

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

Maíra Casali Malonn

**MÉTODO MULTIRRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO DE
AGROTÓXICOS EM MAMÃO EMPREGANDO
QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

Santa Maria, RS

2022

Maíra Casali Malonn

**MÉTODO MULTIRRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM
MAMÃO EMPREGANDO QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

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

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, RS

2022

Malonn, Maíra Casali
Método Multirresíduo para Determinação de Agrotóxicos em
Mamão Empregando QuEChERS e UHPLC-MS/MS / Maíra Casali
Malonn.- 2022.
116 p.; 30 cm

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

1. QuEChERS 2. Preparo de amostra 3. Cromatografia
líquida 4. Agrotóxicos 5. Mamão I. Zanella, Renato II.
Título.

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

Declaro, MAÍRA CASALI MALONN, 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.

Maíra Casali Malonn

**MÉTODO MULTIRRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM
MAMÃO EMPREGANDO QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

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

Aprovada em 31 de outubro de 2022

Renato Zanella, Dr. (UFSM, orientador)

Aline Lima Hermes Müller, Dra. (UFSM)

Liziara da Costa Cabrera, Dra. (UFFS)

Santa Maria, RS

2022

DEDICATÓRIA

Dedico a minha família, ao meu Amor Fernando e aos que não estão mais neste plano meu tio Joel e meus avós Oldemar e Avelino.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella agradeço o apoio e pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) e por sempre estar disposto a ajudar e pelos seus ensinamentos e conselhos que me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente.

Aos demais professores do LARP, Martha e Osmar que sempre estiveram dispostos a me auxiliar durante esta jornada.

Aos meus pais Gilnei e Maristela por todo apoio e pelo incentivo em todos os momentos da minha vida.

A minha irmã Samara, obrigada por fazer parte da minha vida, pela amizade, carinho e apoio.

Ao Fernando, pelo amor e companheirismo. Sem o seu incentivo, apoio e compreensão eu não teria conseguido.

Agradeço aos meus amigos e colegas do LARP por toda ajuda, amizade, apoio e carinho, e pelo convívio e momentos de descontração.

A minha amiga Cleusa, pela amizade, apoio e pelo incentivo durante nessa caminhada.

Aos professores e secretários do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da UFSM, os quais auxiliaram na minha formação acadêmica e no apoio para as atividades do mestrado.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade e pelo ensino gratuito e de qualidade.

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por sempre estar presente em minha vida me protegendo e me guiando.

RESUMO

MÉTODO MULTIRRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM MAMÃO EMPREGANDO QuEChERS E UHPLC-MS/MS

AUTORA: Maíra Casali Malonn
ORIENTADOR: Prof. Dr. Renato Zanella

O mamão é a quarta fruta mais consumida no Brasil e a terceira fruta mais exportada pelo país. Em busca de melhores resultados na produção e maior resistência a doenças e pragas, os agrotóxicos têm seu uso disseminado na agricultura devido a sua eficácia no controle de pragas, porém o uso indiscriminado pode trazer prejuízos à saúde humana e ao meio ambiente. Este trabalho teve como objetivo o estabelecimento de método para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em mamão empregando o método QuEChERS e análise por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS). Os parâmetros analíticos que influenciam na eficiência de extração foram estudados e, após encontrar-se as melhores condições de extração, o método foi validado. A análise por UHPLC-MS/MS permitiu a determinação dos analitos com alta seletividade e detectabilidade. O método QuEChERS original modificado empregando o sorvente polimérico Strata SDB-L na etapa de limpeza do extrato foi validado para 110 compostos e apresentou valores adequados de exatidão, com recuperações entre 70 e 120%, e de precisão, com RSD <20%. Os limites de quantificação do método variaram de 5 a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e os limites de detecção de 1,5 a 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O método validado foi utilizado para a determinação de agrotóxicos em amostras comerciais de mamão, sendo encontrados 17 agrotóxicos de diferentes classes, inclusive 5 agrotóxicos não autorizados para mamão. Considerando os resultados obtidos, a utilização do método proposto demonstrou ser rápido e eficiente para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em mamão em análises de rotina.

Palavras-chave: mamão, agrotóxicos, preparo de amostra, QuEChERS, cromatografia líquida.

ABSTRACT

MULTIRESIDUE METHOD FOR DETERMINATION OF PESTICIDES IN PAPAYA USING QuEChERS AND UHPLC-MS/MS

AUTHOR: Maíra Casali Malonn
ADVISOR: Prof. Dr. Renato Zanella

Papaya is the fourth most consumed fruit in Brazil and the third most exported fruit by the country. In search of better results in production and greater resistance to diseases and pests, pesticides have their widespread use in agriculture due to their effectiveness in pest control, but indiscriminate use can harm human health and the environment. This work aimed to establish a method for the multiresidue determination of pesticides in papaya using the QuEChERS method and analysis by ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). The parameters that influence the extraction efficiency were studied and, after finding the best extraction conditions, the method was validated. The analysis by UHPLC-MS/MS allowed the determination of analytes with high selectivity and detectability. The original modified QuEChERS method employing the polymeric sorbent Strata SDB-L in the extract cleaning step was validated for 110 compounds and presented adequate values of accuracy, with recoveries between 70 and 120%, and precision, with RSD <20%. The method limits of quantification ranged from 5 to 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and detection limits from 1.5 to 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The validated method was used for the determination of pesticides in commercial papaya samples, and 17 pesticides of different classes were found, including five pesticides not authorized for papaya. Considering the results obtained, the use of the proposed method proved to be fast and efficient for the multiresidue determination of pesticides in papaya in routine analysis.

Keywords: papaya, pesticides, sample preparation, QuEChERS, liquid chromatography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cultivares de mamão com frutos de diferentes cores, formatos e tamanhos.	22
Figura 2 – Destino da exportação da produção brasileira de mamão papaia em 2021	25
Figura 3 – Método QuEChERS, original, acetato e citrato	45
Figura 4 – Cromatograma de íons totais obtido por UHPLC-MS/MS a partir de uma solução padrão $10 \mu\text{g L}^{-1}$ preparada na matriz de mamão.	79
Figura 5 – Extratos obtidos após utilização de diferentes sorventes na etapa de limpeza, em ordem visual de remoção dos pigmentos.	83
Figura 6 – Quantidade de compostos que apresentaram recuperações satisfatórias (70-120% e $\text{RSD} \leq 20\%$), dos 110 agrotóxicos avaliados, obtidos através da limpeza de extrato por diversos sorventes.	84
Figura 7 – Estrutura do sorvente Strata SDB-L	85
Figura 8 – Procedimento QuEChERS validado, envolvendo etapas de extração, partição e diluição dos extratos	86
Figura 9 – Cromatograma de íon total do composto azoxistrobina, obtidos para solução analítica no extrato da matriz (em lilás) na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e “branco” da amostra mamão (em vermelho), obtido por UHPLC- MS/MS.....	88
Figura 10 – Gráfico representativo do efeito matriz ao comparar as curvas em solvente (acetonitrila) e na matriz (mamão), para os compostos carbendazim e deltametrina.....	89
Figura 11 – Cromatograma comparativo entre a amostra A13 contaminada com resíduo de tiofanato metílico ($0,060 \text{ mg kg}^{-1}$) e o seu LOQ ($0,005 \text{ mg kg}^{-1}$).	98
Figura 12 – Cromatograma comparativo entre a amostra A6 contaminada com resíduo de azoxistrobina ($0,202 \text{ mg kg}^{-1}$) e o seu LOQ ($0,005 \text{ mg kg}^{-1}$).	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela de Área cultivada x Produção x Rendimento dos estados brasileiros.	24
Tabela 2 – Tabela TACO de composição de mamão cru por 100 g de parte comestível: centesimal, minerais, vitaminas e colesterol	27
Tabela 3 – Classificação toxicológica dos agrotóxicos.....	32
Tabela 4 – Ingredientes ativos com o ranking de vendas aproximadas no Brasil	34
Tabela 5 – Compostos registrados no Brasil para uso na cultura de mamão– Limite Máximo de Resíduo (LMR), mg kg ⁻¹ estabelecidos de acordo com a ANVISA, União Europeia e Codex Alimentarius.....	36
Tabela 6 – Revisão dos métodos de preparo de amostra e condições cromatográficas empregadas na determinação de resíduos de agrotóxicos em mamão e outras matrizes de origem vegetal.....	41
Tabela 7 – Amostras de mamão avaliadas no presente estudo, sua variedade e origem de coleta.....	59
Tabela 8 – Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido e propriedades físico-químicas.....	61
Tabela 9 - Gradiente de fase móvel utilizado na determinação de resíduos de agrotóxicos em mamão por UHPLC-MS/MS.....	67
Tabela 10 – Condições cromatográficas do sistema UHPLC-MS/MS.....	67
Tabela 11 - Testes realizados para análise dos compostos selecionados para análise de resíduos de agrotóxico em mamão	70
Tabela 12 – Parâmetros de métodos analíticos avaliados na validação do método, com respectivas formas de aplicação, equações (quando aplicável) e critérios de aceitação.....	73
Tabela 13 - Compostos determinados por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos tempos de retenção (t _R), voltagem do cone (VC), íons precursores e produto, e energias de colisão (EC) utilizados.	75
Tabela 14 - Resumo dos resultados dos ensaios de fortificação em cada versão do método QuEChERS (T1: original, T2: acetato e T3: citrato), para 110 agrotóxicos avaliados.....	80

Tabela 15- Comparação do efeito matriz (%), por faixa percentual e calculado nos métodos QuEChERS (T1: original, T2: acetato e T3: citrato), para os 110 agrotóxicos avaliados.	82
Tabela 16 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS: LOQ, LOD, linearidade (coeficiente de determinação, r^2), exatidão e precisão em termos de repetitividade e precisão intermediária e efeito matriz (EM).	92
Tabela 17 – Resíduos de agrotóxicos, em mg kg^{-1} , encontrados nas amostras de mamão analisadas através do método validado, utilizando QuEChERS e UHPLC-MS/MS.	100
Tabela 18 – Resultados da análise de 18 amostras comerciais de mamão, em relação a concentração encontrada, limite de quantificação do método (LOQ) e o limite máximo de resíduos (LMR) permitidos pela ANVISA, UE e Codex Alimentarius.	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AGROFIT	Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação de Químicos Analíticos Oficiais, do inglês <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
C18	Octadecilsilano
CGAA	Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins
CMD	Concentração média determinada
CTM	Curva de trabalho na matriz
CTS	Curva de trabalho no solvente
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detecção por arranjo de diodos, do inglês <i>diode array detection</i>
DAS	Secretaria da Defesa Agropecuária
DFIA	Departamento de Fiscalização de Insumos Agrícolas
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DQ-UFSM	Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva, do inglês <i>dispersive solid phase extraction</i>
EC	Comissão Europeia, do inglês <i>European Commission</i>
EC	Energia de colisão
EM	Efeito matriz
ESI	Ionização por eletronebulização, do inglês <i>electrospray ionization</i>
FA	Fortificação na amostra
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês <i>Food and Agriculture Organization</i>
FL	Fluorescência
GC	Cromatografia gasosa, do inglês <i>gas chromatography</i>
GCB	Carbono grafitizado, do inglês <i>graphitized carbon black</i>
GC-MS/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês <i>gas chromatography coupled to tandem Mass spectrometry</i>

HAc	Ácido acético
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LARP	Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas
LC	Cromatografia líquida, do inglês <i>liquid chromatography</i>
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês <i>liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i>
LLE	Extração líquido-líquido, do inglês <i>liquid-liquid extraction</i>
LMR	Limite máximo de resíduos
LOD	Limite de detecção, do inglês <i>limit of detection</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>limite of quantification</i>
MAE	Extração assistida por micro-ondas, do inglês <i>microwave assisted extraction</i>
MAPA	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MASE	Extração com membrana assistida por solvente, do inglês <i>membrane-assisted solvent extraction</i>
MS	Espectrometria de massas, do inglês <i>mass spectrometry</i>
MS/MS	Espectrometria de massas em série, do inglês <i>tandem mass spectrometry</i>
MSPD	Dispersão da matriz em fase sólida, do inglês <i>matrix solid phase dispersion</i>
ONU	Organização das Nações Unidas, do inglês <i>United Nations Organization</i>
PA	Padrão na amostra
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PC	Padrão de controle
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Padrão interno

PLE	Extração acelerada por solventes, do inglês <i>pressurized liquid extraction</i>
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PSA	Amina primária secundária, do inglês <i>primary secondary amine</i>
QqQ	Triplo quadrupolo
QuEChERS	Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, acrônimo do inglês <i>quick, easy, cheap, effective, rugged and safe</i>
r	Coeficiente de correlação
r ²	Coeficiente determinação
rpm	Rotações por minuto
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>relative standard deviation</i>
SEFAGs	Serviços de Fiscalização Agropecuária
SIM	Monitoramento de íon selecionado, do inglês <i>selected ion monitoring</i>
SPE	Extração em fase sólida, do inglês <i>solid phase extraction</i>
SPME	Microextração em fase sólida, do inglês <i>solid phase microextraction</i>
SRM	Monitoramento de reações selecionadas, do inglês <i>selected reaction monitoring</i>
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TIC	Cromatograma de íons totais
t _R	Tempo de retenção
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência, do inglês <i>ultra-high performance liquid chromatography</i>
UV/Vis	Ultravioleta/visível
VC	Voltagem do cone

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 OBJETIVOS	20
1.1.1 Objetivos Específicos	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 MAMÃO.....	21
2.1.3 Produção de Mamão no Brasil	23
2.1.4 Composição fitoquímica do mamão	25
2.2 AGROTÓXICOS.....	29
2.2.1 Resíduos de agrotóxicos	30
2.2.2 Classificação dos agrotóxicos	31
2.2.3 Risco toxicológico	32
2.2.4 Uso e fiscalização dos agrotóxicos	33
2.2.5 Monitoramento dos resíduos de agrotóxicos em alimentos	34
2.3 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MAMÃO	38
2.3.1 Método QuEChERS	43
2.4 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS.....	46
2.4.1 Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência	49
2.4.2 Espectrometria de massas	49
2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	51
2.5.1 Seletividade	52
2.5.2 Linearidade, sensibilidade e curva analítica	52
2.5.3 Faixa de trabalho	53
2.5.4 Efeito matriz	53
2.5.5 Limite de detecção	54
2.5.6 Limite de quantificação	54

2.5.7 Exatidão	54
2.5.8 Precisão	55
3 MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1 INSTRUMENTAÇÃO	56
3.2 REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS.....	57
3.3 AMOSTRAS DE MAMÃO.....	59
3.4 COMPOSTOS SELECIONADOS E PREPARO DE SOLUÇÕES ANALÍTICAS .	60
3.5 UTILIZAÇÃO DO PADRÃO INTERNO (PI) E PADRÃO DE CONTROLE (PC) ..	66
3.6 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MAMÃO	66
3.6.1 Escolha da fase móvel	66
3.6.2 Condições utilizadas no sistema UHPLC-MS/MS	67
3.7 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MAMÃO UTILIZANDO UHPLC-MS/MS	68
3.7.1 Testes iniciais	68
3.7.2 Avaliação do uso de sorventes na etapa de limpeza	69
3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MAMÃO	72
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MAMÃO	75
4.2 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MAMÃO	80
4.2.1 Avaliação do método de preparo de amostras	80
4.2.3 Avaliação dos sorventes utilizados na etapa de limpeza do extrato	82
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO.....	85
4.3.1 Seletividade	87
4.3.2 Linearidade e faixa de trabalho	88

4.3.3 Sensibilidade	88
4.3.4 Efeito matriz.....	89
4.3.5 Limite de detecção e de quantificação	90
4.3.6 Exatidão e precisão.....	91
4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO EM AMOSTRAS COMERCIAIS.....	97
5 CONCLUSÃO	102
6 DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS.....	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

1 INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são empregados em inúmeras culturas e constituem diversos tipos de resíduos e contaminantes orgânicos que podem estar presentes em vários alimentos cultivados. O uso de agrotóxicos de diferentes classes (herbicidas, inseticidas, fungicidas, acaricidas, entre outros) na agricultura apresentam benefícios econômicos, uma vez que asseguram o controle e o combate de pragas e doenças, protegendo a qualidade da produção. Por outro lado, os consumidores podem ser expostos a estes compostos químicos através dos alimentos (BASSO *et al.*, 2022).

O mamoeiro é originário da América Tropical e pertence à família Caricaceae. É uma planta herbácea, vigorosa e com alta produtividade, típica de clima tropical e bem adaptada ao clima do Nordeste brasileiro (MELO FILHO *et al.*, 2007), sendo o mamão *Carica papaya* L. o mais cultivado comercialmente nas regiões tropicais. A base genética da cultura no Brasil concentra-se em poucas variedades que pertencem aos grupos Solo e Formosa, ambos comercializados no mercado interno e externo (SILVA *et al.*, 2011). O mamão possui grande importância para o agronegócio brasileiro e apresenta como principais estados produtores a Bahia e o Espírito Santo, e estes contribuem com 71% da produção nacional da fruta; sendo com uma parcela de 794,565 e 399,790 toneladas na produção, respectivamente (IBGE, 2021).

Com o objetivo de garantir a qualidade dos alimentos, são estabelecidos níveis seguros para a presença de agrotóxicos nos alimentos, estes são chamados de Limites Máximos de Resíduos (LMRs). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) utiliza como referência os Estados Unidos e a União Europeia (ANVISA, 2019b). O mamão possui LMRs estabelecidos para diversas classes de agrotóxicos, como por exemplo, inseticidas, herbicidas e fungicidas (ANVISA). 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 multirresíduo de agrotóxicos em diversas matrizes alimentares. Os LMRs são detectados e quantificados em concentrações de mg kg^{-1} , para que isto ocorra é necessária a utilização de técnicas que apresentem baixos limites de detecção (LOD) (ANVISA, 2017).

O método de preparo de amostras QuEChERS (acrônimo do inglês para *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*), que foi proposto por ANASTASSIADES *et*

al. (2003), tem sido amplamente utilizado para determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos. Este método é largamente estudado porque possui inúmeras vantagens, dentre elas podemos citar: utilização de menor quantidade de solvente orgânico, facilidade de execução e etapa de limpeza do extrato, entre outras características. O método permite que os extratos obtidos possam ser analisados através da técnica de cromatografia líquida, bem como pela de cromatografia gasosa (PRESTES *et al.*, 2011).

A cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*) atende as concentrações necessárias para detecção e quantificação destes limites ($\mu\text{g L}^{-1}$ e $\mu\text{g kg}^{-1}$) e possibilita a determinação simultânea de um grande número de compostos e com excelentes resultados de detectabilidade e tempo de análise reduzido quando comparada a técnicas convencionais (CHIARADIA *et al.*, 2008).

