massas dos íons precursores. Em uma análise de multirresíduo, por exemplo, diferentes condições são necessárias de acordo com a classe química dos compostos. A seguir são descritas as condições gerais utilizadas para o desenvolvimento do método e análise de agrotóxicos em amostras de manga, otimizadas previamente no LARP-UFSM.

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

Os íons característicos dos compostos estudados foram monitorados no quadrupolo 1 (Q1) e no quadrupolo 3 (Q3) houve a varredura do íon produto, variando as energias de colisão, de maneira a melhorar as condições de detecção. As transições foram avaliadas no modo SRM, sendo a transição de quantificação a de maior intensidade e a de confirmação.

### 3.7 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS PARA O PREPARO DE AMOSTRA VISANDO A DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM MANGA

#### 3.7.1 Etapa de extração/partição

O método QuEChERS foi o método escolhido como preparo de amostra para a determinação de multirresíduo de agrotóxicos em manga. Na literatura é possível encontrar 3 métodos QuEChERS, o método QuEChERS original (ANASTASSIADES *et al.*, 2003), o método QuEChERS acetato (LEHOTAY *et al.*, 2005) e o método QuEChERS citrato (ANASTASSIADES *et al.*, 2007).

Na tabela 8 é possível acompanhar o primeiro ensaio realizado, que tinha como objetivo avaliar qual das três variações do método QuEChERS seria mais eficiente. É possível observar que neste primeiro momento é avaliado de maneira geral o solvente de extração, mas principalmente os sais de partição utilizado em cada QuEChERS. Os três métodos QuEChERS foram avaliados com o sorvente PSA e MgSO<sub>4</sub>, que é utilizado para a remoção de água residual.

Tabela 8 - Método QuEChERS (a) original, (b) acetato e (c) citrato

| Etapa                     | (a) QuEChERS original   | (b) QuEChERS acetato  | (c) QuEChERS citrato   |
|---------------------------|---|---|--|
| Quantidade de amostra (g) | 10  | 15  | 10   |
| Extração                  | 10 mL acetonitrila  | 15 mL acetonitrila<br>1% ácido acético                                  | 10 mL acetonitrila   |
| Homogeneização            | Agitação 1 min<br>(vórtex)  | Agitação 1 min<br>(vórtex)  | Agitação 1 min<br>(vórtex)   |
| Sais de Partição          | 4 g MgSO <sub>4</sub> + 1 g NaCl  | 6 g MgSO <sub>4</sub> + 1,5 g<br>CH <sub>3</sub> COONa                  | 4 g MgSO <sub>4</sub> , 1 g<br>NaCl<br>1g C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O<br>0,5 g<br>C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .1,5H <sub>2</sub> O |
| Centrifugação 1           | Agitação 1 min<br>(vórtex) +<br>centrifugação 3400<br>rpm/ 8 min/ 20 °C | Agitação 1 min<br>(vórtex) +<br>centrifugação 3400<br>rpm/ 8 min/ 20 °C | Agitação 1 min<br>(vórtex) +<br>centrifugação 3400<br>rpm/ 8 min/ 20 °C  |
| Limpeza do extrato        | 1 mL sobrenadante<br>+ 150 mg MgSO <sub>4</sub><br>+ 25 mg PSA          | 1 ml sobrenadante<br>+ 150 mg MgSO <sub>4</sub><br>+ 50 mg PSA          | 1 mL sobrenadante<br>+ 150 mg MgSO <sub>4</sub><br>+ 25 mg PSA   |
| Centrifugação 2           | Agitação 1 min<br>(vórtex) +<br>centrifugação 3500<br>rpm/ 8 min/ 20 °C | Agitação 1 min<br>(vórtex) +<br>centrifugação 3500<br>rpm/ 8 min/ 20 °C | Agitação 1 min<br>(vórtex) +<br>centrifugação 3500<br>rpm/ 8 min/ 20 °C  |

Fonte: adaptado do livro BORGES, FIGUEIREDO; QUEIROZ (Org).

### 3.7.2 Modificações na etapa de limpeza do método QuEChERS

Após a etapa de partição é realizado uma etapa de limpeza do extrato (do inglês, *clean-up*). Os sorventes mais utilizados hoje em dia é a amina primária secundária (PSA, do inglês *primary secondary amine*), comumente utilizado na remoção de açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos e pigmentos; o octadecilsilano, mais conhecido como C18, que se mostrou eficiente para a remoção de lipídios e coextrativos apolares, e o carvão grafitizado (GCB, do inglês *graphitized carbono black*), usado principalmente para a remoção de pigmentos, esteróis e coextrativos apolares (BORGES *et al.*, 2015).

A escolha do sorvente ideal influência de maneira significativa nos resultados dos testes, pois sua principal característica é a remoção de interferentes que possam afetar o sinal analítico.

Portanto, o segundo ensaio foi uma avaliação visual da limpeza realizada pelos sorventes, a partir da mudança de coloração dos extratos quando em contato com esses compostos. Foram avaliados 17 sorventes, sendo eles: carvão ativado, Strata™-X, Oasis HLB, GCB, PSA, C18, PSA+C18, Z-Sep+, Terra diatomácea, Florisil, Quitosana, Sílica, Alumina, Alumina desativada com 12% de H<sub>2</sub>O, amino, Fase fluorada e Terra diatomácea 521.

### 3.7.3 Planejamento fatorial 3<sup>2</sup>

Após a escolha do método QuEChERS e do sorvente, foi realizado um planejamento fatorial de duas variáveis e três níveis. A tabela 9 demonstra quanto foi pesado de sulfato de magnésio e sorvente em cada ensaio. O planejamento fatorial ajuda a identificar as variáveis que vão apresentar melhor influência nos efeitos da resposta.

Tabela 9 - Planejamento fatorial entre o sulfato de magnésio e o sorvente

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

Fonte: autoria própria

De acordo com CUNICO e colaboradores (2008), o planejamento fatorial nada mais é do que uma maneira de avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número menor de ensaios experimentais.

### 3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS PARA A DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM MANGA

Depois de definir quais condições cromatográficas são mais favoráveis para a determinação, quantificação dos compostos e a otimização do método QuEChERS original, realizou-se a validação deste método, a partir dos seguintes parâmetros: seletividade, curva analítica e faixa de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão (recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e efeito matriz.

#### 3.8.1 Seletividade

De acordo com SANTÉ (2015) a seletividade é importante porque é a partir dela que se tem a confirmação de que nenhum dos analitos de interesse foram eluidos juntos com algum componente ou interferente da matriz. A seletividade também pode ser definida como um método capaz de quantificar o analito na presença de outros analitos ou interferentes (AOAC, 2002).

A seletividade foi avaliada a partir da comparação de injeção de um extrato de matriz branco com um extrato de matriz branco fortificado com a solução e injetados no sistema UHPLC-MS/MS.

#### 3.8.2 Curva analítica e faixa de trabalho

Para a realização da curva analítica é recomendado que se faça níveis de concentração, distribuídos na faixa de trabalho e o número de replicatas é no mínimo três (Thompson, 2002).

A curva analítica foi avaliada a partir da injeção de soluções preparadas com concentrações finais para injeção no sistema UHPLC-MS/MS: 0,5; 1; 2; 5; 10 e 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ , que correspondem as concentrações na matriz: 2,5; 5; 10; 25; 50 e 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (diluição de cinco vezes antes da injeção). A curva analítica foi preparada inicialmente em solvente (acetonitrila) e posteriormente na matriz (branco de manga). Ambas as curvas foram feitas em triplicatas e injetadas, conforme exigência do INMETRO (2017), a partir da seguinte equação.

$$y = ax + b \text{ (Equação 1)}$$

Onde,

x= concentração.

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

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

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

### 3.8.3 LOD e LOQ do instrumento e do método

De acordo com RIBANI e colaboradores (2004), o limite de quantificação (LOQ) está atrelado a concentração do analito que produz uma relação sinal ruído maior que 10, isto é,  $LOQ = 10S/R$ .

Tanto os valores de  $LOQ_m$  quanto de  $LOD_m$  foram expressos em  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . O  $LOQ_m$  foi adotado como o menor nível de fortificação que apresentou recuperações entre 70 e 120%, com  $RSD \leq 20\%$ . O  $LOD_m$  foi determinado através do  $LOQ_m$  dividido por 3,33 (INMETRO, 2017; SANTÉ, 2015).

### 3.8.4 Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão

O INMETRO (2017) determina que a recuperação dos analitos possa ser avaliada através de amostras fortificadas com quantidades conhecidas em três níveis de fortificação, sendo um nível baixo, outro intermediário e outro alto. Normalmente, a recuperação é expressa em porcentagem da quantidade obtida do analito em relação a quantidade do mix que foi adicionado à matriz (RIBANI *et al.*, 2004).

O procedimento realizado para a determinação da exatidão ocorreu por meio de ensaios de fortificação no qual foi utilizado uma amostra branco da matriz manga. Os níveis avaliados foram: 5, 10, 25 e  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ , com cinco replicatas para cada nível de fortificação. SANTÉ (2015) e INMETRO (2017) destacam que para o cálculo de recuperação é necessário fazer o uso da seguinte equação:

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

Onde:



C1= Concentração determinada na amostra fortificada;

C2= Concentração determinada na amostra não fortificada;

C3= Concentração usada para fortificação.

### 3.8.5 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

De acordo com o INMETRO (2017) e SANTÉ (2015) a precisão deve ser calculada a partir da seguinte equação:

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

Onde:

s= estimativa de desvio padrão absoluto;

$$s = \{\sum(vi-me)^2/n-1\}^{1/2}$$

xi= valores individuais;

X= média das medidas em replicatas;

N= número de medidas.

A precisão do método foi avaliada em termos de repetitividade (RSDr) a partir da extração de amostras fortificadas, realizadas em replicatas (n=5) para cada nível de concentração. Já a precisão intermediária (RSDpi) foi avaliada a partir do procedimento analítico realizado em dias diferentes, com a injeção da curva analítica e das amostras fortificadas nos níveis 5, 10, 25 e 50 µg kg<sup>-1</sup>.

### 3.8.6 Efeito matriz

Segundo GONZÁLEZ e colaboradores (2017) o efeito matriz é atribuído a muitas causas, entretanto, em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas pode normalmente ser observado a partir do enriquecimento/supressão do sinal do íon (SANTÉ, 2015), determina que essa variante pode ser calculada a partir da seguinte equação:

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

Onde:

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

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

### 3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS

Foram adquiridas 16 amostras de manga em supermercados de Santa Maria e de outros municípios da região conforme a tabela 10. O método validado foi aplicado para a determinação de multirresíduo de agrotóxicos em amostras comerciais de manga.