Considerando os prejuízos causados pelo excesso de agrotóxicos, tanto para saúde humana quanto para o meio ambiente, este estudo foi desenvolvido tendo como modelo uma espécie amplamente consumida, o *Carica papaya*. Neste sentido, desenvolveu-se um método de preparo de amostra para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em mamão empregando método QuEChERS modificado e UHPLC-MS/MS. O método foi validado para 110 compostos e aplicado em 18 amostras de diferentes mercados na cidade de Santa Maria - RS.

1.1 OBJETIVOS

Considerando a importância da etapa do preparo de amostra, este trabalho teve como objetivo geral avaliar as diferentes versões do método QuEChERS e as possíveis modificações para determinação multirresíduo de agrotóxicos em mamão utilizando o sistema UHPLC-MS/MS para as análises.

1.1.1 Objetivos Específicos

- I. Avaliar diferentes versões do método QuEChERS original, acetato e citrato visando encontrar as melhores condições de extração dos analitos selecionados;
- II. Avaliar diferentes sorventes na etapa de limpeza visando minimizar a presença de coextrativos e sem interferir na recuperação dos analitos;
- III. Validar o método desenvolvido, avaliando: curva analítica, linearidade, efeito matriz, precisão, exatidão e limites de quantificação e detecção.
- IV. Aplicar o método desenvolvido e validado na determinação de resíduos de agrotóxicos em mamão para amostras comerciais provenientes de diferentes estabelecimentos da cidade de Santa Maria - RS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MAMÃO

O mamoeiro pertence ao reino Plantae, Magnoliophyta (ou Angiospermae), classe Magnoliopsida (ou Eudicotyledoneae), ordem Brassicales e família Caricaceae (ZOU *et al.*, 2022). A família Caricaceae é constituída por 35 espécies, as quais estão organizadas em seis gêneros: *Jacaratia* (7 espécies), *Jarilla* (3 espécies), *Cylicomorpha* (2 espécies), *Horovitzia* (1 espécie), *Vasconcellea* (21 espécies) e *Carica* (1 espécie, cultivada comercialmente) (VAN DROOGENBROECK *et al.*, 2002). A espécie *Carica papaya L.*, que possui valor comercial, apresenta as sinonímias *Carica sativa Tussac*, *Papaya carica Gaertn.*, *Papaya edulis Bojer* e *Carica papaya L.* (PANIAGUA-ZAMBRANA *et al.*, 2020).

O mamoeiro (*Carica papaya L.*) é uma das espécies vegetais mais comuns em quase todos os países da América Tropical, sendo descoberto pelos espanhóis na região compreendida entre o sul do México e o norte de Nicarágua. Após a descoberta, o mamoeiro foi amplamente distribuído em várias regiões tropicais, estendendo-se a 32° de latitude norte e sul, com possível introdução no Brasil em 1587 (SERRANO *et al.*, 2010).

A ocorrência da espécie *Carica* no Brasil está distribuída em todos os estados do Brasil (SANTANA *et al.*, 2004). Até o ano de 1970, o mamão era cultivado somente em São Paulo. Entre 1975 e 1976 a cultura migrou para outras regiões do País, tais como o nordeste do Pará, o Extremo Sul da Bahia e o Norte do Espírito Santo. Nos anos seguintes, chegou a Goiás (1980), Pernambuco (1995), Ceará (1998), Rio Grande do Norte (fim da década de 1990) e Janaúba, MG (2001) (RUGGIERO *et al.*, 2011).

O mamão é um fruto carnoso, grande, indeiscente, com polpa macia, densa, aromática e de coloração variável entre o amarelo e o vermelho. Sua casca é lisa e fina, verde na ocasião da colheita e que se torna gradativamente amarela ou alaranjada com o amadurecimento. A cavidade interna do fruto contém numerosas sementes pretas, comestíveis, de sabor picante, revestidas por uma substância mucilaginosa (COSTA *et al.*, 2003).

O mamão é um fruto climatérico cujas transformações resultantes do amadurecimento ocorrem rapidamente após a colheita do fruto fisiologicamente

maduro que são desencadeadas pela produção do etileno e aumento da taxa respiratória. Isto caracteriza os frutos de mamão do grupo 'Solo' (principalmente 'Golden' e 'Golden THB' para exportação e 'Sunrise Solo' para o mercado nacional) (SERRANO, 2010). A cultura do mamão possui grande importância na fruticultura nacional e o Brasil se destaca como segundo produtor mundial da fruta, com uma produção de 1,06 milhão de toneladas em uma área de 26 mil hectares (FAO, 2017).

No Brasil existem duas variedades principais de mamões, as da variedade solo que são conhecidas popularmente como mamão papaia (*Carica papaya* variedade solo), e as do grupo formosa (*Carica papaya* variedade formosa), também conhecidas como mamão formosa (EMBRAPA, 2021). Mas existem no mercado vários cultivares de mamão com frutos de diferentes cores, formatos e tamanhos, como apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Cultivares de mamão com frutos de diferentes cores, formatos e tamanhos.



Fonte: Balcon Garden Web (2022).

As cultivares do grupo solo são geneticamente mais uniformes e apresentam linhagens puras fixadas por sucessivas gerações de autofecundação e possuem peso médio de seus frutos entre 425 a 625 g. Dentre essas cultivares destaca-se: *Sunrise Solo* e *Improved Sunrise Solo cv. 72/12*, *Sunrise Golden*, *Kapoho Solo*, *Waimanalo*, *Higgins* e *Baixinho de Santa Amália* (COSTA *et al.*, 2003). Os híbridos do grupo Formosa são importados de Formosa ou de Taiwan, sendo o mamão '*Tainung 1*' o

principal híbrido desse grupo. Este é produto do cruzamento da linhagem *Sunrise Solo* com uma linhagem de mamão da Costa Rica que possui polpa vermelha. Os seus frutos comerciais são alongados com peso variando de 900 a 1100 g e coloração da casca verde-clara e polpa laranja-avermelhada (PATERNINA *et al.*, 2021).

O mamão é uma fruta tropical bastante consumido *in natura*, mas pode ser utilizado na fabricação de polpa, compota, geleia e outros. Consumida principalmente durante o café da manhã ou como sobremesa, quando processada, é servida na forma de suco, vitamina e doce cristalizado, por ser uma fruta de excelente sabor e indicada como alimento saudável, o mamão tem demonstrado uma demanda crescente do mercado consumidor (VERAS *et al.*, 2022).

2.1.3 Produção de Mamão no Brasil

O Brasil é um grande produtor e exportador de frutas, a produção de frutas *in natura* no país segue superior a 40 milhões de toneladas por ano e o volume pode variar de 44,3 a 44,5 milhões de toneladas no ano de 2020 (ABRAFRUTAS, 2021). Ainda, no ano de 2020, o mercado brasileiro bateu seu recorde, exportando mais de um milhão de toneladas de frutas frescas e derivados, sendo que os principais destinos foram os Países Baixos, Estados Unidos da América e o Reino Unido (ABRAFRUTAS, 2021).

Dentre as frutas que merecem destaque no mercado nacional está o mamão. No Brasil, historicamente, o cultivo do mamoeiro com expressão comercial passou a ser registrado a partir da década de 1970, principalmente nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Pará. A partir da década de 1990, a expansão da cultura ocorreu por razões muito mais comerciais do que fitossanitárias. Assim, a maior proximidade do mercado consumidor nacional determinou a difusão para os municípios de Petrolina – PE e Jaíba - MG. Da mesma forma, a maior proximidade do mercado norte-americano foi determinante para a expansão da cultura nos estados do Ceará e do Rio Grande do Norte, possibilitando grande aumento das exportações marítimas de mamão para os Estados Unidos no fim da década de 1990 (RUGGIERO *et al.*, 2011).

De 2001 a 2018, a área colhida com mamão vem ocupando, em média, 33 mil hectares em todo o País. A produção é de 1,6 milhão de toneladas e a produtividade média de 47 t ha⁻¹. No Nordeste brasileiro, existem cerca de 20,2 mil hectares que produzem cerca de 1,0 milhão de toneladas, com produtividade média de 48 t ha⁻¹. Na

região Sudeste, os plantios ocupam 9,2 mil hectares, entretanto a produção é de 568,3 mil toneladas e a produtividade em torno de 61 t ha⁻¹ (IBGE, 2017). Isso indica maiores índices tecnológicos nos cultivos ali existentes. No ano de 2019, a produção de mamão no Brasil atingiu pouco mais de 1.235.003 toneladas. Com o passar dos anos, entre 2020 e 2021 a cultivar figurou entre as cinco frutas mais produzidas no país (EMBRAPA, 2021). A Tabela 1 apresenta os dados de produção, rendimento e área cultivada dos estados brasileiros no ano de 2021.

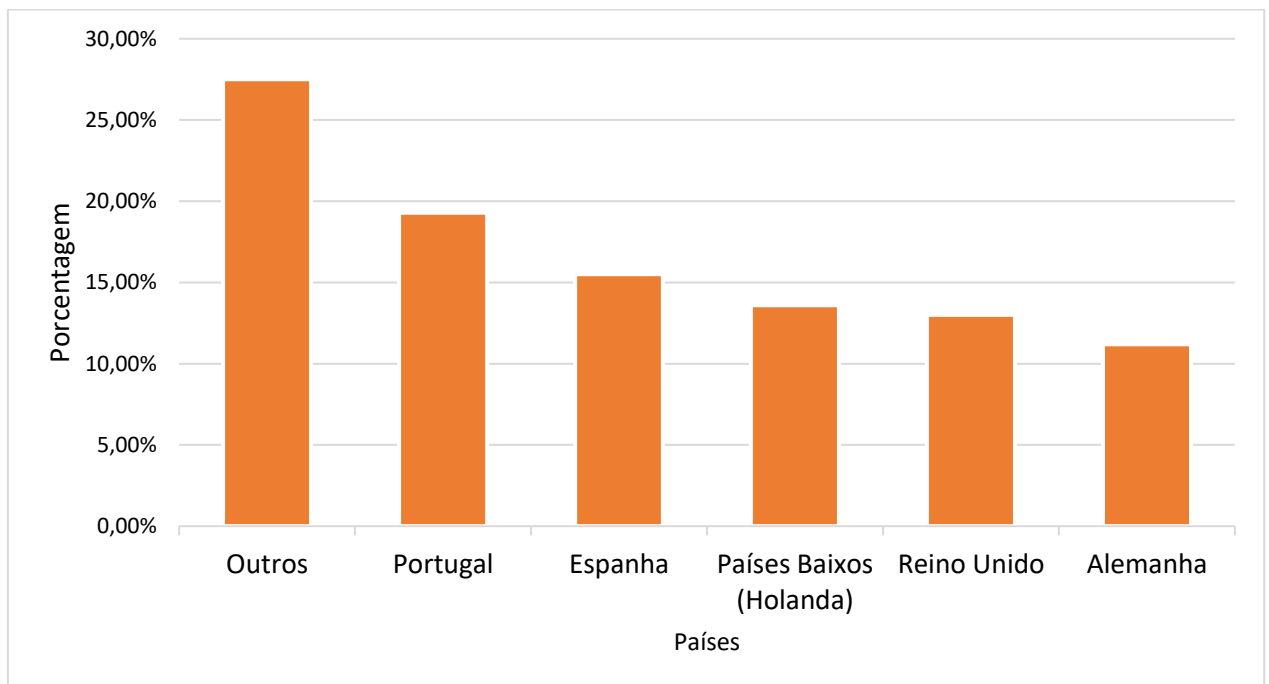
Tabela 1 – Tabela de Área cultivada x Produção x Rendimento dos estados brasileiros.

Estados	Área colhida (hectares)	Produção (toneladas)	Rendimento (toneladas/hectare)
Espírito Santo	7.309	438.855	60,04
Bahia	9.579	368.109	38,43
Ceará	2.067	152.558	73,81
Rio Grande do Norte	2.254	94.437	41,90
Minas Gerais	1.241	50.837	40,96
Paraíba	734	24.883	33,90
Alagoas	746	19.551	26,21
Amazonas	953	18.643	19,56
Pará	1.085	16.743	15,43
São Paulo	360	13.486	37,46
Pernambuco	461	7.052	15,30
Mato Grosso do Sul	135	5.915	43,81
Rondônia	279	5.652	20,26
Mato Grosso	129	3.502	27,15
Acre	265	3.170	11,96
Roraima	276	2.828	10,25
Maranhão	122	2.006	16,44
Paraná	88	1.707	19,40
Sergipe	69	1.518	22,00
Goiás	63	1.440	22,86
Amapá	95	767	8,07
Rio Grande do Sul	96	756	7,88
Piauí	14	217	15,50
Tocantins	20	214	10,70
Distrito Federal	8	120	15,00
Rio de Janeiro	2	37	18,50
Santa Catarina	-	-	-
Brasil	28.450	1.235.003	43,41

Fonte: EMBRAPA, 2021.

Atualmente, os principais estados brasileiros produtores de mamão são o Espírito Santo e a Bahia, os quais contribuem com cerca de 65% da produção nacional da fruta. Os estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Minas Gerais surgem como polos emergentes, participando com 21,82% da produção; e os demais estados, com os 12,97% restantes. Entre os maiores mercados de exportação de mamão *Carica papaya* estão Portugal e Espanha, conforme a Figura 2 (EMBRAPA, 2021).

Figura 2 – Destino da exportação da produção brasileira de mamão papaia em 2021



Fonte: Adaptação EMBRAPA, 2021.

2.1.4 Composição fitoquímica do mamão

O mamão é um fruto bastante apreciado devido às suas qualidades organolépticas. Sabe-se que durante o amadurecimento de seus frutos, os teores de açúcares do mamão aumentam e a concentração de ácidos diminui, outra mudança é a redução da firmeza dos mamões em função do amolecimento causado pela progressiva transformação das protopectinas (formas menos solúveis) em pectinas ou ácido pécico (formas mais solúveis) (SANTANA *et al.*, 2004).

Em frutos maduros, o teor de sólidos solúveis varia de 10 a 14 °Brix, e é uma das principais características utilizadas para avaliar a qualidade dos frutos. Os principais açúcares presentes no mamão são a glicose, a frutose e a sacarose. O teor

de açúcares totais médios da polpa é de 11,79 g 100 g⁻¹ e o de redutores 10,75 g 100 g⁻¹ (RUGGIERO *et al.*, 2011).

O teor de acidez do mamão é baixo, entre 0,04% e 0,14%, o que contribui para que seu pH seja relativamente alto, entre 5,0 e 5,9 (REIS *et al.*, 2015). Os principais ácidos orgânicos são o cítrico, o málico e o fumárico. No fruto imaturo é extraída a papaina, uma enzima alcalóide utilizada nas indústrias têxteis, farmacêuticas, de alimento e de cosmético (OLIVEIRA, 2014).

Seus frutos, conhecidos como mamão ou papaya, são excelentes fontes de cálcio, pró-vitamina A e vitamina C (ácido ascórbico) e por este motivo são amplamente utilizados em dietas alimentares (SERRANO *et al.*, 2010). É uma fruta excelente do ponto de vista nutricional, tendo em vista que constitui uma fonte importante de carotenóides, vitamina C e sais minerais com ação antioxidante (DE AMORIM TOMAZ *et al.*, 2021). O mamão constitui também importante fonte de compostos bioativos, dentre eles os carotenoides (β -caroteno, o licopeno e a β -criptoxantina) e os compostos fenólicos (miricetina, fisetina, morina, quercetina, kaempferol e isorametina). Além de atuarem como antioxidantes, estes compostos contribuem para as características organolépticas do fruto, tais como cor, sabor e textura (REIS *et al.*, 2015).

O mamão é uma importante fonte de proteínas, fibras, minerais, carboidratos, carotenoides, compostos fenólicos e vitaminas. A fruta ainda apresenta baixo índice calórico e diversos nutrientes, onde se destacam minerais como potássio, magnésio, cálcio, ferro, manganês, zinco e cobre (MORAES *et al.*, 2022). A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) - apresenta a composição centesimal do mamão apresentado na Tabela 2, a seguir. Em média, cada fruta possui 88,5% de umidade, também são encontrados proteínas e lipídeos, em pequenas quantidades. Na tabela ainda é possível verificar o teor de carboidratos, que constitui em média 10,4 g a cada 100 g de fruta, o teor de fibras alimentares e de diversos minerais (TACO, 2011).

Tabela 2 – Tabela TACO de composição de mamão cru por 100 g de parte comestível: centesimal, minerais, vitaminas e colesterol

Nutrientes	Quantidade	VD*(%)
Valor energético	40,2 kcal	2
Umidade	88,51%	-
Carboidratos	10,4 g	3
Proteínas	0,5 g	1
Fibra Alimentar	1,0 g	4
Cálcio	22,4 mg	2
Vitamina C	82,2 mg	183
Manganês	0 mg	0
Magnésio	22,2 mg	9
Lipídios	0,1 g	-
Fósforo	10,7 mg	2
Ferro	0,2 mg	1
Potássio	126,2 mg	-
Cobre	0 mg	0
Zinco	0,1 mg	1
Niacina	1,0 mg	6
Tiamina B1	0 mg	0
Riboflavina B2	0 mg	0
Sódio	1,6 mg	0

Fonte: TACO (2011). * % Valores diários com base em dieta de 2.000 kcal

A cultivar ainda possui uma enorme variedade de antioxidantes, principalmente vitaminas antioxidantes, como os carotenoides (VINHA *et al.*, 2012). A maior parte dos fitonutrientes estão presentes nas folhas do mamão e nos frutos verdes e maduros. O mamão é adorado entre todas as outras frutas por sua tiamina, folato, riboflavina, niacina, vitaminas A, B1, B2 e C e teor de fibras. Ele não tem teor de gordura e proteína e, portanto, é baixo em calorias (valor energético: 40 kcal/100 g).

Os principais açúcares incluem glicose (29,8 g/100 g), sacarose (48,3 g/100 g) e frutose (21,9 g/100 g). Na composição química do mamão há a presença de elementos essenciais, como potássio (223 mg), sódio (8 mg), fósforo (10 mg), cálcio (20 mg), ferro (0,25 mg), zinco (0,08 mg), cobre (0,05 mg), manganês (0,04 mg) e magnésio (21 mg) por 100 g de fruta fresca madura. O mamão também contém folato (37 µg), tiamina (0,023 mg), riboflavina (0,027 mg), niacina (0,357 mg), ácido pantotênico (0,191 mg) e macular carotenóides (1,2-6,4 mg), como β-caroteno e β-

criptoxantina, juntamente com os principais pigmentos, como licopeno (5,7 mg) por 100 g de frutas frescas (KOUL *et al.*, 2022).

O seu aroma típico do mamão é caracterizado pela variedade de compostos voláteis e sabe-se que estas concentrações variam de acordo com as diferentes cultivares. Já foram identificados mais de 300 voláteis em mamão, entretanto somente alguns compostos são responsáveis pelo aroma dos frutos. Nas cultivares Sunrise Solo e Formosa, os compostos linalol, óxido cis linalol, óxido trans linalol e butanoato de metila foram detectados em maiores quantidades (WIJAYA *et al.*, 2013).

A presença de compostos voláteis no mamão, como álcoois, terpenos, aldeídos, ácidos orgânicos, cetonas, ésteres e isotiocianato de benzila, é responsável por suas características sensoriais, como aroma e sabor. Porém, o hexanoato de etila, 2-metil butanoato de etila e acetato de etila estão ligados ao aroma da fruta. O linalol é o componente volátil mais prevalente em 94% das variedades de mamão solo. Os produtos químicos aromáticos tais como: butanol e 3-metil butanol são abundantes durante o estágio maduro; enquanto o butirato de metila é o mais abundante dos 103 ésteres presentes no mamão (KOUL *et al.*, 2022).

Os fitoquímicos são relatados nas diversas partes da planta do mamão, incluindo as raízes, casca, folhas, frutas, látex de frutas, suco e sementes. No mamão existem um total de 166 compostos voláteis e não voláteis pertencentes às classes químicas de terpenóides, flavonóides, alcalóides, carotenóides, vitaminas e glicosídeos têm sido relatados. Nas análises de LC-MS com vários extratos das plantas do mamão revelaram a presença de sinapic ácido-O-hexosídeo, cianeto-3-O-glicose, 5-hidroxi cafeico ácido quínico, 5-hidroxi feruloil ácido quínico, acetil p-cumaril ácido quínico, quercetina-3-O-ramnosídeo, siríngico hexosídeo ácido, peonidina-3-O-glicosídeo e metilferuloil glicosídeo (HABER *et al.*, 2022).

Os pesquisadores (SANCHO *et al.*, 2011) usaram HPLC-MS para determinar a presença de vitamina C, fenóis e carotenóides na polpa e casca do mamão. Os carotenóides e ésteres foram analisados pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD-MS/MS) e por métodos espectrofotométricos. Os principais carotenóides encontrados em óleos ricos em carotenóides foram: licopeno, (13Z)-licopeno, β -caroteno, (E)- β -criptoxantina e ésteres de xantofila como (E)- β - caprato de criptoxantina, laurato de (E)- β -criptoxantina e miristato de (E)- β -criptoxantina (CANINI, 2007; LARA-ABIA *et al.*, 2021).

2.2 AGROTÓXICOS

De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO), Programa da Organização das Nações Unidas (ONU), responsável pelas áreas de agricultura e alimentação, os agrotóxicos são definidos como qualquer substância ou mistura de substâncias, utilizada com a finalidade de prevenir, destruir ou controlar qualquer praga, como vetores de doenças humanas e animais, espécies indesejadas de plantas ou animais, causadoras de danos a produção, processamento, estocagem, transporte ou distribuição de alimentos, produtos agrícolas, madeira e derivados, ou que deva ser administrada para o controle de insetos, aracnídeos e outras pestes que acometem os corpos de animais de criação (FAO, 2005).

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com seu emprego, quanto à composição química e a toxicidade. No Brasil, como definição, a referência faz-se através do decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, conceitua agrotóxicos sendo:

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

O processo produtivo agrícola brasileiro está cada vez mais dependente dos agrotóxicos e fertilizantes químicos. Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos. A tendência do crescimento nas áreas de produção no Brasil e das exportações brasileiras de mamão requer atenção redobrada dos fruticultores no uso correto dos agrotóxicos. Isto é bem relevante tendo em vista que há monitoramento constante do limite máximo de resíduo (LMR) aceitável, bem como da proibição do uso de determinados princípios ativos, que é feita pelos países importadores (CARNEIRO, 2015).

2.2.1 Resíduos de agrotóxicos

Existem variados tipos de resíduos e contaminantes orgânicos que podem estar presentes em alimentos. O *Codex Alimentarius* é uma agência que faz parte da FAO e o órgão que atribui uma classificação para o termo resíduo em alimentos, que é descrito a seguir: Resíduo é definido como a fração de uma substância, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento proveniente de produtos agrícolas e/ou animais tratados com estas substâncias. Estes produtos normalmente são oriundos de conversão e da degradação de metabólitos, produtos de reação e impurezas, que são consideradas tóxicas e ambientalmente significativas (CODEX ALIMENTARIUS, 2010).

Quando boas práticas para a utilização de agrotóxicos não são utilizadas ocorrem o aparecimento de resíduos em níveis acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR), podendo representar risco à saúde humana. Inúmeros estudos demonstraram que estes riscos estão estritamente correlacionados com o desrespeito às instruções de uso do fabricante, tais como: indicação de uso para a espécie alvo, dosagem, via de administração e período de carência que estão contidas na bula dos agrotóxicos (PRESTES *et al.*, 2011).

A regulamentação sobre os LMRs compreende a avaliação da compatibilidade e adequação dos limites adotados pelos países com as referências internacionais aceitas, ou seja, com os limites necessários para garantir a segurança no seu consumo, de acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) (CODEX ALIMENTARIUS, 2017). Os Limites Máximos de Resíduos (LMR) são estabelecidos levando em conta valores provenientes de experimentos de campo além da Ingestão Diária Aceitável (IDA), ou seja, a quantidade máxima de resíduos que ingerida diariamente durante toda a vida não oferece risco à saúde, pelos conhecimentos atuais (CARNEIRO, 2015).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável pela avaliação do impacto dos agrotóxicos na saúde humana e pelo estabelecimento dos LMR (ANVISA, 2011). No entanto, os países que não dispõem de sistema organizado de registro de agrotóxico adotam os limites instituídos pelo CCPR (Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos, 2011).

2.2.2 Classificação dos agrotóxicos

A classificação mais usual dos agrotóxicos é de acordo com o tipo de praga que controlam, sendo alguns exemplos: herbicidas, fungicidas, acaricidas, moluscidas e inseticidas. Existem agrotóxicos utilizados para combater insetos (inseticidas), plantas daninhas (herbicidas), fungos (fungicidas), ácaros (acaricidas), moluscos (moluscocidas), bactérias (rodenticidas), entre outros (JARDIM *et al.*, 2009).

Quanto à composição química, os agrotóxicos possuem grande diversidade estrutural, sendo classificados em um mesmo grupo quanto à natureza dos elementos químicos presentes e da maneira como estão arrançados. Algumas das classes incluem organofosforados, carbamatos, organoclorados e piretróides. Há forma de classificar os agrotóxicos através do mecanismo de ação perante ao organismo alvo, que pode ser por contato, por ingestão ou fumegante (DE MEDEIROS *et al.*, 2009).

Em relação à biodisponibilidade, os agrotóxicos podem ser classificados segundo o seu tempo de meia vida, que é o tempo necessário, após aplicação, para que tenha sua concentração de substância ativa reduzida à metade. Por outro lado, os agrotóxicos também podem ser classificados de acordo com os efeitos causados à saúde humana e ao meio ambiente. Em relação aos efeitos decorrentes da exposição humana a estes compostos, sua classificação é feita considerando a dose letal oral, cutânea e inalatória estabelecida (PRESTES, 2007).

A ANVISA, através da RDC nº 294, de 29 de julho de 2019, estabelece a classificação dos agrotóxicos de acordo com sua toxicidade. Em 2019, o mesmo órgão publicou uma reclassificação, em função de um novo marco regulatório no setor. Esta mudança ampliou de quatro para cinco categorias de classificação e ainda incluiu o item “não classificado” (ANVISA, 2019a).

A Tabela 3 apresenta classificação toxicológica dos agrotóxicos em relação ao potencial de periculosidade ambiental de um agrotóxico, dividindo em classes que variam de I a V: produtos impeditivos de obtenção de registro e produtos altamente perigosos ao meio ambiente (Classe I), produtos muito perigosos ao meio ambiente (Classe II), produtos perigosos ao meio ambiente (Classe III) e produtos pouco perigosos ao meio ambiente (Classe IV) e produto improvável de causar dano agudo (Classe V) (PERES *et al.*, 2003).

Tabela 3 – Classificação toxicológica dos agrotóxicos

Classificação	Significado	Faixa e numeração
Classe I	Produto extremamente tóxico	Vermelha: 43
Classe II	Produto altamente tóxico	Vermelha: 79
Classe III	Produto moderadamente tóxico	Amarela: 136
Classe IV	Produto pouco tóxico	Azul: 599
Classe V	Produto improvável de causar dano agudo	Azul: 899
Não classificado	Produto não classificado	Verde: 168

Fonte: Adaptação de ANVISA, 2019.

2.2.3 Risco toxicológico

Os efeitos toxicológicos causados pela exposição ambiental aos agrotóxicos trazem uma série de transtornos e modificações para o meio ambiente, estes compostos contaminam as comunidades de seres vivos que o compõem, se acumulam nos segmentos bióticos e abióticos dos ecossistemas (biota, água, ar, solo, sedimentos). Eles também podem contaminar espécies que não interferem no processo de produção que se tenta controlar (espécies não alvo), podendo causar desequilíbrios ecológicos (PERES *et al.*, 2002).

As propriedades físico-químicas dos agrotóxicos, bem como sua forma de aplicação, as características do solo e condições ambientais interferem nos processos envolvidos no destino ambiental destes compostos. Como exemplos desses processos têm-se a lixiviação, o escoamento superficial, a sorção, a degradação química e biológica e a volatilização. A lixiviação consiste no transporte do agrotóxico pelo solo e, conforme a umidade e porosidade do solo, pode levar à contaminação do lençol freático. Há também o processo de escoamento superficial tem o potencial de contaminar rios, lagos, entre outros e expor os organismos aquáticos e outras espécies (REBELO; CALDAS, 2014).

Por outro lado, os efeitos de toxicidade dos agrotóxicos sobre o homem podem ser de dois tipos. Os agudos ou resultantes da exposição a concentrações altas de um ou mais agentes tóxicos são aqueles capazes de causarem dano efetivo aparente em um período de 24 h. Enquanto os efeitos crônicos são aqueles resultantes de uma exposição continuada a doses relativamente baixas de um ou mais produtos. Os efeitos agudos são os mais visíveis, que aparecem durante ou após o contato da

pessoa com o produto (OPS, 1996). Em contrapartida, os efeitos de uma exposição crônica podem aparecer semanas, meses, anos ou até mesmo gerações após o período de contato com tais produtos, sendo, portanto, mais difíceis de identificação (PERES *et al.*, 2003).

2.2.4 Uso e fiscalização dos agrotóxicos

Conforme o artigo 9º, da Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, é de responsabilidade da União estabelecer legislações sobre a produção, registro, comércio interestadual, exportação, importação, transporte, classificação e controle tecnológico e toxicológico; ainda, controlar e fiscalizar os estabelecimentos de produção, importação e exportação; também, analisar os produtos agrotóxicos, seus componentes e afins, nacionais e importados; e controlar e fiscalizar a produção, a exportação e a importação (BRASIL, 1989).

No que diz respeito a fiscalização de agrotóxicos, a nível federal, esta é coordenada pela Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins (CGAA) / Departamento de Fiscalização de Insumos Agrícolas (DFIA)/ Secretaria da Defesa Agropecuária (DAS)/ Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A CGAA/DFIA/SDA/MAPA é a instância do MAPA responsável pela interlocução com a ANVISA e o IBAMA. Esta coordenação regulamenta e fiscaliza, no setor público do país, a pesquisa, a importação/exportação, a produção, a embalagem e a rotulagem dos agrotóxicos. No âmbito estadual, as ações da CGAA/DFIA/SDA/MAPA são realizadas através dos Serviços de Fiscalização Agropecuária (SEFAGs) presentes em todas as Superintendências Federais da Agricultura (BRASIL, 2019).

A difusão do uso dos agrotóxicos no controle fitossanitário de doenças e proteção contra insetos e outras pragas proporcionou um aumento significativo na produtividade agrícola. Este é um dos fatores que elevam o consumo de insumos, colaborando para o destaque do Brasil, como um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (PELAEZ *et al.*, 2015). No ano de 2017, o Brasil recebeu o título de maior consumidor de agrotóxicos, em volume de produto, do planeta, consumindo cerca de 550 mil toneladas de ingredientes ativos (FAOSTAT, 2018). O uso dessas substâncias é muito alto porque o Brasil é um grande produtor agrícola, além de o país possuir, pelo menos, duas safras por ano (PIGNATI, 2018).

Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), a classe de uso mais vendida no Brasil, em 2017, foram os herbicidas, configurando 58,45%. O IBAMA atualizou, em 2019, estas informações e forneceu uma relação dos 10 ingredientes ativos mais vendidos no país (Tabela 4). O glifosato foi o herbicida mais comercializado no Brasil no ano de 2019, com aproximadamente 217 toneladas (IBAMA, 2019). Este agrotóxico pertence à classe de compostos organofosforados e ganhou atenção mundial devido a sua ampla comercialização em sementes geneticamente modificadas (BENBROOK, 2016).

Tabela 4 – Ingredientes ativos com o ranking de vendas aproximadas no Brasil

Ranking	Ingrediente ativo	Vendas (ton)
1º	Glifosato*	217
2º	2,4-D	52
3º	Mancozebe*	49
4º	Acefato	28
5º	Atrazina	23
6º	Clorotalonil*	16
7º	Dicloreto de paraquate	16
8º	Malationa	13
9º	Enxofre	11
10º	Clorpirifós	10

Fonte: IBAMA (2020). Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto nº 4.074/2002. *Ingredientes ativos autorizados para a cultura do mamão no Brasil.

2.2.5 Monitoramento dos resíduos de agrotóxicos em alimentos

As deficiências nas boas práticas para a utilização de agrotóxicos incorrem no aparecimento de resíduos que, em níveis acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR), podem representar risco à saúde humana. Estes riscos estão estritamente correlacionados com o desrespeito às instruções de uso do fabricante contidas na bula dos agrotóxicos, como: indicação de uso para a espécie alvo, dosagem, via de administração e período de carência (PRESTES, 2011).

Para a realização do controle internacional, existe a *European Commission* e o *Codex Alimentarius*, criado em 1963 com o propósito de estabelecer normas internacionais na área de alimentos, o Brasil é membro do *Codex Alimentarius* desde

a década 70 (ANVISA, 2016). No Brasil existem diversos programas que visam regular o uso e verificar a quantidade de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), coordena o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) em produtos de origem vegetal e animal. Este programa tem como função monitorar a qualidade dos alimentos produzidos em todo o território nacional, em relação à ocorrência de resíduos de agrotóxicos e contaminantes químicos e biológicos (BRASIL, 2017).

A ANVISA criou em 2001 o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) que tem como incumbência identificar e quantificar os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos, definindo assim o limite máximo de resíduos. De acordo com o programa, o LMR caracteriza a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico ou afim oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expressa em mg kg^{-1} (ANVISA, 2019). O programa PARA analisa anualmente amostras de frutas, hortaliças, cereais, entre outros, como forma de avaliar a qualidade dos principais alimentos adquiridos no mercado varejista e consumidos pela população (ANVISA, 2019).

O mamão foi uma das matrizes monitoradas pelo PARA no período de 2013 a 2015 e neste período foram analisadas 722 amostras. Foram consideradas satisfatórias 596 amostras, onde 82 destas não apresentaram resíduos e 514 apresentaram concentrações inferiores ou iguais ao LMR. Das amostras analisadas, 108 amostras apresentaram agrotóxicos não autorizados para a cultura de mamão. Dentre os agrotóxicos detectados como não autorizados para a cultura, destacou-se o epoxiconazol, detectado em 1,92% das amostras analisadas. Do total de amostras, 28 apresentaram resíduos em concentrações acima do LMR, onde o carbendazim e famoxadona foram os agrotóxicos com maior número de detecções. No total, foram detectados 49 agrotóxicos diferentes dentre os 212 pesquisados (ANVISA, 2016). No último relatório do PARA de 2017 a 2018, a cultura do mamão não foi selecionada para monitoramento de agrotóxicos.

A Tabela 5 demonstra os valores de LMR de acordo com a ANVISA, União Europeia (UE, do inglês *European Union*) e pelo *Codex Alimentarius* para mamão, bem como o grupo químico e a classe funcional de cada composto que foi avaliado neste estudo.

Tabela 5 – Compostos registrados no Brasil para uso na cultura de mamão– Limite Máximo de Resíduo (LMR), mg kg⁻¹ estabelecidos de acordo com a ANVISA, União Europeia e *Codex Alimentarius*.

(continua)

	Nome Comum	Grupo Químico	Classe(s)	ANVISA (mg kg⁻¹)	UE (mg kg⁻¹)	Codex Alimentarius (mg kg⁻¹)
1	Abamectina	Avermectina	Acaricida/Inseticida/Nematicida	0,01	0,03	0,01
2	Acetamiprido	Neonicotinóide	Inseticida	0,10	0,01	-
3	Azoxistrobina	Estrobilurina	Fungicida	6,00	0,30	0,30
4	Beta-Cipermetrina	Piretróide	Inseticida	0,02	0,50	0,50
5	Bifentrina	Piretróide	Inseticida, formicida e acaricida	0,30	0,40	-
6	Buprofezina	Tiadiazinona	Acaricida/Inseticida	0,30	0,01	-
7	Ciprodinil	Anilino pirimidina	Fungicida	1,50	0,02	-
8	Cletodim	Oxima Ciclohexanodiona	Herbicida	0,05	0,10	-
9	Clorfenapir	Análogo de Pirazol	Inseticida	0,10	0,01	0,30
10	Clortalonil	Isoftalonitrila	Fungicida	15,00	0,01	20,00
11	Deltametrina	Piretróide	Formicida/Inseticida	0,20	0,01	-
12	Difenoconazol	Triazol	Fungicida	0,30	0,20	0,20
13	Dimetomorfe	Morfolina	Fungicida	0,70	0,70	-
14	Espinetoram	Espinosinas	Inseticida	0,07	0,02	-
15	Espinosade	Espinosinas	Inseticida	0,01	0,50	-
16	Espirodiclofeno	Cetoenol	Acaricida	0,30	1,00	0,03
17	Espiromesifeno	Cetoenol	Inseticida e Acaricida	0,70	1,00	-
18	Etofemproxi	Éter difenílico	Inseticida	0,30	0,01	-
19	Fenpíroximato	Pirazol	Acaricida	0,10	0,01	-
20	Fenpropatrina	Piretróide	Inseticida e Acaricida	2,00	0,01	-
21	Fludioxinil	Fenilpirrol	Fungicida	6,00	0,01	-
22	Fluopicolida	Benzamida	Fungicida	0,50	0,01	-
23	Flupiradifurone	Butenolida	Inseticida	0,40	0,01	-
24	Flutriafol	Triazol	Fungicida	0,50	0,01	-
25	Fluxapiraxade	Carboxamida	Fungicida	0,50	1,00	1,00

Tabela 5 - Compostos registrados no Brasil para uso na cultura de mamão– Limite Máximo de Resíduo (LMR), mg kg⁻¹ estabelecidos de acordo com a ANVISA, União Europeia e *Codex Alimentarius*.