Tabela 10 - Identificação das amostras adquiridas em diferentes municípios do Estado do Rio Grande do Sul (RS)

| <b>Amostras</b> | <b>Municípios do RS</b> |
|-----------------|-------------------------|
| <b>A1</b>       | Santa Maria             |
| <b>A2</b>       | Santa Maria             |
| <b>A3</b>       | Santa Maria             |
| <b>A4</b>       | Santa Maria             |
| <b>A5</b>       | Santa Maria             |
| <b>A6</b>       | Santa Maria             |
| <b>A7</b>       | Santa Maria             |
| <b>A8</b>       | Cruz Alta               |
| <b>A9</b>       | Cruz Alta               |
| <b>A10</b>      | Santo Ângelo            |
| <b>A11</b>      | Cruz Alta               |
| <b>A12</b>      | Panambi                 |
| <b>A13</b>      | Cruz Alta               |
| <b>A14</b>      | São Borja               |
| <b>A15</b>      | Alegrete                |
| <b>A16</b>      | Pejuçara                |

Fonte: autoria própria

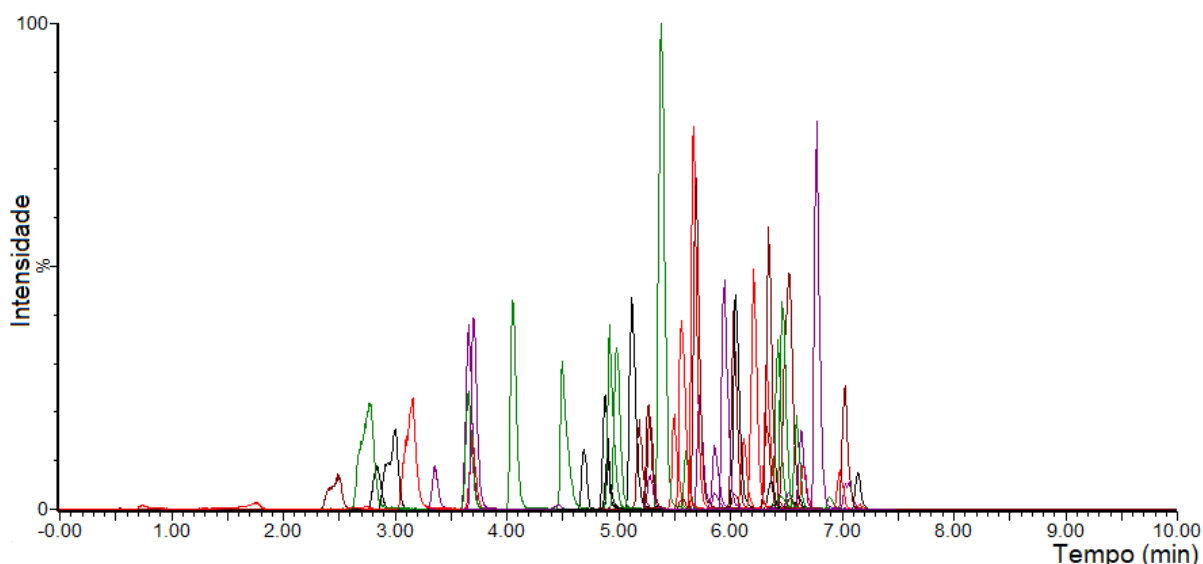
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM MANGA

O sistema UHPLC-MS/MS proporcionou uma boa seletividade, bem como uma boa separação dos compostos. Dessa forma, os agrotóxicos foram analisados em um tempo total de aquisição de 10 min. A tabela 11 apresenta os compostos analisados.

A figura 6 representa o cromatograma obtido por UHPLC-MS/MS no modo de aquisição SRM. O cromatograma é representado pelos íons totais de uma solução analítica, com concentração de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  preparada no solvente (acetonitrila). A tabela 11 apresenta todos os analitos que foram avaliados por UHPLC/MS/MS, no modo de aquisição SRM e no modo de ionização  $\text{ESI}^+$ , o tempo de retenção de cada composto, os íons precursores, os íons selecionados para as etapas de quantificação e identificação dos analitos em estudo, bem como suas respectivas energias de colisão (EC).

Figura 6 - Cromatogramas de íons totais obtidos por UHPLC-MS/MS a partir de uma solução analítica de concentração  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ , preparada no solvente de extração



Fonte: autoria própria

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

(continua)

| Agrotóxicos          | tR (min) | VC (V) | Íons precursor (m/z) | Íon produto 1* (m/z) | EC (eV) | Íon Produto 2** (m/z) | EC (eV) |
|----------------------|----------|--------|----------------------|----------------------|---------|-----------------------|---------|
| Acefato              | 9,2      | 8      | 184,1                | 143                  | 11      | 125                   | 8       |
| Acetamiprido         | 3,51     | 23     | 223                  | 126                  | 20      | 56                    | 15      |
| Ametrina             | 5,43     | 32     | 228                  | 186                  | 18      | 68                    | 36      |
| Atrazina             | 5,39     | 30     | 216                  | 174                  | 18      | 96                    | 23      |
| Azinfós metílico     | 5,7      | 12     | 318                  | 160                  | 8       | 261                   | 8       |
| Azoxistrobina        | 5,87     | 17     | 404                  | 329                  | 30      | 372                   | 15      |
| Bitertanol           | 6,98     | 15     | 440                  | 166                  | 42      | 181                   | 20      |
| Bromuconazol         | 6,29     | 32     | 376                  | 159                  | 35      | 70                    | 25      |
| Carbaril             | 5,03     | 19     | 202                  | 145                  | 22      | 117                   | 28      |
| Carbendazim          | 2,68     | 24     | 192                  | 160                  | 18      | 132                   | 28      |
| Carbofurano          | 4,81     | 25     | 222                  | 165                  | 16      | 123                   | 16      |
| Carbofurano-3-OH     | 3,56     | 24     | 192                  | 160                  | 18      | 132                   | 28      |
| Carboxin             | 4,96     | 25     | 236                  | 143                  | 16      | 87                    | 22      |
| Cianazina            | 4,54     | 28     | 241                  | 214                  | 17      | 96                    | 25      |
| Clomazona            | 5,78     | 23     | 240                  | 125                  | 18      | 89                    | 46      |
| Clorprofame          | 6,22     | 9      | 214                  | 154                  | 18      | 172                   | 8       |
| Diazinona            | 6,85     | 20     | 305                  | 97                   | 35      | 169                   | 22      |
| Dimetoato            | 3,52     | 12     | 230                  | 125                  | 20      | 199                   | 10      |
| Diuron               | 5,46     | 27     | 233                  | 72                   | 18      | 46                    | 14      |
| Epoxiconazol         | 6,33     | 25     | 330                  | 101                  | 50      | 121                   | 22      |
| Fenproprimorfe       | 5,87     | 41     | 285                  | 97                   | 46      | 199                   | 10      |
| Fenamifós            | 6,46     | 27     | 304                  | 202                  | 36      | 217                   | 24      |
| Fenarimol            | 6,44     | 37     | 331                  | 81                   | 34      | 268                   | 22      |
| Fluquiconazol        | 6,35     | 37     | 376                  | 307                  | 30      | 349                   | 18      |
| Flutalonil           | 6,16     | 23     | 324                  | 65                   | 40      | 262                   | 18      |
| Flutriafol           | 5,32     | 23     | 302                  | 123                  | 29      | 70                    | 18      |
| Fluxaproxade         | 5,75     | 44     | 380                  | 131                  | 24      | 248                   | 21      |
| Fostiazato           | 5,39     | 19     | 284                  | 104                  | 22      | 228                   | 10      |
| Imazalil             | 5,33     | 31     | 297                  | 159                  | 22      | 69                    | 22      |
| Imidacloprido        | 3,24     | 23     | 256                  | 175                  | 20      | 209                   | 15      |
| Iprovalicarbe        | 6,34     | 19     | 321                  | 119                  | 16      | 203                   | 10      |
| Linurom              | 5,95     | 25     | 249                  | 160                  | 18      | 181                   | 16      |
| Melationa            | 6,15     | 12     | 331                  | 99                   | 24      | 127                   | 12      |
| Mecarbam             | 6,41     | 12     | 330                  | 227                  | 8       | 97                    | 35      |
| Mepronil             | 6,17     | 27     | 270                  | 91                   | 44      | 119                   | 28      |
| Metalaxil            | 5,51     | 15     | 270                  | 91                   | 44      | 119                   | 28      |
| Metconazol           | 6,97     | 29     | 320                  | 70                   | 22      | 125                   | 36      |
| Metsulfuron metílico | 4,77     | 22     | 382                  | 199                  | 22      | 167                   | 16      |
| Monocrotofós         | 2,89     | 15     | 224                  | 127                  | 16      | 98                    | 12      |
| Monolinuron          | 5,11     | 23     | 215                  | 99                   | 34      | 126                   | 22      |
| Ometoato             | 1,88     | 16     | 214                  | 125                  | 22      | 183                   | 11      |
| Oxamil               | 6,25     | 31     | 341                  | 189                  | 22      | 92                    | 34      |

(conclusão)

| Agrotóxicos        | tR (min) | VC (V) | Íons precursor (m/z) | Íon produto 1* (m/z) | EC (eV) | Íon Produto 2** (m/z) | EC (eV) |
|--------------------|----------|--------|----------------------|----------------------|---------|-----------------------|---------|
| Piridafentiona     | 5,68     | 42     | 200                  | 107                  | 24      | 82                    | 24      |
| Pirimicarbe        | 7,36     | 23     | 322                  | 227                  | 14      | 116                   | 14      |
| Propiconazol       | 6,87     | 37     | 342                  | 159                  | 34      | 69                    | 22      |
| Propizamida        | 6,19     | 23     | 295                  | 93                   | 14      | 96                    | 14      |
| Propoxur           | 4,76     | 12     | 210                  | 111                  | 16      | 168                   | 10      |
| Simazina           | 4,74     | 34     | 202                  | 96                   | 22      | 124                   | 16      |
| Tebuconazol        | 6,79     | 31     | 308                  | 70                   | 22      | 125                   | 40      |
| Terbutilazina      | 6,04     | 28     | 230                  | 174                  | 16      | 96                    | 28      |
| Tetraconazol       | 6,48     | 32     | 372                  | 159                  | 30      | 70                    | 20      |
| Tiabendazol        | 3,04     | 202    | 42                   | 175                  | 25      | 131                   | 30      |
| Tiacloprido        | 3,91     | 32     | 253                  | 126                  | 20      | 90                    | 40      |
| Tiametoxam         | 2,75     | 19     | 292                  | 132                  | 22      | 211                   | 12      |
| Tiodicarbe         | 5,33     | 17     | 308                  | 70                   | 22      | 125                   | 40      |
| Tiofanato metílico | 10,66    | 23     | 343                  | 151                  | 16      | 311                   | 10      |
| Triadimenol        | 6,37     | 12     | 296                  | 70                   | 10      | 99                    | 15      |
| Triazofós          | 6,3      | 22     | 314                  | 162                  | 35      | 119                   | 18      |
| Vamidationa        | 3,54     | 17     | 288                  | 118                  | 28      | 146                   | 10      |

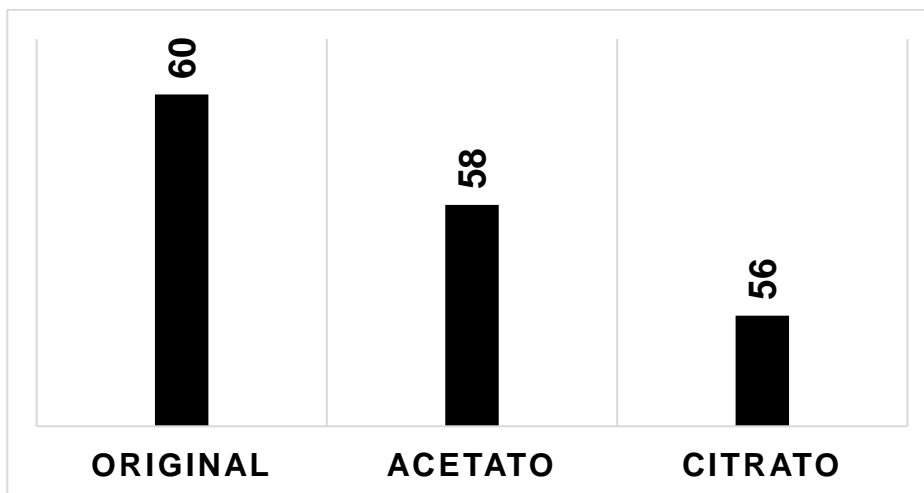
VC: voltagem do cone; EC: energia de colisão; \* íon de quantificação; \*\* íon de identificação

## 4.2 PREPARO DE AMOSTRA

### 4.2.1 Avaliação dos ensaios de extração realizados para a determinação de multirresíduo de agrotóxicos em manga

Ultimamente a demanda por métodos de extração que tornem o preparo de amostra mais fácil, mais barato, em menos tempo de análise e menos prejudicial ao meio ambiente, tem aumentando. Dessa forma, o método escolhido buscou atingir esses objetivos. Os primeiros testes foram efetuados em triplicata e o objetivo foi avaliar qual das três variações do método QuEChERS seria mais eficiente para a extração dos multirresíduo de agrotóxicos em manga. Os resultados (figura 7) foram avaliados em termos de quantidade de compostos recuperados após a fortificação da amostra branco na concentração  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

Figura 7 - Avaliação das variações do método QuEChERS em termos de quantidade de compostos recuperados após a fortificação da amostra branco na concentração de 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$



Fonte: autoria própria

O método QuEChERS original foi mais eficiente na recuperação dos analitos do que os outros métodos. Não houve uma diferença significativa entre os demais métodos, visto que estes conseguiram recuperar 58 e 56 compostos.

O método QuEChERS original utiliza 10 g de amostra com 10 mL de acetonitrila como solvente de extração. Esse solvente extrator é amplamente utilizado porque consegue abranger uma ampla faixa de polaridade se comparado com outros solventes, como o acetato de etila ou a acetona. Outro fator positivo é que ele consegue extrair menos coextrativos, como os compostos lipofílicos, as gorduras e outros interferentes (GONZÁLEZ *et al.* (2017); BORGES *et al.*, 2015).

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

Inicialmente 17 sorventes foram avaliados comparativamente de forma visual em relação à remoção de cor do extrato conforme a figura 8. Os extratos mais limpos estão organizados da esquerda para a direita, sendo que os seis primeiros extratos foram os mais limpos.

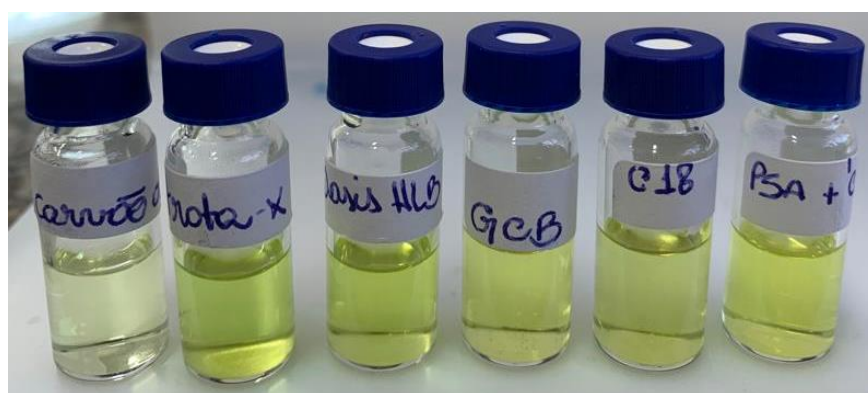
Figura 8 - Pigmento dos extratos com o uso de diferentes sorventes



Fonte: autoria própria

Após a visualização dos extratos com os sorventes, foram selecionados seis sorventes que apresentaram visualmente uma melhor limpeza, sendo eles: carvão ativado (CA), Strata™-X, Oasis HLB, GCB, C18 e PSA+C18, conforme a figura 9.

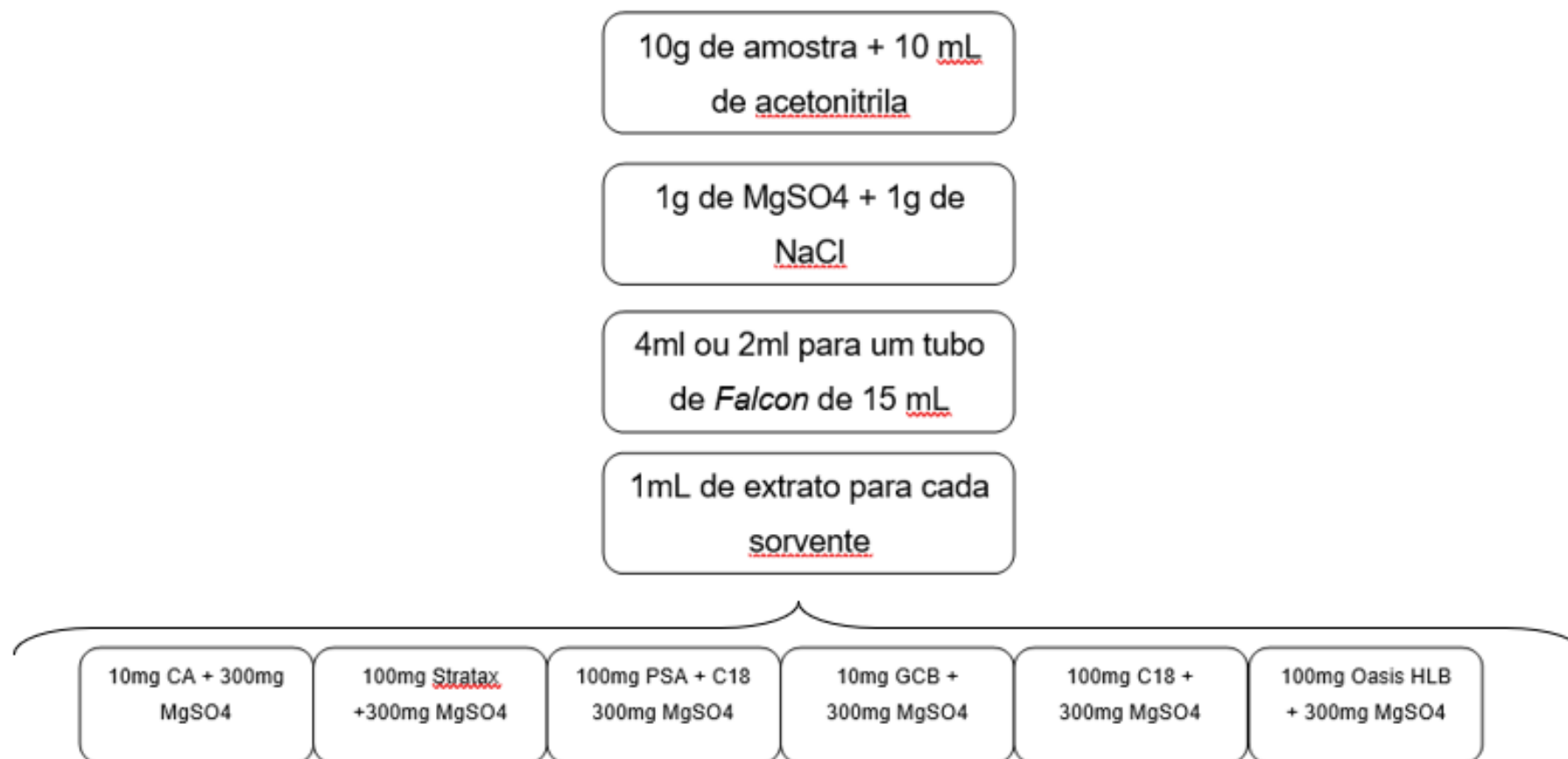
Figura 9 - Resultado da análise comparativa dos sorventes



Fonte: autoria própria

A figura 10 apresenta o procedimento realizado para a avaliação dos seis sorventes. Com exceção do carvão ativado e do GCB (onde utilizou-se 10 mg de cada sorvente), para os demais sorventes foram utilizadas 100 mg de cada para 2 mL de extrato. Em todos os casos utilizou-se 300 mg de  $MgSO_4$ .