(conclusão)

	Nome Comum	Grupo Químico	Classe(s)	ANVISA (mg kg⁻¹)	UE (mg kg⁻¹)	Codex Alimentarius (mg kg⁻¹)
26	Formetanato	Metilcarbanato de fenila	Inseticida e acaricida	0,05	0,01	-
27	Glifosato	Glicina Substituída	Herbicida	0,10	0,10	-
28	Imazalil	Imizadol	Fungicida	1,00	0,01	-
29	Imidacloprido	Neonicotinóide	Inseticida	2,00	0,01	-
30	Lambda-Cialotrina	Piretróide	Inseticida	1,00	0,01	-
31	Mancozebe	Alquilenobis (Ditiocarbamato)	Acaricida/Fungicida	3,00	-	-
32	Mandipropamida	Éter Mandelamida	Fungicida sistêmico	2,00	0,01	-
32	Metomil	Metilcarbamato de Oxima	Inseticida e Acaricida	0,01	0,01	-
33	Milbemectina	Milbemicina	Inseticidas	0,01	0,02	-
34	Picoxistrobina	Estrobilurina	Fungicida	0,10	0,01	-
35	Piraclostrobina	Estrobilurina	Fungicida	0,50	0,07	0,15
36	Piridabem	Piridazinona	Piridazinona	0,01	0,01	-
37	Piriproxifem	Éter Piridiloxipropílico	Inseticida	0,05	0,30	0,30
38	Propamocarbe	Carbamato	Fungicida	2,00	0,01	-
39	Tebuconazol	Triazol	Fungicida	1,00	2,00	2,00
40	Teflubenzurom	Benzoiluréia	Inseticida	0,20	0,40	0,40
41	Tetradifona	Carbamatos	Acaricida	0,05	0,01	-
42	Tiabendazol	Benzimidazol	Fungicida	6,00	10,00	10,00
43	Tiacloprido	Neonicotinóide	Inseticida	0,30	0,50	-
44	Tiametoxam	Neonicotinóide	Inseticida	0,10	0,02	0,01
45	Tiofanato-Metílico	Benzimidazol, Precursor de	Fungicida	0,50	1,00	-
46	Trifloxistrobina	Estrobilurina	Fungicida	0,05	0,60	0,60

Fonte: Adaptação de ANVISA, 2022; EU, 2022; FAO (2022). Legenda: *Limite mínimo de determinação analítica.

2.3 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MAMÃO

Com base nos riscos à saúde humana e ao meio ambiente decorrentes do uso de agrotóxicos, bem como a verificação da conformidade com os limites máximos destes compostos, estabelecidos pela legislação, é de grande importância a determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentares e ambientais. Produtos agrícolas como frutas, vegetais e cereais geralmente possuem resíduos de agrotóxicos de diversas classes. Isso demonstra a necessidade do desenvolvimento de métodos para a determinação multirresíduo de agrotóxicos (PRESTES *et al.*, 2009).

Contudo, a análise de agrotóxicos é uma tarefa complicada, comumente as matrizes são complexas, as concentrações presentes destes compostos são muito baixas e os agrotóxicos apresentam propriedades químicas bastante distintas. Existem diversos avanços no desenvolvimento de instrumentação analítica para tais determinações, contudo, uma etapa prévia de preparo de amostra ainda é indispensável para a mitigação destas adversidades e obtenção de resultados precisos (PRESTES *et al.*, 2009).

Assim, o preparo de amostra é a primeira etapa de uma análise química e se resume em submeter tais amostras a um tratamento adequado a suas características, visando a sua preparação para avançar as etapas seguintes (ARRUDA; SANTELLI, 1997). O objetivo deste preparo é promover a extração e o enriquecimento dos analitos, bem como a remoção dos interferentes (PRESTES *et al.*, 2009). Da mesma forma que é indispensável, esta etapa é uma das mais críticas do processo analítico. O preparo de amostra é um dos principais entraves para a obtenção de resultados satisfatórios ao considerar precisão e detectabilidade e frequentemente apresentam etapas que demandam tempo, alto investimento e quantidades significativas de resíduos gerados. Por isso, há uma crescente necessidade de aprimoramento deste método analítico exigindo aumento da eficiência e diminuição do custo e do tempo de análise (PRESTES *et al.*, 2009).

Na maior parte dos procedimentos de preparo de amostra geralmente envolve a homogeneização da amostra com solventes orgânicos, por vezes aplicados sozinhos ou em solução com água ou agentes tamponantes, utilizando ainda homogeneizadores ou sonicadores (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007).

O primeiro método multirresíduo desenvolvido para extração de agrotóxicos foi na década de 1960, executado por Mills e colaboradores. Este método baseia-se em uma extração com acetonitrila (ACN), e é usado essencialmente na determinação de compostos organoclorados apolares em amostras não gordurosas. Esse método limita a extração de agrotóxicos com características polares e com isso, surgiu a necessidade do desenvolvimento de métodos alternativos (PRESTES *et al.*, 2009).

Posteriormente, em 1975, Luke e colaboradores desenvolveram o chamado método de Luke, que consiste em uma etapa de extração com acetona seguida de uma partição líquido-líquido com solventes apolares. Com a finalidade de obter melhores resultados desenvolveram-se, com o tempo, novos métodos de extração. Como exemplo temos o método de Krijgsman e colaboradores, tão vantajoso que foi utilizado como método de extração oficial em diversos países.

Em 1980, o *Food and Consumer Product Safety Authority* da Holanda desenvolveu o método de extração *mini-Luke*, que se configura em uma miniaturização do método Luke. O incremento desse método possibilitou a redução da quantidade de amostra, bem como de solventes utilizados (PRESTES *et al.*, 2009).

Na sequência, extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*) foi outra alternativa desenvolvida e foi aplicada para a extração de agrotóxicos em frutas. Nesta técnica, uma mistura do solvente orgânico com a amostra aquosa é submetida a agitação e ocorre a formação de uma gota de solvente orgânico, o que garante o aumento da superfície de troca para favorecer a partição dos analitos entre as fases (MARTINS *et al.*, 2012). No entanto, este método demanda o uso de grande quantidade de solventes orgânicos, possui custo elevado, é de difícil automação e trabalhosos (CALDAS *et al.*, 2011).

Ao longo dos anos, foram desenvolvidos diversos métodos alternativos de preparo de amostras, baseados na redução do volume de solvente utilizado na etapa de extração, por exemplo, a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*). Esta metodologia foi introduzida em meados de 1970 e baseia-se nos mecanismos de separação da cromatografia líquida clássica (baixa pressão). Este se tornou um dos principais métodos de extração para aplicação em amostras líquidas e é uma das técnicas de preparo de amostra mais utilizadas, devido ao baixo consumo de solvente, se comparada à LLE (MORAIS *et al.*, 2013). Os principais atrativos da SPE podem ser destacados o alto fator de concentração dos solutos, a possibilidade de realização de inúmeras extrações simultâneas e a redução do uso de solventes

orgânicos comparada a técnicas de extração com solventes. Amostras ambientais, especialmente água, que apresentam concentrações de contaminantes em níveis traço estão entre as principais aplicações da SPE (AGUIAR *et al.*, 2018).

Dessa forma inúmeros métodos foram desenvolvidos os quais também visavam a simplificação de etapas como, por exemplo, a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *matrix solid phase dispersion*), a microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase microextraction*) e extração com membrana assistida por solvente (MASE, do inglês *membrane-assisted solvent extration*). A MSPD se resume na homogeneização de uma amostra viscosa, sólida ou semissólida com um suporte sólido e possibilita o uso de pequenas quantidades de amostra e solventes orgânicos, com as etapas de extração e *clean-up* sendo realizadas simultaneamente. No entanto esta metodologia apresenta desvantagens como o alto consumo de sorventes, não sendo adequada para amostras secas ou com alto teor de lipídeos e muitas vezes faz-se necessária uma etapa de limpeza adicional (BARKER *et al.*, 1989; PRESTES *et al.*, 2011).

Ainda outros métodos conhecidos são: extração por fluido supercrítico (SFE, do inglês *supercritical fluid extraction*), extração acelerada por solventes (PLE, do inglês *pressurized liquid extraction*) e extração assistida por micro-ondas (MAE, do inglês *microwave assisted extraction*). Elas apresentam, dentre outras características, elevada eficiência, contudo, geralmente demandam investimento considerável em instrumentação (PRESTES *et al.*, 2009). Assim, fez-se necessário o desenvolvimento de novos métodos, que realizem a extração do maior número de agrotóxicos possíveis, gerando resultados precisos e exatos e reduzindo o investimento e tempo de análise. Desta forma, foi proposto o método QuEChERS, método que é amplamente utilizado na determinação de agrotóxicos em diversas matrizes. Na literatura, diversos métodos de preparo de amostras para a extração de agrotóxicos no fruto de mamão são abordados, como pode ser visualizado na Tabela 6.

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

Classe de agrotóxicos	Matriz	Preparo de amostra		Técnica cromatográfica	Referência
		Extração	Limpeza		
Ametrina, carbofurano, atrazina, carbaril e parationa-metílica	Mamão e abacate	QuEChERS: 15 g de amostra + 15 mL de ACN 1% ac. acético -> agitação (5 min) -> kit DisQuE dispersive da Waters (6 g MgSO ₄ + 1,5 g Na ₂ SO ₄ -> agitação (vórtex/1 min) -> centrifugação (4.000 rpm/5 min)	d-SPE: 1 mL sobrenadante + 150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA -> agitação (1 min) -> centrifugação (8000 rpm/1 min) -> filtração 1 mL extrato	UHPLC-MS/MS	PANO-FARIAS <i>et al.</i> , 2018
13 organoclorados, 11 organofosforados e 12 piretróides sintéticos	6 frutas (incluindo mamão) e 12 vegetais	QuEChERS: 10 g de amostra + 10 mL de ACN -> agitação -> 6 g de MgSO ₄ + 1,8 g de NaCl -> agitação -> centrifugação (8.000 rpm/10 min)	2,6 mL sobrenadante + 10 mg carvão -> agitação -> centrifugação (5000 rpm/5 min) DLLME: 2,6 mL sobrenadante + 100 µL CCl ₄ + 7,5 mL de água duplamente destilada -> ultrassom (3 min) + centrifugação (4000 rpm/5 min) -> injeção de 2 µL da fase inferior (CCl ₄)	GC-MS	RAI <i>et al.</i> , 2016
Atrazina, ametrina, terbutrina, metidation, carbaril e clorotalonil	Mamão, melancia e tomate	QuEChERS: 10 g de amostra + 2 mL de ACN -> agitação -> 4 g de MgSO ₄ + 1 g de NaCl -> agitação (1 min) -> centrifugação (3.000 rpm/10 min)	d-SPE: 1,5 mL sobrenadante + 450 mg MgSO ₄ + 75 mg PSA + 75 mg C18 -> agitação (30s) -> centrifugação (3000 rpm/3 min) -> filtração (0,2 µm)	HPLC-VWD	BEDASSA <i>et al.</i> , 2015
11 agrotóxicos	Mamão maradol, melão, pitaia e fruta-pinha	QuEChERS: 15 g de amostra + 15 mL de ACN 1% ac. acético + 6g MgSO ₄ + 1,5 g Na ₂ SO ₄ -> agitação (manual/1 min) -> centrifugação (3.500 rpm/1 min)	d-SPE: 8 mL sobrenadante + 1.200 mg MgSO ₄ + 400 mg PSA -> agitação (vórtex/30s) -> centrifugação (3500 rpm/1 min) -> 4 mL extrato + 1 mL de tolueno -> evaporação N ₂ até 0,5 mL -> adição 1 mL de tolueno + 100 mg de MgSO ₄ -> agitação -> centrifugação (3500 rpm/1 min)	GC-MS	COELLO-VILLANUEVA <i>et al.</i> , 2017

Tabela 6 - Revisão dos métodos de preparo de amostra e condições cromatográficas empregadas na determinação de resíduos de agrotóxicos em mamão e outras matrizes de origem vegetal. (conclusão)

Classe de agrotóxicos	Matriz	Preparo de amostra		Técnica cromatográfica	Referência
		Extração	Limpeza		
11 agrotóxicos organofosforados	Mamão, pimentão e banana	QuEChERS: 15 g de amostra + 15 mL de ACN 1% ac. acético + 6 g MgSO ₄ + 1,5 g Na ₂ SO ₄ -> agitação (vórtex/1 min) -> centrifugação (3.000 rpm/1 min)	6 mL de extrato + 150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA -> agitação (vórtex) -> centrifugação (3000 rpm/1 min) -> filtração (0,45 µm)	HPLC-MS/MS	LEMOS <i>et al.</i> , 2015.
29 compostos: multirresíduo	Mamão, uchuva, tamarillo, granadilla, gulupa, maracuja e pitaya	20 g de amostra + 50 mL de ACN -> agitação (Ultra-turrax/2min 8.000 rpm) -> O vaso de extração e a haste foram lavados com 10 mL de acetonitrila -> filtração a vácuo em Büchner -> volume ajustado com água (solução A, acetonitrila/água 60:40) em volume de 100 mL -> 2,5 mL da solução anterior -> diluição com água até 10 mL em um balão volumétrico (extrato final 0,05 g/mL em acetonitrila/água 15:85, solução B) -> injeção de 20 µL do extrato final	-	LC-QTOF-MS	BOTERO-COY <i>et al.</i> , 2012
Diazinona, dimetoato, clorotalonil, parationa metílica e fenitrotona	Mamão, banana, manga, melão e abacaxi	MSPD: 500 mg de amostra + 500 mg de sorvente de dispersão -> homogeneização -> introduzido em cartucho de polipropileno ligado a outro cartucho contendo 500 mg de sorvente de limpeza (parte inferior) -> acetado etílico -> vácuo -> extrato coletado e completado com acetato etila ao volume de 5 mL -> 500 µL em eppendorf -> fluxo de N ₂ -> reconstituído com 50 µL de acetato de etila		GC-ECD	FREITAS <i>et al.</i> , 2018

Fonte: A autora, 2022. Legenda= ACN: acetonitrila; FM: fase móvel; d-SPE: extração em fase sólida dispersiva; ECD: Detecção por Captura de Elétrons; QTOF: Tecnologia de Quadrupolo e Tempo de Voo; VWD: detector de comprimento de onda variável; MSPD: Dispersão da Matriz em Fase Sólida; DLLME: Microextração Líquido-Líquido Dispersiva.

2.3.1 Método QuEChERS

Com a finalidade de atender a necessidade de um método multirresíduo que contornasse as limitações dos métodos já existentes, em 2003, Anastassiades e colaboradores desenvolveram um novo método de preparo de amostras para extração multirresíduo, denominado QuEChERS, acrônimo do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe* (rápido, fácil, econômico, robusto e seguro). Entre as principais vantagens da utilização deste método estão os valores satisfatórios de recuperação para uma ampla faixa de agrotóxicos, o elevado grau de exatidão e precisão, o preparo de um grande número de amostras em um curto período de tempo, a redução no volume de solventes orgânicos e simplicidade de operação (LEHOTAY *et al.*, 2005).

O método QuEChERS baseia-se em três principais etapas: uma extração sólido-líquido com solvente, a partição promovida pela adição de sais e a limpeza do extrato, utilizando a técnica de Extração em Fase Sólida Dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid phase extraction*) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Na etapa de extração utiliza-se a acetonitrila, este solvente oferece diversas vantagens como a possibilidade de extração de uma menor quantidade de coextrativos e interferentes presentes nas amostras, como gorduras, ceras e pigmentos, a extração de uma grande faixa de analitos de diferentes polaridades e ainda, é o solvente mais adequado para cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS, do inglês *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*), podendo ser utilizado também na cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em série (GC-MS/MS, do inglês *gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry*). A acetonitrila também pode ser acidificada, o que fornece melhores níveis de recuperações para analitos com problemas de estabilidade (ZANELLA *et al.*, 2015).

Na etapa de partição há adição de sais que promovem o efeito *salting out*, essa medida é rápida, fácil, barata, não dilui o extrato da amostra e separa as fases orgânica e aquosa. Dependendo da natureza do solvente utilizado em conjunto, melhoram-se os percentuais de recuperação para analitos polares, pois os sais diminuem a solubilidade destes compostos em fase aquosa e a quantidade de água na fase orgânica. O sulfato de magnésio (MgSO₄) é o sal utilizado originalmente no método QuEChERS, este possui maior capacidade de remover água quando

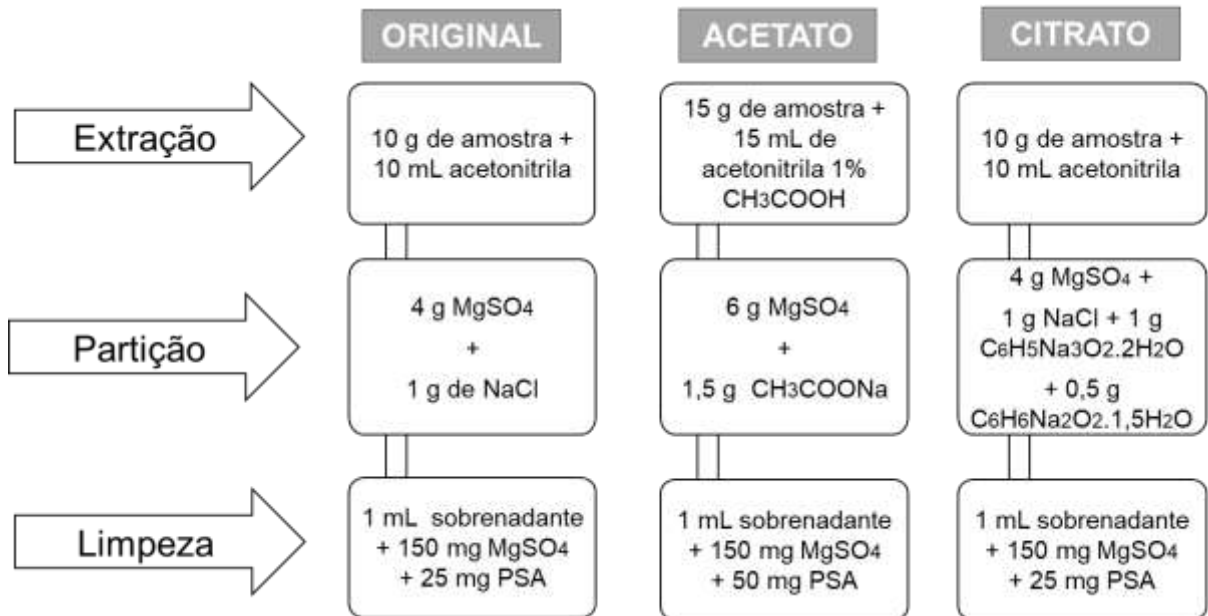
comparado a outros sais, reduz o volume da fase aquosa e possui uma hidratação exotérmica, que promove o aquecimento da amostra entre 40 e 45 °C, favorecendo a extração, principalmente, de compostos apolares. Ainda são utilizados outros sais como o cloreto de sódio (NaCl) e o sulfato de sódio (Na₂SO₄), estes melhoram a recuperação de agrotóxicos polares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; ZANELLA *et al.*, 2015).