Figura 10 - Fluxograma do método de extração multiresíduo de agrotóxicos em manga

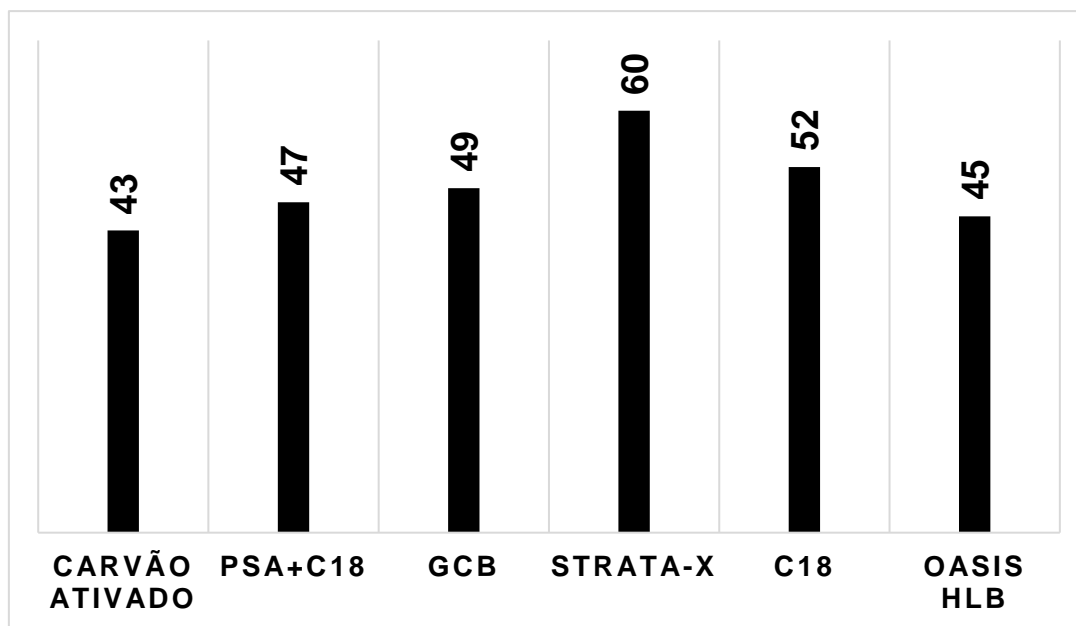


Fonte: autoria própria



Após a realização do método de extração, os extratos foram injetados no sistema UHPLC-MS/MS visando analisar o resultado dos sorventes. A figura 11 demonstra que o sorvente Strata™-X foi o sorvente que menos interferiu na recuperação dos analitos, apresentando melhores recuperações se comparado com os demais.

Figura 11 - Resultado dos compostos recuperados com 300 mg de MgSO<sub>4</sub> e 100 mg de sorvente (com exceção do carvão ativado e GCB que foram 10 mg)

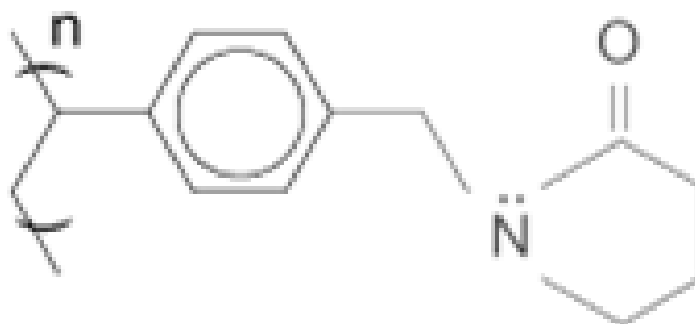


Fonte:

autoria própria

. Esse sorvente, com fórmula estrutural representado na figura 12, é utilizado em extrações em fase sólida (SPE) pois tem propriedades físico-químicas que beneficiam a retenção tanto de compostos apolares quanto compostos polares.

Figura 12 - Strata™-X

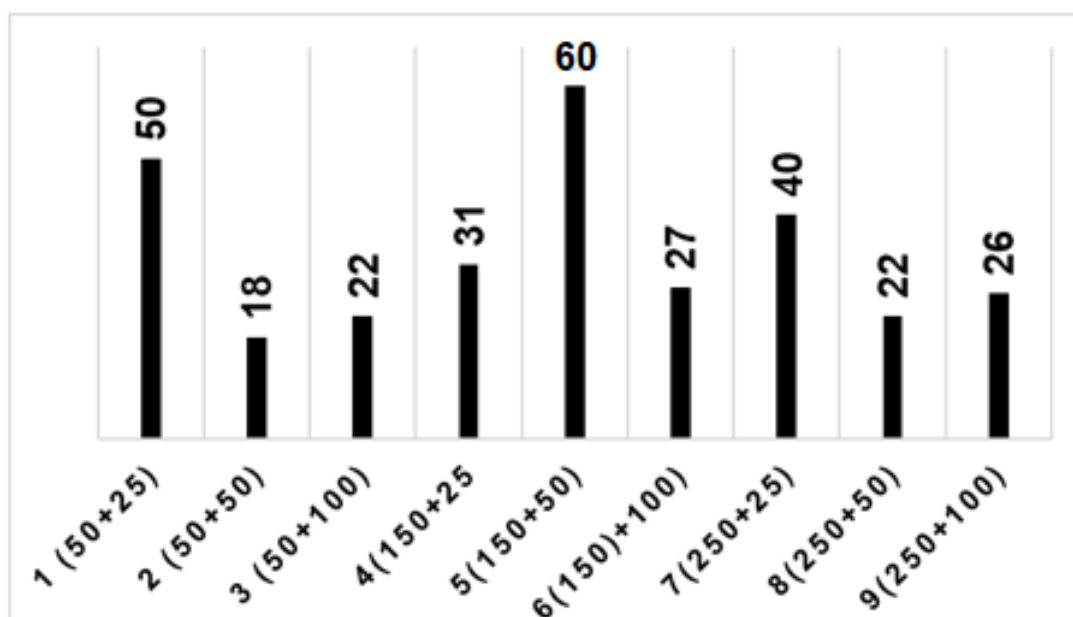


Fonte: <https://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata™-X>

### 4.2.3 Avaliação do planejamento fatorial

A partir do planejamento fatorial podemos relacionar as quantidades do secante sulfato de magnésio e do sorvente Strata™-X mais adequadas para a obtenção de um método satisfatório. A figura 13 representa os resultados de recuperação dos analitos a partir de uma amostra branco fortificada de manga na concentração  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

Figura 13 - Resultado dos compostos recuperados a partir de um planejamento fatorial entre o sal secante ( $\text{MgSO}_4$ ) e o sorvente (Strata™-X)



Fonte: autoria própria

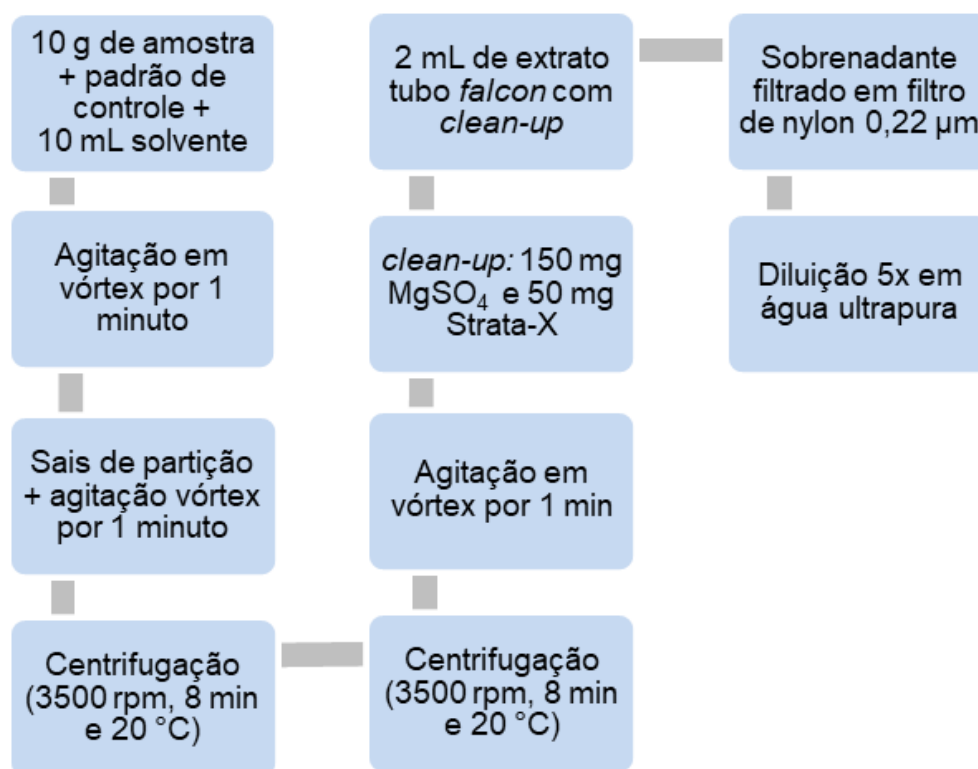
De acordo com os resultados podemos observar que o ensaio 5 (que corresponde a 150 mg de sulfato de magnésio e 50 mg de Strata™-X) foi o que obteve uma melhor resposta. O ensaio 1, com quantidades muito inferiores de sal e sorvente se comparado com o ensaio 5, foi o que apresentou resultados adequados para um número considerável de compostos, porém as condições do ensaio 5 permitiu a recuperação do maior número de analitos e foi selecionado para as próximas etapas.

### 4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO OTIMIZADO

A partir dos resultados obtidos o método foi validado para a determinação multirresíduo de 60 agrotóxicos em manga. A figura 14 apresenta o passo a passo do procedimento. Inicialmente foram pesados 10 g de amostra e em seguida adicionado o padrão de controle, seguindo-se agitação em vórtex por 1 min e adição do solvente de extração. Entre a adição do padrão de controle e o solvente houve a agitação manual dos frascos durante 1 min. Os sais utilizados na etapa de partição foram: 4 g de sulfato de magnésio anidro mais 1 g de cloreto de sódio, e após a adição dos sais ocorre a agitação dos frascos. Em seguida, os tubos são centrifugados a fim de haver uma separação eficiente das fases.

A partir da separação das fases, 2 mL do extrato são transferidos para os tubos de *Falcon* de 15 mL contendo os sorventes de *clean-up*, que correspondem a 150 mg do sulfato de magnésio mais 50 mg do Strata™-X. Neste processo também ocorre a agitação de 1 min e o processo de centrifugação. Depois dessa etapa de limpeza do extrato, o sobrenadante é recolhido e filtrado com filtros de *nylon* de 0,22 µm e depois diluídos 5 vezes em água ultrapura para melhorar o comportamento cromatográfico.

Figura 14 - Método de extração para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em manga

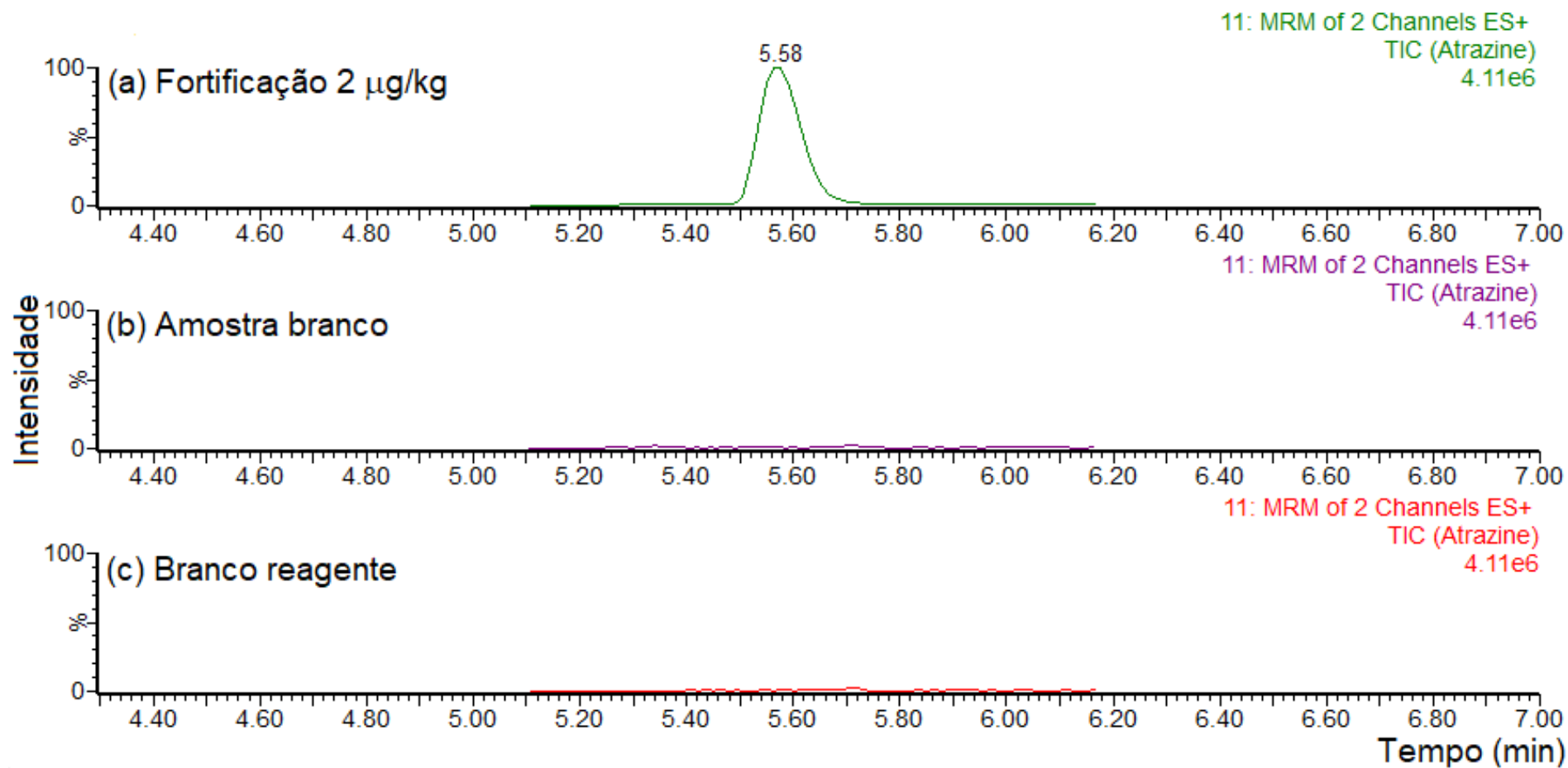


Fonte: autoria própria

### 4.3.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada e confirmada a partir da comparação dos cromatogramas de uma amostra branco de manga, um branco reagente e uma amostra branco fortificada em  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  (figura 15). O analito utilizado para fazer essa comparação entre os cromatogramas foi a atrazina e, conforme pode ser visualizado na figura 15, não houve a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção e também não há a presença de sinais cromatográficos nas transições monitoradas para o composto de interesse. Portanto, pode-se concluir que o método é seletivo para os analitos em estudo.

Figura 15 - Cromatogramas representativos obtidos no modo SRM por UHPLC-MS/MS para o composto (a) atrazina (2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), (b) extrato branco da matriz e (c) branco reagente



Fonte: autoria própria

### 4.3.2 Curva analítica, faixa linear e efeito matriz

A tabela 12 apresenta os resultados dos coeficientes de determinação ( $r^2$ ) para a curva analítica extraída da matriz manga, a equação da reta e o efeito matriz de cada composto.

Tabela 12 - Equação da reta e coeficientes de determinação ( $r^2$ ) e efeito matriz para cada agrotóxico

| Compostos             | Equação da reta                    | $r^2$ | (continua) |
|-----------------------|------------------------------------|-------|------------|
|                       |                                    |       | EM (%)     |
| Acefato               | $y=14819426,61x + (-5210184,182)$  | 0,998 | -53,7      |
| Acetamiprido          | $y=123828280,6x + (-10824646,73)$  | 0,999 | -27,3      |
| Ametrina              | $y=252548834,7x + (-53565924,31)$  | 0,999 | -1,4       |
| Atrazina              | $y=125432320,3x + (-8872251,972)$  | 0,998 | -11,6      |
| Azinfós metílico      | $y=13161168,92x + (-1803335,31)$   | 0,997 | 4,8        |
| Azoxistrobina         | $y= 187527739x + (-22416874,64)$   | 0,986 | 4,6        |
| Bitertanol            | $y= 4173829,289x + (-1376931,105)$ | 0,996 | -3,2       |
| Bromuconazol          | $y= 37853012,85x + (-5948254,799)$ | 0,993 | -18,6      |
| Carbaril              | $y=57639797,3x + (-14679783,04)$   | 0,997 | -6,6       |
| Carbendazim           | $y= 156361912,8x + 35786775,72$    | 0,998 | -34        |
| Carbofurano           | $y= 85387762,62x + (-60885675,27)$ | 0,997 | -43,6      |
| Carbofurano-3-hidroxi | $y= 33541879,11x + 4456493,272$    | 0,998 | -21,8      |
| Carboxin              | $y= 200751802,1x + (-83680677,01)$ | 0,998 | -13,2      |
| Cianazina             | $y= 39463849,65x + (-11886243,99)$ | 0,998 | 25,6       |
| Clomazona             | $y= 188008513,9x + (-31969807,93)$ | 0,996 | -1,7       |
| Clorprofame           | $y= 2364715,023x + (6298822,606)$  | 0,961 | -23        |
| Diazinona             | $y=93582802,54x + (-22908622,79)$  | 0,991 | -12,7      |
| Dimetoato             | $y= 50998695,47x + (-7872632,309)$ | 0,999 | -28,2      |
| Diuron                | $y= 99716473,1x + (-13737551,89)$  | 0,998 | -18,4      |
| Epoxiconazol          | $y= 60691926,94x + (-5799839,718)$ | 0,993 | -9         |
| Fenproprimorfe        | $y= 185750653,2x + (-22947854,8)$  | 0,996 | 9,2        |
| Fenamifós             | $y= 205708046,6x + (-8714907,102)$ | 0,995 | -4,9       |
| Fenarimol             | $y= 10444071,39x + (-2088379,41)$  | 0,997 | -3,8       |
| Fluquiconazol         | $y= 12106063,03x + (-1961641,342)$ | 0,997 | -12,4      |
| Flutalonil            | $y= 33491189,41x + (-2093517,552)$ | 0,988 | -17,3      |
| Flutriafol            | $y= 26565660,69x + 6989445,348$    | 0,997 | 0          |
| Fluxapiroxade         | $y= 1258482,048x + 448306,6941$    | 0,989 | -12,2      |
| Fostiazato            | $y= 256001010,1x + (-70049382,17)$ | 0,999 | -16,9      |
| Imazalil              | $y= 55838168,55x + (-7205744,577)$ | 0,997 | -12,6      |
| Imidacloprido         | $y= 20681945,64x + (-4053785,678)$ | 0,999 | 53,1       |
| lprovalicarbe         | $y= 251752487,2x + (-55924076,44)$ | 0,997 | -10,3      |
| Linurom               | $y= 52036139,86x + (9299772,763)$  | 0,998 | -10,1      |
| Melationa             | $y= 40172731,38x + (-1346542,254)$ | 0,993 | 3,4        |
| Mecarbam              | $y= 35003167,92x + (3019946,74)$   | 0,986 | 0,5        |
| Mepronil              | $y= 142815820,9x + (2046406,743)$  | 0,992 | -16,3      |