Contudo, durante o desenvolvimento do método QuEChERS compostos dependentes do pH apresentaram resultados insatisfatórios de recuperação e estabilidade, este impasse foi contornado com a utilização de uma etapa de tamponamento. Por isso, em 2005, Lehotay e colaboradores desenvolveram o método denominado QuEChERS acetato, neste, a extração é realizada utilizando acetonitrila acidificada com 1% (v/v) de ácido acético (HAc) e ainda utiliza o emprego de acetato de sódio (CH₃COONa), adicionado para promover o efeito tamponante (pH 4,8). Em 2007 esse método foi adotado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) como oficial para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (ZANELLA *et al.*, 2015; BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Em 2007, Anastassiades e colaboradores propuseram o método QuEChERS citrato, que promove o efeito tamponante (pH 5,0 - 5,5) através da utilização de uma mistura de citrato de sódio di-hidratado (C₆H₅Na₃O₇ · 2H₂O) e hidrogenocitrato sesquiidratado (C₆H₆Na₂O₇ · 1,5H₂O). Este foi oficializado, mais tarde, como método de referência na União Europeia (BORGES *et al.*, 2015; ZANELLA *et al.*, 2015;). Na Figura 3, é possível observar as etapas das três versões do método QuEChERS.

Na etapa de preparo de amostras a utilização de uma etapa de limpeza confere robustez e confiabilidade aos resultados obtidos, bem como a diminuição das manutenções no sistema cromatográfico, visto que elimina componentes não voláteis que poderiam ficar aderidos no sistema de injeção e na coluna cromatográfica (ZANELLA *et al.*, 2015). A d-SPE, proposta por Anastassiades e colaboradores (2003) se mostrou uma alternativa vantajosa, simples e de baixo custo para etapa de limpeza dos extratos, principalmente se comparada a SPE.

Figura 3 – Método QuEChERS, original, acetato e citrato



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

Na etapa de limpeza o extrato é agitado com uma pequena quantidade de sorvente, neste caso o PSA, do inglês *primary secondary amine*, para a distribuição uniforme do sorvente, o que facilita a limpeza. O PSA atua retendo os coextrativos da matriz. Tal mistura é separada utilizando centrifugação e o extrato segue para análise. Além disso, na etapa de limpeza por d-SPE pode-se aplicar a combinação de diferentes sorventes, além do PSA, de acordo com o tipo de matriz e do equipamento que será utilizado (BORGES *et al.*, 2015; ZANELLA *et al.*, 2015).

Por outro lado, o sorvente PSA é uma amina primária secundária que atua como trocador iônico e interage com outros compostos através de ligações de hidrogênio ou dipolo-dipolo. Esse sorvente tem forte interação com os compostos da matriz, removendo coextrativos interferentes, sua estrutura bidentada tem elevado efeito quelante, o que causa a retenção de ácidos graxos livres, açúcares e outros compostos polares. Entretanto, o PSA não é tão eficiente para remoção de gorduras (WILKOWSKA; BIZUK, 2011; ZANELLA *et al.*, 2015). Outro sorvente bastante utilizado é o octadecilsilano (C18), que promove uma limpeza mais efetiva de algumas matrizes, principalmente as que contém gordura, remove interferentes apolares e substâncias graxas e lipídios. Por isso, o C18 é muito utilizado em conjunto com o PSA (WILKOWSKA; BIZUK, 2011; ZANELLA *et al.*, 2015).

Além do mais, na etapa de d-SPE ainda pode ser utilizado o carbono grafitizado (GCB, do inglês *graphitized carbon black*), para a redução do teor de pigmentos contidos em extratos de amostras vegetais. Também são aplicados a alumina (Al_2O_3), o Florisil[®], a terra diatomácea, destacando-se pelo seu baixo custo. O sorvente polimérico ChloroFiltr[®] tem sido aplicado como alternativa ao GCB e a tetraetilenopentamina como variação ao PSA, ainda, a utilização de nanotubos de carbono vem sendo desenvolvida (ZANELLA *et al.*, 2015).

Também, na etapa de d-SPE podem ser utilizados ainda sorventes poliméricos com características lipofílicas e hidrofílicas, com grande área superficial e capacidade para extração de compostos ácidos, neutros e básicos, favorecendo a extração dos analitos, como Oasis[®] HLB, Strata[®] X, Strata[®] SDB-L, Supel[™] QuE Z-Sep+ e Bond Elut Nexus (BROUSMICHE *et al.*, 2008; CAÑAS *et al.*, 2012).

2.4 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

As determinações de resíduos de agrotóxicos, em matrizes no geral, são tradicionalmente feitas com a utilização de técnicas cromatográficas. Estas técnicas possuem a facilidade de realizar separações, identificar e quantificar as espécies presentes na amostra através da utilização de detectores específicos. Além da utilização de diferentes detectores, uma grande vantagem das técnicas cromatográficas é a possibilidade da utilização associada a outras técnicas, como as espectroscópicas e eletroanalíticas. A utilização das técnicas cromatográficas apresenta um contínuo desenvolvimento, principalmente em decorrência da crescente necessidade de técnicas mais precisas e sensíveis para a caracterização e quantificação de analitos em matrizes complexas. Por isso, são uma ferramenta importante de separação, apresentando informações quantitativas e qualitativas importantes sobre tais espécies (GALLI *et al.*, 2006).

Os métodos cromatográficos se apresentam como uma das mais relevantes técnicas para a análise de substâncias químicas (MAFFEI *et al.*, 2009). Essa técnica pode ser definida como um método físico-químico de separação no qual os constituintes da amostra são particionados entre duas fases, uma estacionária, geralmente de grande área, e a outra, móvel (CIOLA, 1998; SKOOG *et al.*, 2002). Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da

mistura são distribuídos pelas duas fases e cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes (COLLINS *et al.*, 2006).

Na maioria dos métodos físico-químicos para a análise de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários, ou contaminantes em alimentos é utilizada a cromatografia em combinação com técnicas espectrométricas. Esta combinação fornece informações sobre as estruturas químicas dos analitos, possibilitando a confirmação inequívoca da identidade, o que evita a possibilidade de resultados falso-positivos (MAFFEI *et al.*, 2009).

Na cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*) há um elevado poder de resolução, possibilitando a análise de várias substâncias em uma mesma amostra. Esse método cromatográfico está baseado na partição dos componentes de uma amostra entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária líquida ou sólida, que propiciam a separação da mistura por meio de processos físicos e químicos (DEGANI *et al.*, 1998; PERES, 2002). A grande limitação deste método é a necessidade de que a amostra seja volátil ou termicamente estável (PERES, 2002).

Na técnica de cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*), os equipamentos são geralmente modulares, com isso é possível intercambiar um módulo de um equipamento de uma marca por um equivalente de outra marca. Isso permite ao usuário configurar um cromatógrafo líquido de acordo com as suas necessidades e preferências (LANÇAS, 2009).

A cromatografia líquida de alta eficiência, (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*), utiliza suporte com partículas muito pequenas, responsáveis pela alta eficiência, sendo um método adequado para separação de espécies iônicas e macromoléculas (DEGANI; CASE; VIERA, 1998). Devido à utilização de colunas com grande capacidade de separação a HPLC requer a utilização de equipamentos específicos, com o uso de bombas e colunas que suportem altas pressões necessárias para eluição da fase móvel. Assim, a HPLC necessita da utilização de um cromatógrafo composto de bomba, coluna cromatográfica, detector e registrador (DEGANI *et al.*, 1998; PERES, 2002).

Na determinação de resíduos de agrotóxicos, esta análise é realizada principalmente por cromatografia líquida, sobretudo por cromatografia líquida de alta eficiência e utiliza detecção como o ultravioleta/visível (UV/Vis), fluorescência (FL) ou arranjo de diodos (DAD, do inglês *diode array detection*), mas a ferramenta que se

destaca é o acoplamento com a espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*), especialmente espectrometria de massas em série (MS/MS, do inglês *tandem mass spectrometry*). As vantagens da cromatografia líquida são a grande capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma inúmera variedade de compostos, que estão presentes em diversos tipos de matrizes, sem depender da volatilidade, da estabilidade térmica e da polaridade, tudo isso em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e repetitividade (GALLI *et al.*, 2006; CHIARADIA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2014).

Por outro lado, a técnica de espectrometria de massas permite identificar e quantificar qualquer composto ionizável, elucidar sua estrutura e determinar sua massa molar e promove o aumento de seletividade e detectabilidade. Além disso, quando existem compostos que não podem ser totalmente separados por técnicas cromatográficas, usando espectrometria de massas é possível detectá-los individualmente se possuírem diferentes massas molares ou gerarem diferentes espectros de massas (CHIARADIA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2014; OSHITA *et al.*, 2015).

O acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas se configura como a técnica mais utilizada para a detecção e quantificação de resíduos de agrotóxicos. A junção dessas técnicas permite obter grande quantidade de informação estrutural sobre o analito, assegurando sua identificação com maior exatidão, combinando suas diversas vantagens, graças a sua alta sensibilidade e seletividade e seu baixo limite de quantificação para a maioria dos compostos (SILVA *et al.*, 2014; CHIARADIA *et al.*, 2008).

Assim, a espectrometria de massas em série se destaca como uma ferramenta de identificação e confirmação, pois o monitoramento dos fragmentos oferece uma melhor discriminação se comparado ao emprego de um único estágio. Esta aplicação diminui as etapas de preparo de amostra, os resultados falsos positivos ou negativos, a quantidade de reagentes utilizados, o custo e o tempo de análise e ainda proporciona a identificação de compostos com características físico-químicas diferentes (OSHITA *et al.*, 2015). Quando se utiliza a MS/MS é possível obter maior detectabilidade e menores limites de detecção e quantificação, devido aos modos de varreduras possíveis de serem realizados, o que favorece a sua aplicação à análise de elementos traço (CHIARADIA *et al.*, 2008).

2.4.1 Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência

Ao longo dos anos a crescente necessidade de análises mais rápidas e/ou de melhor resolução, sem diminuir o desempenho cromatográfico a técnica de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*), foi difundida para distinguir da técnica convencional HPLC. Esta técnica conta com partículas de fase estacionária de menor diâmetro (normalmente $< 2 \mu\text{m}$), maiores temperaturas na separação dos compostos e altas pressões. O seu uso possui inúmeras vantagens, como o emprego de menor volume de amostra, menor consumo de fase móvel, menor tempo de análise, maior resolução dos picos cromatográficos, melhor detectabilidade e maior razão sinal-ruído, o que diminui o valor do limite de quantificação (OSHITA *et al.*, 2015; LOOSE, 2020)

Portanto, a UHPLC é uma técnica muito empregada na determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos, sendo de maior adequabilidade para analitos polares, e que sejam não voláteis e/ou termicamente instáveis. Esta é uma técnica que já está bem estabelecida, seja em termos de fases estacionárias quanto de instrumentação, e apresenta como vantagem principal a redução no tempo de análise (VALERA-TARIFA *et al.*, 2015).

2.4.2 Espectrometria de massas

O princípio da técnica de espectroscopia de massas é a fragmentação de moléculas formando íons carregados, que são separados de acordo com a razão massa/carga (m/z) e fornecendo, então, um espectro da abundância relativa de cada fragmento. Desde que as mesmas condições de fragmentação sejam empregadas, o padrão de fragmentação é característico para cada composto (SKOOG *et al.*, 2002).

O sistema MS/MS é composto por dois analisadores de massas dispostos em série, caracterizado pelo elevado poder de seletividade. Seu funcionamento baseia-se na análise dos íons pelo primeiro analisador, os quais são encaminhados para um segundo analisador, geralmente após uma etapa de fragmentação que ocorre entre os dois analisadores. Há diversas combinações de analisadores de massas disponíveis comercialmente, porém, o espectrômetro com uso mais difundido é o do tipo triplo quadrupolo (dois analisadores quadrupolares em série, sendo que entre eles há uma cela de colisão). Este tipo de determinação em série promove uma melhora

considerável em termos de seletividade e sensibilidade. Além disso, o modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*) permite a redução de ruído de fundo e a detecção de múltiplas transições, sendo uma excelente ferramenta para aquisição de dados (FACCIN, 2016).

Dentre os analisadores de massas, o quadrupolo é o mais popular devido a sua simplicidade, preço relativamente baixo, boa linearidade em análises quantitativas e a facilidade de operação (LANÇAS, 2009). Este analisador consiste em quatro barras cilíndricas, sendo que as barras opostas são conectadas e carregadas eletricamente, um par é carregado positivamente e outro negativamente e um potencial de radiofrequência é aplicado. Para obter o espectro de massa os íons são acelerados entre as barras, os fragmentos carregados com m/z específicas chegam ao detector, enquanto que, fragmentos com m/z menor ou maior que os íons selecionados colidem com as barras e são inativados (SKOOG *et al.*, 2002).

Uma alternativa de tornar os analisadores de massa mais sensíveis é o acoplamento entre eles. O tipo mais utilizado nas análises de agrotóxicos é o triplo quadrupolo (QqQ) e é formado por três quadrupolos em série, porém o segundo quadrupolo não atua como analisador, mas sim como cela de colisão (CHIARADIA *et al.*, 2008). Para obtenção do espectro de massas estão dispostas diversas técnicas de varredura, algumas dessas são a varredura completa, do inglês *full scan*, o monitoramento de íons selecionado (SIM, do inglês *selected ion monitoring*), a varredura do íon produto, a varredura do íon precursor e monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*). O modo *full scan* é utilizado, principalmente, quando não se sabe quais os componentes presentes na amostra, e é o mais aplicado para análises de resíduos de agrotóxicos (ALBARNAZ, 2021).

Há ainda a ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray ionization*), é a forma de ionização mais usada no acoplamento LC-MS, ela permite a criação de íons na pressão atmosférica ao invés de vácuo. Neste processo, a amostra é dissolvida em um solvente não polar e pressurizada em um tubo capilar feito de aço inox, nesse tubo é aplicada uma voltagem tipicamente entre 3 e 5 kV. Assim, o líquido emerge do capilar a pressão atmosférica, na forma de um aerossol. As gotículas formadas são dessolvatadas e os íons fluem para o espectrômetro de massas induzidos pelos efeitos da atração eletrostática e pelo vácuo (LANÇAS, 2009).

2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Para desenvolver um método analítico é preciso demonstrar qualidade das medições químicas, isso pode ser garantido através da comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Dados analíticos que não são confiáveis podem comprometer estudos e causar prejuízos financeiros. Para garantir que o método analítico desenvolvido seja confiável ele deve passar por uma avaliação, chamada validação (PEREZ, 2010).

De acordo com a ANVISA (2003), a validação precisa garantir, através de estudos experimentais, que o método cumpra as exigências das aplicações analíticas, garantindo a confiabilidade dos resultados. Conforme a norma ISO/IEC 17025 (2005), a validação consiste na confirmação de testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos sejam preenchidos para tais usos. Já segundo a *World Health Organization* (CODEX ALIMENTARIUS, 2001), a validação é uma avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que o mesmo está nas condições que deve ser aplicado.

Os órgãos nacionais e internacionais que verificam a competência de laboratórios de ensaios. Através da resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 e do documento DOQ-CGCRE-008, de fevereiro de 2010, a ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), respectivamente, disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos. Existem outros órgãos que regulamentam e recomendam, em forma de guias, a validação de métodos analíticos, como o Codex Alimentarius (2001), SANTE (2019), a Comissão Europeia (EC, do inglês *European Commission*) (DECISÃO 657/2002), a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*), entre outros.

Na etapa de validação, alguns parâmetros são avaliados, sendo esses: seletividade; linearidade e faixa de trabalho; limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*); limite de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*); recuperação; precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão (INMETRO, 2020).

2.5.1 Seletividade

Denomina-se seletividade, o grau em que um método pode quantificar um analito na presença de outros analitos, matrizes ou de outro material potencialmente interferente. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito para outros, é chamado seletivo.

A metodologia dos ensaios de seletividade pode ser avaliada através da comparação de uma matriz livre do composto de interesse com a matriz fortificada com o padrão desta substância. Existem outras formas de avaliar esse critério, como com a comparação de duas curvas analíticas, com e sem a presença da matriz, e pelo método de adição de padrão (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2020).

O requisito para avaliação da seletividade consiste na ausência de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas (INMETRO, 2020).

2.5.2 Linearidade, sensibilidade e curva analítica

O conceito de linearidade de um método analítico consiste em sua habilidade de obter resultados que são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e calculada com uma expressão matemática para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse pode ser expressa como uma equação de reta, que é chamada de curva analítica, conforme a Equação 1 (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2020).

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = a + bx \quad (1)$$

Onde:

y = resposta medida (sinal instrumental, altura ou área do pico);

x = concentração;

a = coeficiente linear (interseção com o eixo y , quando $x = 0$);

b = coeficiente angular (inclinação da curva analítica = sensibilidade).

Para calcular a estimativa dos coeficientes da curva analítica a partir das medições experimentais pode-se utilizar a regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b , é possível calcular o coeficiente de determinação (r^2), que demonstra a qualidade da curva obtida, quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e a incerteza dos coeficientes de regressão (RIBANI *et al.*, 2004).

A partir da equação da reta, ainda é possível determinar a sensibilidade analítica. O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação, representada pelo coeficiente angular (b) (INMETRO, 2020).

2.5.3 Faixa de trabalho

O parâmetro faixa linear de trabalho também é determinado pela curva analítica, consiste no intervalo entre a menor concentração e a maior concentração de analito na amostra para o qual se demonstrou que o procedimento analítico tem um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade (INMETRO, 2020). Este, deve ser estabelecido a partir dos estudos de linearidade, juntamente com os resultados de precisão e exatidão, sendo dependente da aplicação pretendida (BRASIL, 2017).

2.5.4 Efeito matriz

O efeito matriz é determinado por meio de uma comparação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas construídas com a substância química de referência do analito em solvente e com a amostra fortificada com a substância química de referência do analito (BRASIL, 2017). Na matriz podem existir componentes que interferem no desempenho da medição, podendo gerar diminuição ou aumento do sinal ou resposta instrumental, o que prejudica o resultado.