| (conclusão)          |                                  |                |        |
|----------------------|----------------------------------|----------------|--------|
| Compostos            | Equação da reta                  | r <sup>2</sup> | EM (%) |
| Metalaxil            | y= 121029066,6 x + 8115446,452   | 0,999          | -7,3   |
| Metconazol           | y= 35801421,65x + (-4053956,731) | 0,989          | -16,2  |
| Metsulfuron metílico | y= 30327619,85x + (-16967082,09) | 0,997          | -24,6  |
| Monocrotofós         | y= 91937921,59x + (-32472364,45) | 0,998          | -10,7  |
| Monolinuron          | y= 55562674,78x + 2564530,08     | 0,997          | -3,4   |
| Ometoato             | y= 29541577,22x + 930461,7068    | 0,999          | -13,5  |
| Oxamil               | y= 35516863,56x+ (-12199116,68)  | 0,998          | 3      |
| Piridafentiona       | y=20681945,64 x + (-20605855,2)  | 0,898          | -1,6   |
| Pirimetanil          | y=48584852,6 x + (-13685630,29)  | 0,992          | -12,8  |
| Pirimicarbe          | y=94187520,73x + (-50360609,79)  | 0,995          | -70,1  |
| Propiconazol         | y= 40443574,23x + (-4212768,605) | 0,998          | -82    |
| Propizamida          | y= 30879174,11x + (-1523856,728) | 0,993          | -12,3  |
| Propoxur             | y=93490740,7x + (-56053003,75)   | 0,996          | -11,3  |
| Simazina             | y=24026415,8x + (-9498072,692)   | 0,998          | -24    |
| Tebuconazol          | y=6811103,286x + (-2222202,082)  | 0,998          | -31,4  |
| Terbutilazina        | y=199468179x + 1633820,589       | 0,997          | -16    |
| Tetraconazol         | y=45525099,29x + (-10911564,72)  | 0,997          | -9     |
| Tiabendazol          | y=121424357,4x + (-61452578,89)  | 0,992          | -13    |
| Tiacloprido          | y=143229262,9x + (-39636314,73)  | 0,998          | -44    |
| Tiametoxam           | y=33681364,03x + (-12345173,03)  | 0,998          | -9,7   |
| Tiodicarbe           | y=23697119,86 x + 2218101,55     | 0,998          | 10,3   |
| Tiofanato metílico   | y=97722453,28x + (-15192966,31)  | 0,999          | -1,5   |
| Triadimenol          | y=10158524,89x + 1243651,762     | 0,998          | -6,4   |
| Triazofós            | y=74034340,61x + (-265197,4337)  | 0,997          | 29,3   |
| Vamidationa          | y=51765142,37x + (-15855377,47)  | 0,992          | -16,2  |

Fonte: autoria própria

Os resultados dos testes sinalizam que o método analítico é adequado para o estudo, uma vez que, a maioria dos agrotóxicos apresentou um coeficiente de determinação (r<sup>2</sup>) maior que 0,994. Os resultados do efeito matriz variaram entre -53,7 e -1,7% (FERRER *et al.*, 2011) determinam que valores entre ± 20% não vão ter um efeito matriz significativo, já que esses valores seriam próximos dos valores de repetibilidade. Entretanto, valores entre ±20% e ±50% demonstram um efeito matriz médio. Os valores que são maiores que ±50% são considerados elevados. Segundo SANTÉ (2015) o efeito matriz aceitável deve variar entre ±20% e geralmente é calculado levando em consideração a curva no solvente e na matriz.

Os resultados de efeito matriz evidenciam a necessidade do uso da curva analítica na matriz branco para compensar esse efeito (FERRER *et al.*, 2011).

#### **4.3.3 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOD) do método**

O limite de quantificação deste método (LOQm) foi validado como sendo o menor nível de fortificação, com um sinal ruído maior que 10, e a precisão e a exatidão ficaram dentro dos limites aceitáveis (recuperação 70 a 120%; RSD  $\leq$  20%) (SANTÉ, 2015). O LOQ do método variou entre 5 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e levou em consideração o fator de diluição de 5 vezes. O limite de detecção (LOD) do método foi calculado a partir do valor do LOQ dividido por 3,33. Sendo assim, os resultados do LOD do método variaram entre 1,5 e 15,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

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

Com o intuito de avaliar a precisão do método, foram realizados ensaios de recuperação em 4 níveis de fortificação (5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), sendo que cada nível foi replicado 5 vezes. Os resultados, conforme apresentado na tabela 13, mostraram que 9 compostos apresentaram recuperações entre 70 e 120% nos 4 níveis de fortificação, 31 compostos recuperaram em três níveis, 14 compostos em dois níveis e seis compostos somente em um nível.

Os parâmetros para a aceitação desses resultados se basearam na faixa de recuperação que fica entre 70 e 120% e no RSD  $\leq$  20% (SANTÉ, 2015). Dessa maneira, os resultados da validação do método QuEChERS original se mostraram eficientes para a análise de multirresíduo de agrotóxicos em manga.



Tabela 13 - Resultados de validação do método QuEChERS original: efeito matriz (EM %), LOQ, LOD, linearidade (coeficiente de determinação, r<sup>2</sup>), exatidão (recuperação, %) e precisão (RSD, %) para a matriz manga

(continua)

| Agrotóxicos      | LOQ<br>( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) | LOD<br>( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) | Nível ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) Repetitividade, n=5<br>Recuperação (RSD) |         |         |         | Nível ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) Precisão Intermed., n=5<br>Recuperação (RSD) |        |        |        |
|------------------|----------------------------------|----------------------------------|--|---------|---------|---------|--|--------|--------|--------|
|                  |                                  |                                  | 5  | 10      | 25      | 50      | 5  | 10     | 25     | 50     |
| Acefato          | 5                                | 1,5                              | 103,2 (4)  | 85 (13) | 70(7)   | 76(5)   | -  | -      | 102(3) | 97(6)  |
| Acetamiprido     | 5                                | 1,5                              | 118,1(5)   | 114(6)  | 100(5)  | 101(2)  | -  | 88(2)  | 79(3)  | 80(7)  |
| Ametrina         | 10                               | 3                                | -  | 115(5)  | 101(5)  | 97(8)   | -  | 99(4)  | 87(7)  | 89(7)  |
| Atrazina         | 10                               | 3                                | -  | 117(4)  | 104(5)  | 102(5)  | -  | 94(3)  | 87(4)  | 91(7)  |
| Azinfós metílico | 10                               | 3                                | -  | 117(16) | 106(17) | 106(19) | -  | 89(12) | 82(18) | 85(14) |
| Azoxistrobina    | 10                               | 3                                | -  | 118(18) | 102(18) | 112(14) | -  | 81(17) | 77(19) | 15(19) |
| Bitertanol       | 10                               | 3                                | -  | -       | 111(19) | 120(18) | -  | -      | 89(17) | 79(16) |
| Bromuconazol     | 5                                | 1,5                              | 119,1(9)   | 120(9)  | 90(11)  | 95(17)  | 79(15)   | 72(18) | 79(12) | 79(14) |
| Carbaril         | 10                               | 3                                | -  | 115(5)  | 103(5)  | 100(8)  | -  | 98(4)  | 89(7)  | 93(8)  |
| Carbendazim      | 5                                | 1,5                              | 109,1(6)   | 101(5)  | 99(4)   | 98(4)   | 90(14)   | 84(5)  | 83(6)  | 98(7)  |
| Carbofurano      | 25                               | 7,5                              | -  | -       | 108(9)  | 106(5)  | -  | -      | 94(6)  | 93(5)  |
| Carbofurano-3-OH | 5                                | 1,5                              | 101,2(6)   | 104(6)  | 103(5)  | 107(2)  | -  | -      | 88(3)  | 98(7)  |
| Carboxin         | 10                               | 3                                | -  | 118(7)  | 95(6)   | 94(10)  | -  | 94(84) | 81(8)  | 85(8)  |
| Cianazina        | 10                               | 3                                | -  | 118(7)  | 95(6)   | 94(5)   | -  | 99(4)  | 81(8)  | 96(6)  |
| Clomazona        | 10                               | 3                                | -  | 114(4)  | 98(5)   | 97(9)   | 95(5)  | 95(5)  | 83(8)  | 89(9)  |
| Clorprofame      | 50                               | 15                               | -  | -       | --      | 104(20) | -  | -      | --     | 82(17) |
| Diazinona        | 50                               | 15                               | -  | -       | -       | 114(19) | -  | --     | -      | 71(18) |
| Dimetoato        | 10                               | 3                                | -  | 118(3)  | 110(3)  | 107(2)  | -  | 94(2)  | 96(3)  | 100(8) |
| Diuron           | 10                               | 3                                | -  | 117(2)  | 99(7)   | 114(19) | -  | 88(6)  | 72(9)  | 73(8)  |
| Epoxiconazol     | 25                               | 7,5                              | -  | -       | 100(20) | 110(20) | 75(18)   | 78(19) | 78(18) | 81(16) |

(continua)

| Agrotóxicos          | LOQ                       | LOD                       | Nível ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) Repetitividade, n=5 |         |         |         | Nível ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) Precisão Intermed., n=5 |        |        |        |
|----------------------|---------------------------|---------------------------|---|---------|---------|---------|---|--------|--------|--------|
|                      | ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) | ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) | Recuperação ( $\pm\text{RSD}$ )                     |         |         |         | Recuperação ( $\pm\text{RSD}$ )                         |        |        |        |
|                      |                           |                           | 5   | 10      | 25      | 50      | 5   | 10     | 25     | 50     |
| Fenproprimorfe       | 5                         | 1,5                       | 115,5(7)  | 119(8)  | 94(10)  | 104(13) | 95-14   | 99-14- | 70-20  | 85-12  |
| Fenamifós            | 10                        | 3                         | -   | 118(1)  | 107(8)  | 104(17) | 90(8)   | 92(11) | 91(15) | 96(15) |
| Fenarimol            | 10                        | 3                         | -   | 110(20) | 91(16)  | 98(19)  | --  | 77(18) | 71(14) | 74(18) |
| Fluquiconazol        | 25                        | 7,5                       | -   | -       | 103(19) | 113(16) | -   | -      | 77(19) | 81(18) |
| Flutalonil           | 25                        | 7,5                       | -   | -       | 109(18) | 120(17) | -   | -      | 87(17) | 85(20) |
| Flutriafol           | 50                        | 15                        | -   | -       | -       | 108(9)  | -   | -      | -      | 99(9)  |
| Fluxapiroxade        | 50                        | 15                        | -   | -       | -       | 120(17) | -   | -      | -      | 107(8) |
| Fostiazato           | 25                        | 7,5                       | -   | -       | 107(3)  | 105(4)  | -   | -      | 96(6)  | 93(6)  |
| Imazalil             | 25                        | 7,5                       | -   | -       | 100(6)  | 105(6)  | -   | -      | 94(4)  | 90(8)  |
| Imidacloprido        | 10                        | 3                         | -   | 120(1)  | 109(6)  | 108(3)  | -   | 90(4)  | 94(4)  | 96(9)  |
| Iprovalicarbe        | 10                        | 3                         | -   | 120(9)  | 99(9)   | 99(12)  | -   | 92(6)  | 89(12) | 89(12) |
| Linurom              | 5                         | 1,5                       | 101,3(16)   | 103(11) | 90(10)  | 99(15)  | -   | 87(11) | 75(19) | 84(18) |
| Melationa            | 25                        | 7,5                       | -   | -       | 99(20)  | 116(14) | -   | -      | 91(17) | 89(18) |
| Mecarbam             | 50                        | 15                        | -   | -       | -       | 118(18) | -   | -      | -      | 81(19) |
| Mepronil             | 50                        | 15                        | -   | -       | --      | 115(16) | -   | -      | -      | 85(19) |
| Metalaxil            | 10                        | 3                         | -   | 116(4)  | 107(3)  | 110(15) | -   | 89(4)  | 96(5)  | 98(7)  |
| Metconazol           | 10                        | 3                         | -   | 115(18) | 93(19)  | 107(14) | -   | 72(19) | 75(15) | 70(17) |
| Metsulfuron metílico | 25                        | 7,5                       | -   | -       | 102(14) | 105(6)  | -   | 107(4) | 116(6) | 111(7) |
| Monocrotofós         | 10                        | 3                         | -   | 117(3)  | 103(4)  | 105(3)  | -   | 100(2) | 102(4) | 108(5) |
| Monolinuron          | 10                        | 3                         | -   | 109(7)  | 104(5)  | 102(8)  | -   | 95(4)  | 88(7)  | 91(8)  |
| Ometoato             | 10                        | 3                         | -   | 116(6)  | 102(6)  | 102(8)  | -   | 95(5)  | 88(8)  | 89(8)  |
| Oxamil               | 10                        | 3                         | -   | 116(4)  | 101(3)  | 103(3)  | -   | 101(3) | 107(2) | 113(5) |

(conclusão)

| Agrotóxicos        | LOQ                       | LOD                       | Nível ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) Repetitividade, n=5 |         |         |         | Nível ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) Precisão Intermed, n=5 |         |        |        |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|---|---------|---------|---------|--|---------|--------|--------|
|                    | ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) | ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) | Recuperação ( $\pm\text{RSD}$ )                     |         |         |         | Recuperação ( $\pm\text{RSD}$ )                        |         |        |        |
|                    |                           |                           | 5   | 10      | 25      | 50      | 5  | 10      | 25     | 50     |
| Piridafentiona     | 25                        | 7,5                       | -   | -       | 101(18) | 118(15) | -  | -       | 87(20) | 86(19) |
| Pirimetanil        | 10                        | 3                         | -   | 109(9)  | 87(9)   | 87(16)  | -  | 82(6)   | 76(16) | 76(12) |
| Pirimicarbe        | 25                        | 7,5                       | -   | -       | 103(12) | 105(3)  | -  | -       | 91(5)  | 96(6)  |
| Propiconazol       | 10                        | 3                         | -   | 119(18) | 103(18) | 105(20) | -  | 78(19)  | 82(17) | 78(17) |
| Propizamida        | 10                        | 3                         | -   | 120(15) | 99(12)  | 97(20)  | -  | 76(17)  | 80(21) | 83(19) |
| Propoxur           | 25                        | 7,5                       | -   | -       | 107(8)  | 106(4)  | -  | -       | 94(4)  | 95(7)  |
| Simazina           | 25                        | 7,5                       | -   | -       | 103(8)  | 100(4)  | -  | -       | 90(7)  | 91(5)  |
| Tebuconazol        | 10                        | 3                         | -   | 119(20) | 94(20)  | 113(11) | -  | 81(18)  | 87(20) | 83(16) |
| Terbutilazina      | 5                         | 1,5                       | 116,9(6)  | 113(5)  | 100(6)  | 99(10)  | 93(10)   | 92(4)   | 85(9)  | 88(10) |
| Tetraconazol       | 25                        | 7,5                       | -   | -       | 103(15) | 117(12) | -  | --      | 72(18) | 73(16) |
| Tiabendazol        | 10                        | 3                         | -   | 97(9)   | 82(20)  | 88(4)   | -  | 80(7)   | 82(2)  | 90(6)  |
| Tiacloprido        | 10                        | 3                         | -   | 117(1)  | 107(3)  | 105(3)  | -  | 99(2)   | 94(2)  | 103(6) |
| Tiametoxam         | 10                        | 3                         | -   | 115(3)  | 105(3)  | 103(4)  | -  | 100(4)  | 93(3)  | 108(6) |
| Tiodicarbe         | 5                         | 1,5                       | 110(5)  | 107(8)  | 97(6)   | 105(5)  | -  | 101(5)  | 93(3)  | 95(6)  |
| Tiofanato metílico | 5                         | 1,5                       | 107(8)  | 96(7)   | 97(6)   | 84(11)  | 72(6)  | 83(4)   | 73(5)  | 86(8)  |
| Triadimenol        | 10                        | 3                         | -   | 103(10) | 81(7)   | 98(15)  | -  | 106(16) | 94(13) | 94(11) |
| Triazofós          | 25                        | 7,5                       | -   | -       | 99(16)  | 119(20) | -  | -       | -      | 89(10) |
| Vamidationa        | 10                        | 3                         | -   | 117(2)  | 108(3)  | 107(2)  | -  | 93(4)   | 93(4)  | 102(5) |

Fonte: autoria própria

### 4.3 APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS REAIS

O método desenvolvido neste trabalho foi aplicado em dezesseis amostras de manga de diferentes cidades. Conforme a tabela 14, podemos observar que 8 compostos foram quantificados, sendo eles: acetamiprido, azoxistrobina, carbendazim, imidacloprido e tebuconazol.

Tabela 14 - Resultados, em  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , das amostras de manga que apresentaram resíduos de agrotóxicos sendo analisadas utilizando o método QuEChERS original e UHPLC-MS/MS

| Amostras | Acetaprimido | Azoxistrobina | Carbendazim | Imidacloprido | Tebuconazol |
|----------|--------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| A1       | nd.          | nd.           | <LOQ        | nd.           | nd.         |
| A2       | nd.          | nd.           | nd.         | nd.           | nd.         |
| A3       | nd.          | nd.           | nd.         | nd.           | nd.         |
| A5       | nd.          | <LOQ          | nd.         | nd.           | nd.         |
| A6       | nd.          | 17,55         | nd.         | nd.           | nd.         |
| A7       | nd.          | nd.           | nd.         | nd.           | 71,65       |
| A8       | nd.          | nd.           | nd.         | nd.           | nd.         |
| A9       | nd.          | nd.           | <LOQ        | nd.           | nd.         |
| A10      | nd.          | nd.           | 48,30       | nd.           | 3,55        |
| A11      | nd.          | nd.           | nd.         | nd.           | nd.         |
| A12      | nd.          | nd.           | nd.         | nd.           | nd.         |
| A13      | nd.          | nd.           | nd.         | nd.           | nd.         |
| A14      | nd.          | nd.           | <LOQ        | nd.           | nd.         |
| A15      | 11,45        | nd.           | 10,40       | 3,15          | nd.         |
| A16      | nd.          | nd.           | nd.         | nd.           | nd.         |

Fonte: autoria própria

A partir da tabela 14 podemos observar que a amostra A15 apresentou resíduos de 3 agrotóxicos e a amostra A10 de dois agrotóxicos, indicando o uso frequente de agrotóxicos, possivelmente na etapa de produção e no pós-colheita. A amostra A15, contendo resíduos do composto acetamiprido está com uma concentração acima do que é permitido pela ANVISA para este composto. Já as amostras A5 e A6 contendo azoxistrobina apresentam uma concentração inferior ao LMR permitido.

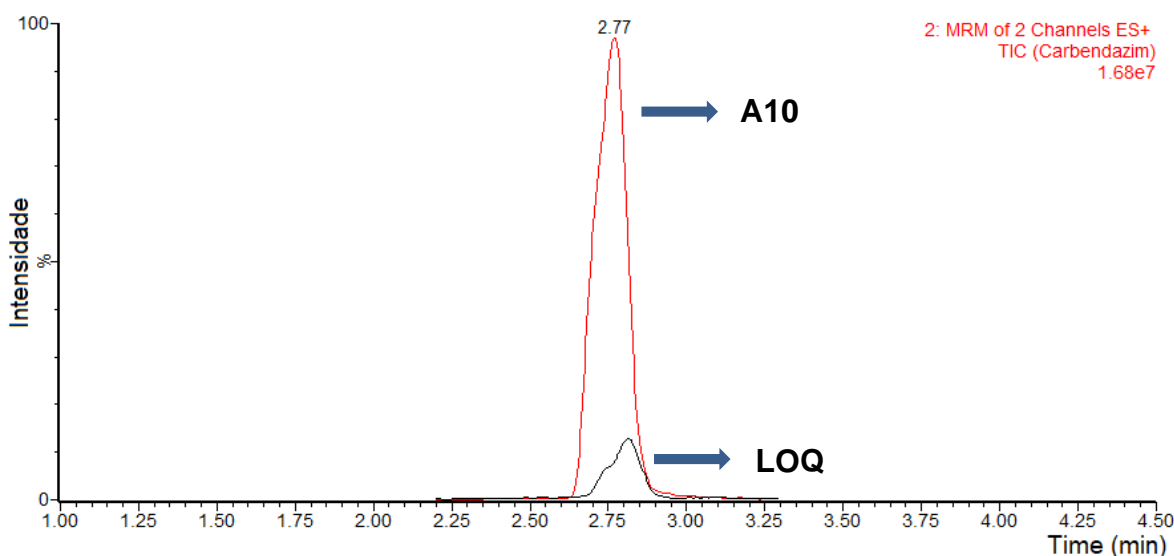
Tabela 15 - Comparação das concentrações encontradas nas amostras com os LMRs

| Amostras | Analitos      | Concentração (mg kg <sup>-1</sup> ) | LMRs (mg kg <sup>-1</sup> ) |
|----------|---------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| A15      | Acetaprimido  | 0,011                               | 0,01                        |
| A5       | Azoxistrobina | <LOQ                                | 6                           |
| A6       | Azoxistrobina | 0,017                               | 6                           |
| A1       | Carbendazim   | <LOQ                                | não é permitido             |
| A9       | Carbendazim   | <LOQ                                | não é permitido             |
| A10      | Carbendazim   | 0,048                               | não é permitido             |
| A14      | Carbendazim   | <LOQ                                | não é permitido             |
| A15      | Carbendazim   | 0,010                               | não é permitido             |
| A15      | Imidacloprido | 0,003                               | 0,7                         |
| A7       | Tebuconazol   | 0,071                               | 0,1                         |
| A10      | Tebuconazol   | 0,003                               | 0,1                         |

Fonte: autoria própria

As amostras A1, A9, A10, A14 e A15, apresentaram carbendazim, um agrotóxico que não é permitido para o cultivo de manga. O carbendazim é um fungicida de translocação sistêmica, com ação protetora e curativa, de amplo espectro. É um pesticida de fácil absorção através das raízes e tecidos verdes e o seu mecanismo de ação se caracteriza na inibição de tubos germinativos na formação de apressórios e crescimento de micélios. Na figura 16 é possível fazer uma avaliação comparativa do LOQ (5 µg kg<sup>-1</sup>) para carbendazim com a concentração que foi encontrada na A 10 (48,3 µg kg<sup>-1</sup>).