Quando as duas retas das curvas analíticas se encontram sobrepostas, demonstra-se a ausência de interferências dos componentes da matriz na determinação dos compostos (BRASIL, 2017; INMETRO, 2020; ANVISA, 2017). Em caso de ocorrer efeito matriz significativo recomenda-se a adoção de curva na matriz branco para compensar este efeito dentro dos critérios utilizados (em $\geq \pm 20\%$).

2.5.5 Limite de detecção

O LOD de um parâmetro analítico individual é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob condições estabelecidas de ensaio (INMETRO, 2020). Na determinação do limite de detecção pode ser feita por meio de método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco, em parâmetros da curva de calibração, considerando as particularidades do método analítico utilizado, ou através do LOQ, conforme a Equação 2 (BRASIL, 2017).

$$LOD = \frac{LOQ}{3,33} \quad (2)$$

2.5.6 Limite de quantificação

O conceito de LOQ de um método analítico é definido como a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis, ou seja, com recuperações entre 70 e 120% e desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*) $\leq 20\%$. Corresponde ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco), com base em uma curva analítica, onde o LOQ é o menor nível em que existe uma resposta com precisão e exatidão satisfatórias (INMETRO, 2020).

2.5.7 Exatidão

Para determinar a exatidão de um método analítico deve-se obter o grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. O parâmetro exatidão pode ser considerado dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, sendo assim, sempre aparece associado a valores de precisão. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são o uso de materiais de referência, a comparação de métodos, adição padrão e o uso de ensaios de recuperação. No último caso, a exatidão é obtida com a relação percentual de recuperação da matriz branco fortificada, podendo ser calculada através da Equação 3 (BRASIL, 2017; RIBANI *et al.*, 2004):

$$Recuperação (\%) = \frac{\text{Concentração Média das Medidas de Fortificação}}{\text{Concentração Nominal da Fortificação}} \times 100 \quad (3)$$

2.5.8 Precisão

Na precisão de um método analítico avalia-se a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras similares ou padrões, sob condições já definidas. Este parâmetro é expresso comumente por três maneiras, por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade. A precisão é usualmente expressa pelo desvio padrão e coeficiente de variação. Na avaliação da precisão, quanto maior o número de replicatas, melhor é a avaliação da dispersão do método (INMETRO, 2020).

O coeficiente de variação (CV, expresso em %), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR) ou RSD, é calculado de acordo com a Equação 4:

$$CV = DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada.

A repetitividade do método é a medição num conjunto de condições, as quais incluem o mesmo procedimento de medição, os mesmos analistas, as mesmas condições de operação e o mesmo local, assim como medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares durante um curto período de tempo (INMETRO, 2020).

No entanto, a precisão intermediária consiste na precisão avaliada sob condições que compreendem o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares. Nesse estudo, devem-se variar uma ou mais condições como, analistas, equipamentos e/ou tempo. O valor de precisão intermediária é função do nível de concentração do ensaio e o seu cálculo é efetuado a partir dos resultados obtidos, após eliminação dos resultados discrepantes. A visualização gráfica dos valores também pode ser útil para identificá-los (INMETRO, 2020).

Porém, a reprodutibilidade não é um componente de validação de método executado por um único laboratório, contudo, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial (INMETRO, 2020).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental do presente trabalho baseia-se na otimização e validação de um método de preparo de amostra utilizando o método QuEChERS para a extração multirresíduo de agrotóxicos em mamão e posterior determinação por UHPLC-MS/MS. O trabalho foi realizado no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (DQ-UFSM).

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos que foram utilizados durante a elaboração deste trabalho estão listados a seguir:

- Agitador do tipo vórtex multi-tubos (Fisher Scientific, Reino Unido);
- Agitador vórtex - Biomixer QL-901 (Microtécnica, Brasil) e Phoenix, modelo AP56 (Brasil);
- Balança analítica, modelo APX-200 (Denver Instruments, EUA), modelo AUW 220D (Shimadzu, Japão) e modelo UX-420H (Shimadzu, Japão);
- Banho ultrassônico, linha Sonorex modelo RK510 (Bandelin, Alemanha);
- Centrífuga (Centribio, Brasil) e centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand – Alemanha e Eppendorf - Canadá);
- Mixer vertical – Black+Decker modelo Sb55 (Black & Decker, EUA);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct 3UV® (Millipore, França);
- Sistema UHPLC-MS/MS Waters (EUA) equipado com:
 - Cromatógrafo líquido ACQUITY com sistema binário de bomba para operação de gradientes de alta pressão;
 - Coluna analítica ACQUITY UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm d.i., 1,7 µm) Waters (EUA);
 - Detector MS do tipo triplo quadrupolo, modelo Xevo TQ;
 - Interface/fonte de ionização por eletronebulização (ESI);
 - Compressor de ar Atlas Copco (Bélgica);

- Gerador de nitrogênio PEAK NM30L-MS (Peak Scientific, Escócia);
- Sistema de aquisição de dados através do software MassLynx 4.2 (Waters, EUA).

3.2 REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS

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

- Acetato de etila para análises EMSURE® (Merck, Alemanha)
- Acetato de sódio anidro p.a. (J. T. Baker, EUA);
- Acetonitrila, grau HPLC (Supelco, Alemanha);
- Ácido acético glacial 100% (J. T. Baker, EUA);
- Ácido fórmico ≥ 98% (Sigma Aldrich, EUA);
- Água ultrapurificada em sistema Milli-Q Direct 3UV® resistividade de 18,2 MΩ cm (Millipore, França);
- Alumina 100-125 mesh (Sigma Aldrich, EUA);
- Amina primária e secundária (PSA), partícula de 50 µm (Supelco, Alemanha);
- Argônio grau de pureza 5.0 (Air Liquide, Brasil);
- Bondesil C18 (octadecilsilano) com tamanho de partícula de 40 µm (Supelco, EUA)
- Bondesil PSA com tamanho de partícula de 40 µm (Supelco, EUA);
- Carvão ativado (Agilent Technologies, EUA):
- Carvão grafitizado (GCB), Supelclean ENVI-Carb, não poroso, área superficial 100 m²/g; tamanho de partícula 120/400 mesh (Supelco, EUA);
- Celite® 521 Terra diatomácea (Sigma Aldrich, EUA);
- Citrato de sódio diidratado, pureza ≥ 99% (Sigma-Aldrich, EUA);
- Cloreto de sódio p.a. (Dinâmica, Brasil);
- EMR-Lipid (Agilent Technologies, EUA);
- Extran® neutro (Merck, Brasil);
- Fase fluorada, 35-70 µm, diâmetro de poro 60 nm, 9% de carbono (Instituto de Química da UNICAMP, Campinas-SP, Brasil);
- Filtros de nylon de 13 mm e porosidade de 0,22 µm (Nova Analítica, Brasil);
- Florisil® (Sigma-Aldrich, Brasil).

- Formiato de amônio (Sigma Aldrich, EUA);
- Frascos de vidro (vial), capacidade de 2 mL (Analítica, Brasil);
- Frascos de vidro, capacidade de 4 mL (Agilent, EUA)
- Hidrogenocitrato de sódio sesquiidratado, pureza $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, EUA);
- Metanol, grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Microtubos tipo Eppendorf, capacidade de 2 mL (Labcon, EUA);
- Bond Elut Nexus (Agilent Technologies, EUA);
- Nitrogênio grau de pureza 5.0 (analítico) (Air Liquide, Brasil);
- Oasis HLB (Waters, Irlanda);
- Padrões sólidos dos compostos em estudo (Tabela 7);
- Propilamino (NH_2) (Agilent Technologies, EUA):
- Quitosana (obtida e caracterizada no laboratório de Operações unitárias da Escola de Química e Alimentos da FURG, a partir de resíduos de camarão rosa *Farfantepenaeus brasiliensis*), 62-76 μm (Rio Grande, Brasil);
- Quitosana de casca de camarão (Sigma-Aldrich, Islândia);
- Quitosana de casca de caranguejo (Sigma-Aldrich, Japão);
- Silica Bond Elut SI (Agilent Technologies, EUA):
- Sílica gel 50 μm (Sigma-Aldrich, EUA);
- Strata SDB-L (Phenomenex, EUA);
- Strata-X (Phenomenex, EUA);
- Sulfato de magnésio anidro p.a. (J. T. Baker, EUA);
- SupelTM QuE Z-Sep+ (Sigma Aldrich, EUA);
- Terra diatomácea (Sigma Aldrich, EUA);
- Tubos de polipropileno, com tampas de rosca, de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- Vidraria comum de laboratório;
- Zeólita (Sigma Aldrich, EUA).

3.3 AMOSTRAS DE MAMÃO

A amostra de mamão empregada como “branco analítico”, que foi utilizada na otimização e validação do método de preparo de amostra proposto, foi adquirida da produção orgânica local. Os mamões foram acondicionados na geladeira até o momento do seu processamento. Foi realizada uma avaliação aplicando a técnica de UHPLC-MS/MS, confirmando a ausência de resíduos dos agrotóxicos em estudo.

O método desenvolvido foi aplicado na análise de 18 amostras de mamão, oriundas de supermercados, fruteiras e feiras do município de Santa Maria, no estado do Rio Grande do Sul, conforme a Tabela 7, onde estão identificadas as variedades e origem da coleta.

Tabela 7 – Amostras de mamão avaliadas no presente estudo, sua variedade e origem de coleta

Identificação	Variedade	Origem da coleta
A 1	Formosa	Fruteira
A 2	Formosa	Fruteira
A 3	Papaya	Supermercado
A 4	Papaya	Feira
A 5	Formosa	Feira
A 6	Papaya	Supermercado
A 7	Papaya	Fruteira
A 8	Formosa	Fruteira
A 9	Formosa	Supermercado
A 10	Formosa	Supermercado
A 11	Papaya	Fruteira
A 12	Papaya	Fruteira
A 13	Formosa	Supermercado
A 14	Papaya	Feira
A15	Papaya	Supermercado
A16	Papaya	Feira
A17	Formosa	Supermercado
A18	Formosa	Supermercado

Fonte: o autor, 2022.

Para o processamento dos mamões, uma porção de 1 kg de cada amostra, onde foi retirada apenas o pedúnculo, foi cortada em pedaços a polpa juntamente com a casca e as sementes, que foram então, processadas em um *mixer* de alimentos. Os processados foram acondicionados em frascos de polipropileno, e armazenados em

freezer, a uma temperatura em torno de ≤ -10 °C. Ainda, para a realização dos ensaios, aguardou-se até que as amostras atingissem temperatura ambiente (25 °C).

3.4 COMPOSTOS SELECIONADOS E PREPARO DE SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Os agrotóxicos selecionados neste trabalho foram selecionados, principalmente, de acordo com os compostos que possuem LMRs, baseada em legislações vigentes para a matriz (UE e Codex Alimentarius), nos compostos de uso permitido na cultura do mamão no Brasil (ANVISA, 2022a) e com base na relação de padrões dos compostos disponíveis no laboratório. Para serem determinados neste trabalho, foram selecionados 110 agrotóxicos de diferentes classes: inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, entre outros. Com o objetivo de complementar o método, foram determinados os compostos que foram detectados com maior frequência nas análises de rotina executadas no LARP.

Os padrões analíticos selecionados e utilizados apresentam pureza maior que 90% e foram adquiridos das empresas Agilent (EUA), Sigma-Aldrich (EUA), LGC Standards (Alemanha), ChemService (EUA) e SPEX CertiPrep (EUA), e estão listados na Tabela 8, juntamente com demais informações pertinentes, dentre elas: classe agrônômica, grupo químico, pureza e suas características físico-químicas.

Foram utilizadas soluções estoques individuais de cada composto com o volume de 10 mL na concentração aproximada de 1000 mg L^{-1} a partir dos padrões analíticos, considerando a pureza de cada um deles, a massa a ser pesada e realizando a dissolução no solvente adequado (acetoneitrila, metanol, água ou outro). A partir dessas soluções, foi preparada uma solução mistura (*mix*), contendo todos os compostos do estudo (conforme Tabela 8), na concentração de 5 mg L^{-1} , diluída em acetoneitrila, armazenada em frascos âmbar e sob refrigeração (≤ -10 °C).

Esta mistura de compostos foi utilizada para a fortificação nas amostras “branco” e também para o preparo das curvas analíticas no extrato da matriz e no solvente. Para injeção no sistema UHPLC-MS/MS as concentrações finais das curvas analíticas foram 0,5; 1; 2, 5, 10 e $20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 8 – Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido e propriedades físico-químicas.

(continua)

Nº	Compostos	Classe (s)	Grupo Químico	Pureza (%)	Fórmula molecular	pKa	log Kow	Koc (mg L ⁻¹)	Solubilidade (mg L ⁻¹)
1	Acetamiprido	Inseticida	Neonicotinoide	99	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	0,7	0,8	20	29,50
2	Acibenzolar-S-metil	Fungicida	Benzotiadiazol	97	C ₈ H ₆ N ₂ OS ₂	-	3,1	1200	7,7
3	Aldicarbe	Inseticida	Carbamato	99	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	-	1,15	36	4930
4	Ametrina	Herbicida	Triazina	98,2	C ₉ H ₁₇ N ₅ S	4,1	2,63	96	1,8 10 ³
5	Atrazina	Herbicida	Triazina	98,1	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	1,7	2,61	122	30
6	Azinfós etílico	Inseticida	Organofosforado	97,7	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS ₂	-	3,4	237,1	8,25
7	Azinfós metílico	Inseticida	Organofosforado	99	C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃ PS ₂	5	2,53	69,7	43,54
8	Azoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	99,2	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	0,94	2,5	740,2	11,61
9	Bitertanol	Fungicida	Triazol	99	C ₁₉ H ₁₇ N ₄ NaO ₈	3,35	1,03	302	64000
10	Boscalida	Fungicida	Anilida	99	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₂	-	4,11	-	3,8
11	Bromuconazol	Fungicida	Triazol	99,5	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	10,7	4	3,74 10 ⁷	2,61
12	Buprofezina	Inseticida e acaricida	Tiadiazinona	99,3	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS	0,38	4,3	5741	2,43
13	Carbaril	Inseticida	Metilcarbamato de naftila	100	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	10,4	2,36	241,7	416,2
14	Carbendazim	Fungicida	Benzimidazol	98,5	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	4,2	1,55	175,8	2441
15	Carbofurano	Inseticida, cupinicida, acaricida e nematocida	Metilcarbamato de benzofuranila	99	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	3,78	2,32	70,85	353,9
16	Carbofurano-3-OH	Metabolito do carbofurano	Carbamato	97	C ₁₂ H ₁₅ NO ₄	3,6	0,76	10	62000
17	Carboxim	Fungicida	Oxatina	99,5	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ S	0,5	2,14	79,96	423,7
18	Cianazina	Herbicida	Triazina	99	C ₉ H ₁₃ ClN ₆	12,9	2,22	123,8	183,8
19	Ciantraniliprole	Inseticida	Carboxamida	97,5	C ₁₉ H ₁₄ BrClN ₆ O ₂	-	3,18	-	-
20	Cimoxanil	Fungicida	Cianoacetamida oxima	97	C ₇ H ₁₀ N ₄ O ₃	9,3	4,24	38	10,62
21	Ciprodinil	Fungicida	Anilinopirimidina	99,9	C ₁₄ H ₁₅ N ₃	4,44	4	-	13
22	Cletodim	Herbicida	Oxima ciclohexanodiona	90	C ₁₇ H ₂₆ ClNO ₃ S	4,47	4,14	-	5450
23	Clomazone	Herbicida	Isoxazolidinona	98,5	C ₁₂ H ₁₄ ClNO ₂	-	2,5	4770	197,5
24	Clorantranilipole	Inseticida	Antranilamida	94	C ₁₈ H ₁₄ BrCl ₂ N ₅ O ₂	10,8	3,98	2724	0,37
25	Clorimurom etílico	Herbicida	Sulfonilureia	99,5	C ₁₅ H ₁₅ ClN ₄ O ₆ S	4,2	2,5	78,19	18,15

Tabela 8 – Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido e propriedades físico-químicas.

(continuação)									
Nº	Compostos	Classe (s)	Grupo Químico	Pureza (%)	Fórmula molecular	pKa	log Kow	Koc (mg L ⁻¹)	Solubilidade (mg L ⁻¹)
26	Clorpirifós	Inseticida	Organofosforado	99,9	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	4,55	4,96	6829	0,36
27	Clorpirifós metílico	Acaricida e inseticida	Organofosforado	99,9	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	-	4,31	2008	1,89
28	Clorprofam	Herbicida	Carbamato	99,5	C ₁₀ H ₁₂ ClNO ₂	14,5	3,79	470	110
29	Cresoxim metílico	Fungicida	Estrobilurina	98	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	-	3,4	3,8	2
30	Deltametrina	Inseticida e formicida	Piretróide	99,6	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	10,6	6,2	1,02 10 ⁷	0,0002
31	Diazinona	Inseticida	Organofosforado	97,5	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	2,6	3,81	1337	6,45
32	Difenoconazol	Fungicida	Triazol	99	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	1,07	4,3	2,43 1	0,6
33	Dimetoato	Inseticida e acaricida	Organofosforado	99,4	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	2	0,28	24,52	66000
34	Dimetomorfe	Fungicida	Morfolina	99	C ₂₁ H ₂₂ ClNO ₄	1,30	2,63	1,36	41,8
35	Diuron	Herbicida	Uréia	97,5	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	7,8	-	-	0,42
36	Epoxiconazol	Fungicida	Triazol	98,5	C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O	-	-	-	0,66
37	Espinetoram	Inseticida	Espinosinas	97,9	C ₄₂ H ₆₉ NO ₁₀	9,17	-	-	-
38	Espinosade A	Inseticida	Espinosinas	91	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₀	8,10	3,91	-	235
39	Espinosade D	Inseticida	Espinosinas	93	C ₄₂ H ₆₇ NO ₁₀	7,87	4,38	-	0,332
40	Espirodiclofeno	Inseticida e acaricida	Cetoenol	98	C ₂₁ H ₂₄ Cl ₂ O ₄	-	-	-	-
41	Espiromesifeno	Inseticida	Cetoenol	98,94	C ₂₃ H ₃₀ O ₄	-	4,55	-	0,13
42	Etefon	Regulador de crescimento	Gerador de etileno	96	C ₂ H ₆ ClO ₃ P	2,5	-0,22	608	1 10 ⁶
43	Etofemproxi	Inseticida	Piretróide	98	C ₂₅ H ₂₈ O ₃	-	6,9	-	0,0225
44	Famoxadona	Fungicida	Oxazolidinonas	99,0	C ₂₂ H ₁₈ N ₂ O ₄	10	4,65	3890	0,052
45	Fenpiroximato	Acaricida	Pirazol	95,4	C ₂₄ H ₂₇ N ₃ O ₄	-	5,01	12000	0,023
46	Fempropimorfe	Fungicida	Morfolina	94,5	C ₂₀ H ₃₃ NO	6,98	3,3	2937	19
47	Fenamidona	Fungicida	Imidazol	96	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ OS	-	2,8	2352	7,8
48	Fenamifós	Inseticida	Organofosforado	93	C ₁₃ H ₂₂ NO ₃ PS	10,5	3,23	1686	400
49	Fenarimol	Fungicida	Pirimidinil carbinol	99	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	-	3,62	3786	14
50	Fentiona	Inseticida, formicida, acaricida e cupinicida	Organofosforado	95,5	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	-	4,09	-	2

Tabela 8 – Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido e propriedades físico-químicas.

(continuação)									
Nº	Compostos	Classe (s)	Grupo Químico	Pureza (%)	Fórmula molecular	pKa	log Kow	Koc (mg L ⁻¹)	Solubilidade (mg L ⁻¹)
51	Fipronil	Pirazol	Inseticida, formicida e cupinicida	96,7	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS	-	4	-	3,78
52	Fluopicolida	Fungicida	Benzamida piridina	95	C ₁₄ H ₈ Cl ₃ F ₃ N ₂ O	-	3,26	373	2,8
53	Flupiradifurona	Inseticida	Butenolida	99,8	C ₁₂ H ₁₁ ClF ₂ N ₂ O ₂	-	1,2	-	3200
54	Fluquinconazol	Fungicida	Triazol	98,5	C ₁₆ H ₈ Cl ₂ FN ₅ O	0,9	3,24	870	1,15
55	Flutolanil	Fungicida	Carboxamida	99,5	C ₁₇ H ₁₆ F ₃ NO ₂	-	3,7	680	6,53
56	Flutriafol	Fungicida	Triazol	99,5	C ₁₆ H ₁₃ F ₂ N ₃ O	2,3	23	292	95,0
57	Fluxaproxade	Fungicida	Carboxamida	96,5	C ₁₈ H ₁₂ F ₅ N ₃ O	12,58	3,06	1240	2,44
58	Formetanato	Inseticida e acaricida	Metilcarbamato de fenila	98	C ₁₁ H ₁₅ N ₃ O ₂	8,1	-	616	822000
59	Fostiazato	Inseticida e nematicida	Organofosforado	97	C ₉ H ₁₈ NO ₃ PS ₂	-	1,68	71	9850
60	Hexitiazoxi	Acaricida	Tiazolidinacarboxamida	99	C ₁₇ H ₂₁ ClN ₂ O ₂ S	-	5,57	6200	0,5
61	Imazali	Fungicida	Imidazol	97,5	C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O	6,53	-	2080	0,22
62	Imidacloprido	Inseticida	Neonicotinoide	98,5	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	11,1	0,76	300	580
63	Indoxacarbe	Inseticida e formicida	Oxadiazina	99	C ₂₂ H ₁₇ ClF ₃ N ₃ O ₇	-	4,65	8100	0,20
64	Iprovalicarbe	Fungicida	Carbamato	98	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₃	-	3,18	106	17,8
65	Linuron	Herbicida	Uréia	99,4	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	12,1	3,2	860	75
66	Malationa	Acaricida e inseticida	Organofosforado	99	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	6,8	2,7	1800	143
67	Mandipropamida	Fungicida	Éter mandelamida	97,5	C ₂₃ H ₂₂ ClNO ₄	-	3,2	1294	4,2
68	Mecarbam	Acaricida e inseticida	Organofosforado	98	C ₁₀ H ₂₀ NO ₅ PS ₂	-	-	2,31	-
69	Mepronil	Fungicida	Carboxamida	99	C ₁₇ H ₁₉ NO ₂	-	3,66	974	12,7
70	Metalaxil	Fungicida	Acilalaninato	99,5	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	-	1,71	163	8,41
71	Metconazol	Acaricida e inseticida	Itraconazol	99,5	C ₁₇ H ₂₂ ClN ₃ O	11,3	3,85	1,71	30,4
72	Metiocarbe	Inseticida, moluscicida e repelente de passaros	Metilcarbamato de fenila	99	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S	-	3,1	655	27
73	Metomil	Acaricida e inseticida	Metilcarbamato de oxima	99	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	-	0,09	43	5,5 10 ⁴
74	Metsulfurom metílico	Herbicida	Sulfolinuréia	99	C ₁₄ H ₁₅ N ₅ O ₆ S	3,3	0,02	57	172
75	Monocrotofós	Inseticida	Organofosforado	98	C ₃₆ H ₆₂ O ₁₁	6,6	5,43	-	3,0x10 ⁻³

Tabela 8 – Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido e propriedades físico-químicas.

(continuação)									
Nº	Compostos	Classe (s)	Grupo Químico	Pureza (%)	Fórmula molecular	pKa	log Kow	Koc (mg L ⁻¹)	Solubilidade (mg L ⁻¹)
76	Monolinuron	Herbicida	Uréia	99,5	C ₇ H ₁₄ NO ₅ P	-	0,22	19	8,1x10 ⁵
77	Novalurom	Inseticida	Benzoiluréia	98	C ₁₇ H ₉ ClF ₈ N ₂ O ₄	-	5,27	-	0,95
78	Oxamil	Acaricida, inseticida e nematocida.	Carbamato	99	C ₇ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	12,4	0,44	17	1,5x10 ⁵
79	Picoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	98,5	C ₁₈ H ₁₆ F ₃ NO ₄	-	3,6	898	3,1
80	Piraclostrobina	Fungicida	Estrobilurina	97,5	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	-	3,99	9300	20
81	Pirazofós	Fungicida e inseticida	Fosforotioato de heterociclo	97	C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₅ PS	-	3,8	646	4,2
82	Piridabem	Inseticida e acaricida	Piridazinona	99	C ₁₉ H ₂₅ ClN ₂ OS	-	6,37	66503	0,02
83	Piridafentiona	Inseticida e acaricida	Organofosforado	99	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₄ PS	-	3,1	7211	100
84	Pirimetamil	Fungicida	Anilopirimidina	99,5	C ₁₂ H ₁₃ N ₃	3,52	2,84	301	121
85	Pirimicarbe	Inseticida	Dimetilcarbamato	99,3	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	4,44	1,7	388	31000
86	Pirimifós metílico	Inseticida e acaricida	Organofosforado	97,6	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	4,3	4,2	1100	11
87	Piriproxifem	Inseticida	Éter piridiloxipropílico	99,9	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃	6,87	5,37	-	0,37
88	Propamocarbe	Fungicida	Carbamato	96,5	C ₉ H ₂₀ N ₂ O ₂	9,48	1,12	100	9 10 ⁵
89	Propargito	Acaricida	Sulfito de alquila	94,5	C ₁₉ H ₂₆ O ₄ S	-	5,7	-	0,215
90	Propiconazol	Fungicida	Triazol	97,5	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	1,09	3,72	656	100
91	Propoxur	Inseticida	Carbamato	99,9	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃	-	1,56	30	18000
92	Quinoxifem	Fungicida	Fenoxiquinolona	99	C ₁₅ H ₈ Cl ₂ FNO	-	4,66	22929	0,05
93	Saflufenacil	Herbicida	Uracila	99	C ₁₇ H ₁₇ ClF ₄ N ₄ O ₅ S	4,41	2,57	368,2	2100
94	Simazina	Herbicida	Triazina	98	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	1,62	2,1	340	6
95	Tebufenozida	Inseticida	Diacilhidrazina	99	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂	-	4,25	35000	0,83
96	Teflubezurom	Inseticida	Benzoiluréia	96,5	C ₁₄ H ₆ Cl ₂ F ₄ N ₂ O ₂	8,16		26062	0,02
97	Terbufós	Inseticida e nematocida	Organofosforado	99	C ₉ H ₂₁ O ₂ PS ₃	-	4,48	500	4,5
98	Terbutilazina	Herbicida	Triazina	99,5	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	2	3,21	219	6,6
99	Tiabendazol	Fungicida	Benzimidazol	99	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	-	2,39	2500	30
100	Tiacloprido	Inseticida	Neonicotinoide	98	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	-	-	615	184
101	Tiametoxam	Inseticida	Neonicotinoide	99,5	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	-	0,13	64	41000
102	Tiodicarbe	Inseticida	Metilcarbamato de oxima	97,4	C ₁₀ H ₁₈ N ₄ O ₄ S ₃	-	1,62	418	22

Tabela 8 – Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido e propriedades físico-químicas.

(conclusão)									
Nº	Compostos	Classe (s)	Grupo Químico	Pureza (%)	Fórmula molecular	pKa	log Kow	Koc (mg L ⁻¹)	Solubilidade (mg L ⁻¹)
103	Tiofanato metílico	Fungicida	Benzimidazol (precursor de)	99	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S ₂	7,38	1,5	225	25
104	Tolcofós metílico	Fungicida	Organofosforado	99	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ O ₃ PS	-	4,56	-	0,708
105	Triadimenol	Fungicida	Triazol	98,5	C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃ O ₂	-	3,08	273	72
106	Triazofós	Inseticida, acaricida e nematocida	Organofosforado	98,5	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS	-	3,34	358	35
107	Trifloxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	98,8	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄	-	4,5	2377	0,61
108	Triflumurom	Inseticida	Benzoiluréia	99	C ₁₅ H ₁₀ ClF ₃ N ₂ O ₃	-	4,91	11891	0,04
109	Vamidationa	Inseticida	Organofosforado	98	C ₈ H ₁₈ NO ₄ PS ₂	-	-	70	4 10 ⁶
110	Zoxamida	Inseticida	Organofosforado	95	C ₁₄ H ₁₆ Cl ₃ ON ₂	3,76	5,06	1240	18

Fonte: adaptado (2022). Legenda: pKa - logaritmo negativo da constante de acidez do composto (Ka); log Kow - coeficiente de partição octanol/água; Koc - constante de sorção - teor de carbono orgânico; Solubilidade: em água a 25 °C.

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

Com a finalidade de assegurar a execução correta do procedimento de extração e de determinação para as amostras avaliadas no sistema cromatográfico e auxiliar na localização de fontes de erro, podem ser adicionados padrões em diferentes estágios do procedimento analítico (SANTE, 2015). Conforme a SANTE (2019), o padrão interno (PI) e o padrão de controle (PC) são substâncias químicas adicionadas nas amostras e no extrato final, em concentrações conhecidas.

A fim de verificar o desempenho da análise cromatográfica, utilizou-se a adição do composto trifenilfosfato (Sigma Aldrich, EUA) como padrão interno (PI) nas soluções a serem analisadas no sistema cromatográfico, sendo aceito valores de variação de área de até 20% (SANTE, 2019). Este padrão foi aplicado na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, ou seja, adição de $2 \mu\text{L}$ de uma solução de concentração 5 mg L^{-1} , previamente preparada em acetonitrila. Ainda, de forma a garantir a eficiência do procedimento de extração, foi utilizado atrazina d-5 como PC. A solução do PC deuterado foi preparada em acetonitrila na concentração de 10 mg L^{-1} e foi adicionada previamente a etapa de extração dos analitos, na mesma concentração empregada para avaliação dos ensaios de recuperação (0,5; 1; 2; 10 e $20 \mu\text{g L}^{-1}$).

3.6 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MAMÃO

3.6.1 Escolha da fase móvel

Uma das etapas mais importantes do processo cromatográfico é a escolha da fase móvel, pois esta possui influência significativa no sinal analítico e na separação adequada dos analitos. Portanto, a escolha da fase móvel foi realizada, tendo em vista os compostos selecionados para esse estudo e através de otimizações de métodos do LARP-UFSM que são realizados na rotina para diversos compostos e matrizes com eficácia. Após testes, foi verificado que utilizando água:metanol (98:2, v/v) como fase móvel A e metanol:água (98:2, v/v) como fase móvel B, ambas contendo 5 mmol L^{-1} de formiato de amônio e ácido fórmico 0,1% (v/v) apresentou os melhores resultados, conforme a Tabela 9.

Tabela 9 - Gradiente de fase móvel utilizado na determinação de resíduos de agrotóxicos em mamão por UHPLC-MS/MS.

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

Fonte: A autora (2022).

3.6.2 Condições utilizadas no sistema UHPLC-MS/MS

As condições de um sistema para as análises cromatográficas necessita ser otimizado com o propósito de garantir um melhor resultado na análise das massas dos íons precursores e produtos, utilizando as condições necessárias e favoráveis, de acordo com a classe química dos compostos. Sendo assim, as condições gerais utilizadas foram estabelecidas através de métodos otimizados LARP-UFSM e são amplamente utilizadas em análises de rotina para diferentes compostos e matrizes. A Tabela 10 apresenta as condições do sistema de análise.

Tabela 10 – Condições cromatográficas do sistema UHPLC-MS/MS

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

Fonte: A autora (2022).

3.7 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MAMÃO UTILIZANDO UHPLC-MS/MS

3.7.1 Testes iniciais

Os testes iniciais para o método de preparo de amostra para determinação de agrotóxicos em mamão proposto neste trabalho foram desenvolvidos levando em consideração trabalhos da literatura para determinação multirresíduos de agrotóxicos mamão e frutas. Foram realizados testes com as três versões do método QuEChERS: original (ANASTASSIADES *et al.*, 2003); acetato (LEHOTAY *et al.*, 2005) e citrato (ANASTASSIADES *et al.*, 2007). Com o propósito de avaliar o método mais eficaz de preparo de amostra, para isto foi avaliado o número de compostos que apresentaram resultados aceitáveis de recuperação, entre 70 e 120% e com RSD ≤ 20% (SANTÉ, 2019). Na Tabela 11 são apresentados os resumos dos testes avaliados.

Foram realizados os testes T1, T2 e T3 utilizando a amostra “branco” de mamão. Os testes foram realizados em triplicata, com ensaios de fortificação no nível de 10 µg L⁻¹, equivalentes a 50 µg kg⁻¹ na amostra. A fim de avaliar a interferência da matriz, foi realizada a etapa de adição de padrão nas amostras antes (FA, fortificação na amostra) e após o procedimento de extração (PA, padrão na amostra). Os extratos de FA e PA foram filtrados utilizando filtros de *nylon* de 13 mm e porosidade de 0,2 µm e, após, diluídos 5 vezes em água ultrapura antes da injeção no sistema cromatográfico. O cálculo de recuperação foi realizado de acordo com a Equação 5.

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{X_1}{X_2} \right) \times 100 \quad (5)$$

Onde:

X₁ = média da áreas do composto na fortificação da amostra;

X₂ = média das áreas do composto no extrato da amostra.

Além disto, foi avaliada a presença de coextrativos existentes no extrato “branco” da matriz, onde foram considerados significativos para valores maiores que ±20% (SANTÉ, 2019). Para tanto, foram comparadas as áreas (resposta cromatográfica) obtidas com soluções analíticas preparadas no solvente (acetonitrila),

também com diluições de 5 vezes, e as áreas das soluções analíticas preparadas no extrato da matriz dos testes T1, T2 e T3. O cálculo do efeito matriz foi realizado através da Equação 6(SANTE, 2019).

$$EM(\%) = \left(\frac{X_1}{X_2} - 1 \right) \times 100 \quad (6)$$

Onde:

X_1 = média das áreas do composto no extrato da amostra

X_2 = média das áreas do composto na solução preparada em solvente (acetonitrila)

3.7.2 Avaliação do uso de sorventes na etapa de limpeza

Inicialmente, foi realizada a avaliação visual da eficiência de limpeza dos extratos de 22 diferentes sorventes utilizando o método QuEChERS Original, conforme os testes T4 a T25 da Tabela 11.

Após a seleção visual dos sorventes que proporcionaram a melhor eficiência da remoção de pigmentos, avaliou-se o comportamento dos sorventes na efetividade de limpeza do extrato final. Para tal, utilizou-se o nível de fortificação na amostra (FA) de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (considerando a diluição de 5 vezes do extrato), em triplicata, utilizando a amostra de “branco” de mamão, avaliando o número de compostos que apresentaram resultados aceitáveis de recuperação (70 a 120%) e acordo com a Equação 5, aplicando etapas de FA e PA. Para o efeito matriz foi calculado através da Equação 6.

Para a escolha do melhor sorvente na etapa de limpeza foi selecionado o que apresentou o maior número de compostos recuperados na faixa conveniente de recuperação e, ainda, o menor efeito matriz em cada teste a partir das áreas das soluções analíticas que foram preparadas em solvente e no extrato “branco” da matriz. Foram avaliados nos testes os seguintes sorventes para a etapa de limpeza do extrato por d-SPE: carvão ativado (T6), carvão grafitizado (GCB) (T7), Oasis HLB (T13), Strata SDB-L (T21), Strata-X (T22) e C18 (T5).

Tabela 11 - Testes realizados para análise dos compostos selecionados para análise de resíduos de agrotóxico em mamão

(continua)

Teste	Método	Extração	Partição	Limpeza de extrato (1 mL de sobrenadante)	Diluição (água ultrapura)
T1	QuEChERS Original	10 g de amostra + 10 mL de ACN	4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl		
T2	QuEChERS Acetado	15 g de amostra + 15 mL de ACN 1% ác. acético	6 g MgSO ₄ + 1,5 g CH ₃ COONa	150 mg MgSO ₄ + 25 mg PSA	5 vezes
T3	QuEChERS Citrato	10 g de amostra + 10 mL de ACN	4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl + 1 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O + 0,5 g C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ .1,5H ₂ O		
T4				150 mg MgSO ₄ + 25 mg de alumina	
T5				150 mg MgSO ₄ + 25 mg C18	
T6				150 mg MgSO ₄ + 10 mg de carvão ativado	
T7				150 mg MgSO ₄ + 10 mg de GCB	
T8				150 mg MgSO ₄ + 25 mg Celite 521 Terra diatomácea	
T9				150 mg MgSO ₄ + 25 mg EMR-Lipid	
T10	QuEChERS Original	10 g de amostra + 10 mL de ACN	4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	150 mg MgSO ₄ + 25 mg Fase fluorada	5 vezes
T11				150 mg MgSO ₄ + 25 mg Florisil	
T12				150 mg MgSO ₄ + 25 mg Nexus	
T13				150 mg MgSO ₄ + 25 mg Oasis HLB	
T14				150 mg MgSO ₄ + 25 mg Propilamino (NH ₂)	
T15				150 mg MgSO ₄ + 25 mg PSA	

Tabela 11 - Testes realizados para análise dos compostos selecionados para análise de resíduos de agrotóxico em mamão.

					(conclusão)
Teste	Método	Extração	Partição	Limpeza de extrato (1 mL de sobrenadante)	Diluição (água ultrapura)
T16				150 mg MgSO ₄ + 25 mg Quitosana (FURG)	
T17				150 mg MgSO ₄ + 25 mg Quitosana de casca de camarão	
T18				150 mg MgSO ₄ + 25 mg Quitosana de casca de caranguejo	
T19				150 mg MgSO ₄ + 25 mg Silica BondElut	
T20	QuECERS Original	10 g de amostra + 10 mL de ACN	4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	150 mg MgSO ₄ + 25 mg Silica gel	5 vezes
T21				150 mg MgSO ₄ + 25 mg Strata SDB-L	
T22				150 mg MgSO ₄ + 25 mg Strata X	
T23				150 mg MgSO ₄ + 25 mg Supel QuE Z-Sep+	
T24				150 mg MgSO ₄ + 25 mg Terra diatomácea	
T25				150 mg MgSO ₄ + 25 mg Zeólita	

Fonte: A autora (2022).