Figura 16 - Cromatograma para o composto carbendazim na amostra A10 sobreposto ao cromatograma de fortificação no nível do LOQ (5 µg kg<sup>-1</sup>)



Fonte: autoria própria

De acordo com a ANVISA (2019), a maior comercialização de carbendazim no Brasil acontece na região centro-oeste com 36% e no Sul com 25%, sendo os principais estados, Mato Grosso do Sul com 15,8%, Goiás com 13,7%, Paraná com 14,5% e o Rio Grande do Sul com 8,5%.

O carbendazim é um fungicida de classe toxicológica III, o que representa uma toxicidade média, sendo um composto capaz de provocar câncer nos seres humanos (ANVISA, 2021). A sua toxicidade está associada a alguns casos de mutagenicidade e atividade tumoral em células ovarianas (SILVA *et al.*, 2015).

## 5 CONCLUSÃO

Esse trabalho possibilitou o desenvolvimento e a validação de um método de preparo de amostra para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em manga, empregando método QuEChERS original e UHPLC-MS/MS. Durante o procedimento, foram realizados diferentes testes, afim de determinar qual condição do método QuEChERS apresentaria melhores resultados e posterior testes para a modificação dos sais de limpeza, na qual foi validada com o sorvente Strata™-X.

Para a escolha do sorvente utilizado na etapa de limpeza foram realizados três ensaios, o primeiro ensaio tinha como objetivo avaliar visualmente a mudança de coloração do extrato com o uso de diferentes sais de limpeza. Em seguida, os sorventes selecionados passaram pelo processo de extração e injetados afim de identificar se a recuperação dos analitos não era afetada. E no final, com o sorvente já selecionado foi realizado um planejamento fatorial.

O método foi validado seguindo os parâmetros estabelecidos pela ANVISA e pelo INMETRO, e se mostraram satisfatórios para a determinação de 60 agrotóxicos. O método foi aplicado em dezesseis amostras comerciais de manga, de diferentes municípios, e os resultados mostraram a presença de resíduos de agrotóxicos com concentrações acima do que é permitido pela ANVISA, como o tebuconazol ( $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$ ), e analitos proibidos para o cultivo da manga, como o carbendazim.

Podemos concluir que os objetivos iniciais foram alcançados, uma vez que, os níveis de recuperação ficaram entre 70 e 120% e o RSD  $\leq 20\%$ , conforme indica a legislação brasileira.

## **6 DESTINO DO MULTIRRESÍDUO GERADO**

Tanto os resíduos sólidos quanto os resíduos líquidos que foram gerados durante a realização deste trabalho foram separados e identificados e posteriormente encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. Os resíduos são encaminhados para uma empresa terceirizada, a qual realiza o tratamento e descarte adequado.

Os resíduos sólidos são descartados em sacos plásticos devidamente identificados e os resíduos líquidos são armazenados em frascos, identificados como halogenados ou não halogenados.



## **7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- I. Avaliar a aplicabilidade do método, testando em mangas verdes, sucos de manga e polpas de manga.
- II. Ampliar o escopo de agrotóxicos para realizar análises mais amplas.
- III. Verificar a viabilidade do método para análises empregando a técnica de GC-MS/MS.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA -ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada -RCD nº 294, de 29 de julho de 2019**; “Dispõe sobre os critérios para avaliação de classificação toxicológica, priorização da análise e comparação da ação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira, e dá outras providências”; publicada no Diário Oficial da União em 31 jul 2019, Brasília, DF.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA- ANVISA. (2020a). In: Monografias de agrotóxicos, 2020. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos>.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA- ANVISA (2020b). Programa de Análise de Multirresíduo de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Relatório das análises de amostras monitoras no período de 2019 a 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-deresiduos-em-alimentos>>.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Resolução da diretoria colegiada – RCD nº 4, de 18 de janeiro de 2012**; “Dispõe sobre os critérios para a realização de estudos de resíduos de agrotóxicos para fins de registro de agrotóxicos no Brasil”; publicado no Diário Oficial da União em 19 jan 2012, Brasília, DF.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). AOAC Official methods of analysis. Appendix D: guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Washington: **AOAC**, 2002.

AQUINO-NETO, F.R e NUNES, D.S.S. (2003). **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, p.187

BARBIERI, M. V. et al. Analysis of 52 pesticides in fresh fish muscle by QuEChERS extraction followed by LC-MS/MS determination. **Science of The Total Environment**, v. 653, p. 958-967, 2019.

BARRIGOSSO, J. A. F *et al.* **Inseticidas Registrados para a Cultura do Arroz e Análise de Parâmetros Indicadores de seu Comportamento no Ambiente.** Embrapa, 2010 Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/193142/1/circ74.pdf>. Acesso: 12 jul.2021.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos.** 4ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2010, 414 p.

BUAH-KWOFIE, A.; HUMPHRIES, M. S. Validation of a modified QuEChERS method for the analysis of organochlorine pesticides in fatty biological tissues using two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1105, p. 85-92, 2019.

BRASIL. **Decreto nº 98.816, de 11 de janeiro de 1990**; “Regulamenta a Lei nº 7.802, de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências”; publicado no Diário Oficial da União em 12 jan 1990, Brasília, DF.

BRASIL. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**; “Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências”; publicado no Diário Oficial da União em 12 jul 1789, Brasília, DF.

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

BRANDÃO, M. C. C.; MAIA, G. A.; LIMA, D. P.; PARENTE, E. J. de Sá.; CAMPELLO, C. C.; NASSU, R. T.; FEITOSA, T.; de Sousa, P. H. M. Análise físico-química, microbiológica e sensorial de frutos de manga submetidos à desidratação osmótico-solar. **Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal**, v. 25, n. 1, 38- 41, 2003.

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 multirresíduo e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v.4, p 227-240, 2012.

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

CODEX ALIMENTARIUS, 2018: Glossary of Terms: **Pesticides. Food and Agriculture Organization of the United States**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/glossary/en/>>.

COUTINHO, Cláudia FB et al. Carbendazim e o meio ambiente: degradação e toxicidade. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 16, 2006.

COLLINS, C.; H.; BORGES, G. L.; BONATO, P. S. (ed.). **Fundamentos de Cromatografia**. São Paulo: Editora da Unicamp, 2006. 456 p.

CUNICO et al. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a determinação de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão acadêmica**, Curitiba, v.9, n.1, 2008. ISSN 1518-5192.

EMBRAPA, 2021. Exportação de manga brasileira bate recorde em 2020, totalizando US\$ 246 milhões. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/60585117/exportacao-de-manga-brasileira-bate-recorde-em-2020-totalizando-us-246-milhoes#:~:text=social%20na%20regi%C3%A3o,-,Segundo%20informa%C3%A7%C3%B5es%20do%20Centro%20de%20Estudos%20Avan%C3%A7ados%20em%20Economia%20Aplicada,hectares%2C%20a%20maior%20do%20Brasil>.

FERMAM, R. K. S.; ANTUNES, A. M. de S. Uso de defensivos agrícolas, Limites máximos de resíduos e impacto no comércio internacional: estudo de caso. **Economia e Agronegócio**, v.7, n. 2, p. 197-214, 2009.

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

GUIMARÃES, Luis Fernando Lopes e COLLINS, Carol H. (1997). Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Introdução a métodos cromatográficos. 7ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP. p.183-238.

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

HIGSON, Séamus; SILVA, Mauro; SILVA, Denise de Oliveira. **Química Analítica**. Porto Alegre: Amgh, 2009. 451 p.

INDICE BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA -IBGE. **Produção de Manga**. Brasil: IBGE, 2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/manga/br>. Acesso em: 15 dez. 2021.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações para validação de métodos de ensaios químicos**, DOQ-CGCRE-008, Ver. 6, 2017.

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

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKÁ, 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 AOAC Internacional**, v.88, p. 615, 2005.

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.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO -MAPA. Programa Nacional de controle de Resíduos e Contaminantes – Resíduos e Contaminantes In, 2019. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos>>.

MARUTESCU, L; CHIFIRUC, M.C. Molecular mechanisms of pesticides toxicity. In: Grumezescu, A. (Ed.). **New Pesticides and Soil Sensors**. 1. Ed. Massachusetts: **Academic Press**, 2017, 792 p.

MASTOVSKA, K; LEHOTAY, S.J.J. *Chromatogr. A*, 1040: 259, 2004. NOLLET, L.M.L; RATHORE, H. S. (Ed.) **Handbook of Pesticides. Methods of Pesticide Residues Analysis**. CRC Press, Boca Raton, 2010.

OLIVEIRA, M.A.L.; PORTO, B.L.S.; VAZ, F.A.; SATO, R.T. **Planejamento de experimentos aplicado ao preparo de amostras**. (2015)

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

SANTÉ (2015) Guidance documento on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document n° SANTÉ/11945/2015.

SILVA, J. A. G.; WOHLBERG, M. D.; ARENHARDT, E. G.; OLIVEIRA, A. C.; MAZURKIEVICZ, G.; MÜLLER, M.; ARENHARDT, L. G.; BINELO, M. O.; ARNOLD, G.; PIETTRO, R. Adaptability and stability of yield and industrial grain quality with and without fungicide in Brazilian oat cultivars, **American Journal of Plant Sciences**, v.6, n. 9, p. 1560-1569, 2015.

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

STASHENKO, E. E.; MARTINEZ, J. R. GC-MS: Mas de un Analizador de Masas, para que? **Scientia chromatographica**, v.2, n. 4, p. 25-48, 2010.

Thompson, M., S.L.R. Ellison, and R. Wood, Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis - (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, 74(5): p. 835-855, 2002.

ZANELLA, R.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; MARTINS, M. L. QuEChERS. In: BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C (Org.). Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos, 1a ed., Rio de Janeiro: **LTC**, 2015a, p. 230-244.