3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MAMÃO

A validação de métodos analíticos é muito relevante e possui grande importância, tanto por razões comerciais, tendo em vista que são pré-requisitos para a certificação de análises, quanto por razões científicas, pois produzem resultados confiáveis na transferência entre laboratórios (RIBANI *et al.*, 2004).

No Brasil, o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelecem guias para a validação de métodos analíticos. A validação deve garantir que o método forneça resultados confiáveis. De modo geral, os principais parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, curva analítica, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão avaliada através de ensaios de recuperação e avaliação do efeito matriz (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020; SANTÉ, 2019; ZANELLA *et al.*, 2015).

Esses parâmetros são descritos na Tabela 12, juntamente com suas definições e aplicações.

Tabela 12 – Parâmetros de métodos analíticos avaliados na validação do método, com respectivas formas de aplicação, equações (quando aplicável) e critérios de aceitação.

(continua)

Parâmetro	Aplicação	Equações	Critério	Referência
Seletividade	Comparação dos cromatogramas obtidos para extratos de amostra “branco analítico” e “branco analítico” fortificado	-	Ausência de picos de interferentes nos tempos de retenção dos analitos de interesse.	SANTÉ, 2019
Linearidade	Injeção em triplicata da curva analítica. Avaliação do coeficiente de determinação (r^2)	Equação 1: $y = ax + b$ Onde: y = resposta medida (área do pico); x = concentração; a = coeficiente angular - inclinação da curva analítica = sensibilidade; b = coeficiente linear - intersecção com o eixo y, quando x = 0	$r^2 \geq 0,99$	INMETRO, 2020
Efeito Matriz	Comparação entre as inclinações das curvas analíticas dos padrões, preparadas no solvente (acetonitrila) e aquelas obtidas com soluções analíticas preparadas no extrato da matriz	Equação 6: $EM (\%) = \left(\frac{X_1}{X_2} - 1\right) \times 100$ Onde: X_1 = Coeficiente angular da curva na matriz. X_2 = Coeficiente Angular da curva no solvente	em $\geq \pm 20\%$	SANTÉ, 2019
Limite de quantificação (LOQ)	Menor concentração que, fortificada na matriz (n= 6), apresente resultados aceitáveis de exatidão e precisão	-	Recuperações 70 - 120% e RSD $\leq 20\%$.	INMETRO, 2020; ANVISA, 2017

Tabela 12 - Parâmetros de métodos analíticos avaliados na validação do método, com respectivas formas de aplicação, equações (quando aplicável) e critérios de aceitação.

Parâmetro	Aplicação	Equações	Critério	Referência (conclusão)
Limite de detecção (LOD)	A menor quantidade do analito que pode ser detectada, mas não quantificada, Calculado a partir do limite de quantificação	Equação 2: $LOD = \frac{LOQ}{3,33}$ Onde: LOQ = limite de quantificação	-	INMETRO, 2020
Exatidão	Ensaio de recuperação, fortificando as amostras "branco" em 4 níveis de concentração (5, 10, 25, 50 µg kg ⁻¹) (n= 6). Avaliada em termos de recuperação (%)	Equação 7: $Rec (\%) = \left(\frac{C1-C2}{C3} \right) \times 100$ Onde: C1: Concentração determinada na amostra fortificada; C2: Concentração determinada na amostra não fortificada; C3: Concentração usada para fortificação	70 – 120%	INMETRO, 2020; ANVISA, 2017
Precisão	Ensaio de recuperação, fortificando a amostra branco em 4 níveis de fortificação (5, 10, 25 e 50 µg kg ⁻¹) (n= 7). Avaliada em termos de RSD	Equação 8: $RSD(\%) = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) \times 100$ Onde: s = estimativa de desvio padrão absoluto = $\{\sum(xi - xm)^2/n-1\}^{1/2}$; xi = valores individuais; \bar{x} = média das medidas em replicatas; n = número de medidas.	RSD ≤ 20%	INMETRO, 2020; ANVISA, 2017

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

A escolha das condições cromatográficas iniciais utilizadas foram avaliadas de acordo com as condições utilizadas com maior frequência no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), pois oferecem sinais analíticos apropriados, adequada resolução e bom formato de picos para os compostos em estudo. Para a quantificação e identificação dos analitos, o modo de ionização e as transições foram determinadas pelo monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*). As transições foram utilizadas para quantificação e identificação dos analitos, onde a de maior intensidade foi escolhida para quantificar e a segunda mais intensa foi utilizada para confirmação dos compostos.

A Tabela 13 apresenta os compostos analisados pelo sistema UHPLC-MS/MS, utilizando o modo de ionização ESI⁺, exceto para o fipronil que foi determinado no modo de ionização ESI⁻, o modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção (t_R), voltagens do cone (VC), energias de colisão (EC) e os íons precursores e íons produtos para quantificação e identificação de cada analito em estudo.

Tabela 13 - Compostos determinados por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos tempos de retenção (t_R), voltagem do cone (VC), íons precursores e produto, e energias de colisão (EC) utilizados.

(continua)

Nº	Analito	t_R (min)	VC (V)	Íon Precursor (m/z)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
					Íon produto (m/z)	EC (eV)	Íon produto (m/z)	EC (eV)
1	Acetamiprido	3.69	23	223	56,1	15	126	20
2	Acibenzolar-S-metil	6.07	41	210,9	69	52	135,9	30
3	Aldicarbe	4.34	7	208	89	7	116	7
4	Ametrina	5.65	32	228,1	68,1	36	186,1	18
5	Atrazina	5.51	30	216,1	96,1	23	174,1	18
6	Azinfós-etil	6.50	10	346	77,1	36	132	16
7	Azinfós-metil	5.82	12	318	261	8	160	8
8	Azoxistrobina	5.97	17	404	329	30	372	15
9	Bitertanol	7.10	12	338,1	70,1	8	99,1	16
10	Boscalida	6.18	32	342,9	139,9	20	307	20

Tabela 13 - Compostos determinados por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos tempos de retenção (t_R), voltagem do cone (VC), íons precursores e produto, e energias de colisão (EC) utilizados.

(continuação)

Nº	Analito	t_R (min)	VC (V)	Íon Precursor (m/z)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
					Íon produto (m/z)	EC (eV)	Íon produto (m/z)	EC (eV)
11	Bromoconazol	6.40	32	376	70,1	25	158,9	35
12	Buprofezina	7.51	22	306,1	57,4	20	201	12
13	Carbaril	5.14	19	202	117	28	145	22
14	Carbendazim	2.76	24	192,1	132,1	28	160,1	18
15	Carbofurano	4.94	25	222,1	123	16	165,1	16
16	Carbofurano-3-hidroxi	3.67	25	238	181	10	163	16
17	Carboxina	5.08	25	236	87	22	143	16
18	Cianazina	5.25	28	241	96	25	241	17
19	Ciantraniliprole	4.65	20	475	444	17	286	13
20	Cimoxanil	3.91	14	199	111	18	128	8
21	Ciprodinil	6.68	46	226	108	25	93	33
22	Cletodim	7.35	25	360	268,1	20	164	10
23	Clomazone	5.90	23	240	89	46	125	18
24	Clorantraniprole	5.82	20	481,6	451,1	22	283,9	14
25	Clorimuron etil	6.22	25	415,1	213	17	186	15
26	Clorpirifós	7.73	27	349,9	198	20	97	32
27	Clorpirifós-metil	7.24	23	321,8	125	20	289,9	16
28	Clorprofam	6.35	49	214,1	154	18	172	8
29	Cresoxim-metil	6.83	15	314,1	116	12	206	7
30	Deltametrina	8.02	16	523	506	11	281	18
31	Diazinona	6.96	20	305,1	96,9	35	169	22
32	Difenoconazol	7.21	37	406	111,1	60	251,1	25
33	Dimetoato	3.63	12	230,1	199	10	125	20
34	Dimetomorfe	6.28	30	388,1	300,9	20	165	30
35	Diurum	5.69	27	233	46,3	14	72,1	18
36	Epoconazol	6.58	25	330	101	50	121	22
37	Espinetoram	7.28	60	748,5	142,4	35	98	30
38	Espinosade A	7.04	47	732,6	98,1	59	142	31
39	Espinosade D	7.26	42	746,5	98,1	53	142	31
40	Espirodiclofeno	7.93	22	411,1	71,2	13	313	13
41	Espiromesifeno	7.78	35	371,1	273,1	25	255,1	5
42	Etefon	7.27	25	409	186	40	145	16
43	Etofenproxi	8.40	17	394,3	106,9	43	177	15
44	Famoxadona	6.98	12	392,2	238	20	331,1	10
45	Fenpiroximato	7.89	23	422,2	138,1	32	336,1	15
46	Fempropimorfe	6.00	41	304,2	147,1	28	57,2	30
47	Fenamidona	6.15	22	312,1	236,1	14	92	25
48	Fenamifós	6.72	27	304,1	202,1	36	217,1	24
49	Fenarimol	6.56	17	331	81	34	268	22

Tabela 13 - Compostos determinados por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos tempos de retenção (t_R), voltagem do cone (VC), íons precursores e produto, e energias de colisão (EC) utilizados.

(continuação)

Nº	Analito	t_R (min)	VC (V)	Íon Precursor (m/z)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
					Íon produto (m/z)	EC (eV)	Íon produto (m/z)	EC (eV)
50	Fentiona	6.90	25	279,1	169,1	16	247,1	13
51	Fipronil	6.77	25	435,3	250,1	26	330,2	16
52	Fluopicolida	6.30	40	383	365	15	172,9	20
53	Flupiradifurona	3.72	30	289	126,1	44	90	30
54	Fluquiconazol	6.46	37	376	348,8	18	306,9	30
55	Flutolanil	6.27	23	324,1	65	40	262,1	18
56	Flutriafol	5.56	23	302,1	123,1	29	70,2	18
57	Fluxaproxade	6.30	44	380	248	21	131	24
58	Formetanato	1.91	21	222	165	15	42	26
59	Fostiazato	5.33	19	284	228	10	104	22
60	Hexitiazoxi	7.72	21	353	168,1	26	228,1	14
61	Imazali	5.45	31	297	69	22	159	22
62	Imidacloprido	3.33	23	256,1	175,1	20	209,1	15
63	Indoxicarbe	7.24	25	528	150	22	203	40
64	Iprovalicarbe	6.46	19	321,1	203,1	10	119,1	16
65	Linuron	6.07	25	249,1	181,1	16	160,1	18
66	Malationa	6.27	12	331	99	24	127	12
67	Mandipropamida	6.20	16	412	328	16	125	34
68	Mecarban	6.54	12	330	97	35	227,1	8
69	Mepronil	6.29	27	270,1	91	44	119	28
70	Metalaxil	5.62	15	280,1	192,1	17	220,1	13
71	Metconazol	7.08	29	320,1	125	36	70	22
72	Metiocarbe	6.15	19	226	121	22	169	10
73	Metomil	2.65	17	163	106	10	88	10
74	Metsulfuron metil	4.88	22	382	198,9	22	167	16
75	Monocrotofós	2.97	15	224,1	98,1	12	127,1	16
76	Monolinuron	5.24	23	215	99	34	126	22
77	Novalurom	7.34	27	493	158	19	141	35
78	Oxamil	2.46	12	237	90	10	72	10
79	Picoxistrobina	6.75	10	368	205,1	10	145,1	22
80	Piraclostrobina	7.02	20	388,1	193,9	12	163	25
81	Pirazofós	7.05	33	374	194	32	222,1	22
82	Piridabem	8.08	19	365,1	309,1	12	147,1	24
83	Piridafentiona	6.38	31	341	92	34	189	22
84	Pirimetanil	5.83	42	200	107	24	82	24
85	Pirimicarbe	4.49	25	239,1	182,1	15	72	18
86	Pirimifós metil	7.06	25	306,1	108,1	32	164,1	22
87	Piriproxifeno	7.66	23	322,1	227,1	14	96	14
88	Propamocarbe	2.12	22	189,1	144	12	102	17

Tabela 13 - Compostos determinados por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos tempos de retenção (t_R), voltagem do cone (VC), íons precursores e produto, e energias de colisão (EC) utilizados.

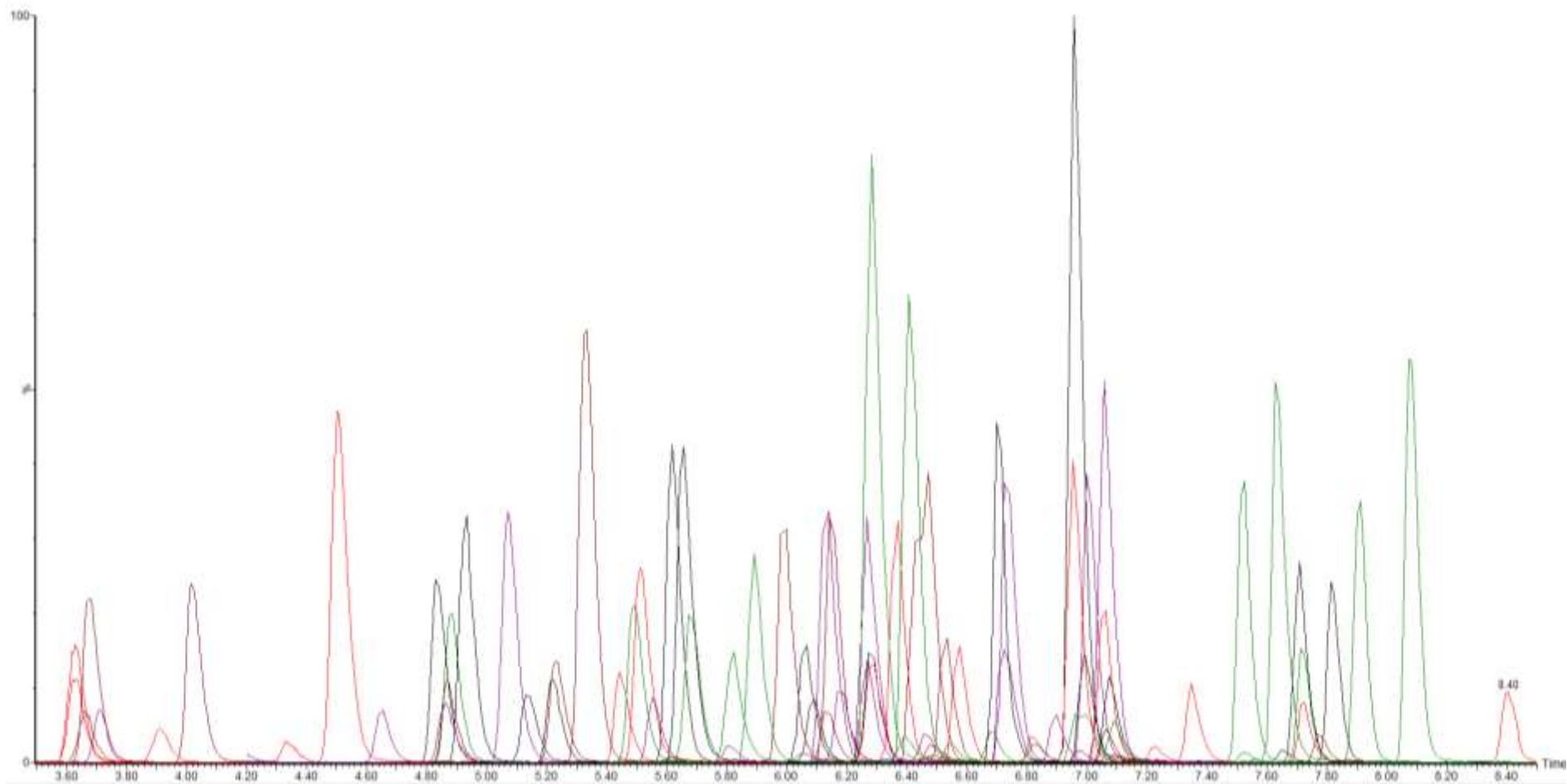
Nº	Analito	t_R (min)	VC (V)	Íon Precursor (m/z)	(conclusão)			
					1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
					Íon produto (m/z)	EC (eV)	Íon produto (m/z)	EC (eV)
89	Propargito	7.82	15	368	231	15	175	15
90	Propiconazol	6.98	37	342	69	22	159	34
91	Propoxur	4.88	12	210	168	10	111	16
92	Quinoxifeno	7.71	52	308	161,9	44	197	3302
93	Saflufenacil	5.89	30	501,1	349	30	198	49
94	Simazina	4.87	34	202	96	22	124	16
95	Tebufenozida	6.73	12	353,1	297,1	8	133	20
96	Teflubezurom	7.66	17	380,9	158	20	140,9	40
97	Terbufós	7.54	12	289	57,2	2	103	8
98	Terbutilazina	6.15	28	230	96	28	174	16
99	Tiabendazol	3.14	42	202	131	30	175	25
100	Tiacloprido	4.02	32	253	90,1	40	126	20
101	Tiametoxam	2.81	19	292	132	22	211,2	12
102	Tiodicarbe	5.22	17	355	107,9	16	87,9	16
103	Tiofanato-metil	4.84	23	343,1	311,1	11	151	21
104	Tolclofós-metil	7.09	30	301,1	174,9	29	125	17
105	Triadimenol	6.49	12	296,1	99,1	15	70,2	10
106	Triazofós	6.41	22	314,1	118,9	18	161,9	35
107	Trifloxistrobina	7.27	25	409	145	40	186	16
108	Triflumurom	7.07	23	359	139,1	35	156,1	16
109	Vamidotiona	3.64	17	288	148	10	188	28
110	Zoxamida	7.00	30	336	187,1	25	159	40
111	Atrazina-d5 (PC)	5.49	26	221	101	23	179	18
112	Trifenilfosfato (PI)	6.96	40	327,2	315,2	28	152,1	37

Fonte: A autora (2022). PC: padrão de controle; PI: padrão interno

Na Figura 4 é apresentado o cromatograma de íon totais (TIC, do inglês *total ion chromatogram*), obtido a partir de uma solução padrão (preparada em acetonitrila), utilizando o extrato da matriz de mamão, na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, contendo todos os agrotóxicos avaliados neste estudo. Este cromatograma é obtido a partir dos sinais individuais da transição de quantificação de cada analito.

O sistema cromatográfico UHPLC proporcionou a separação dos compostos de forma adequada, enquanto a espectrometria de massas em série (MS/MS) identificou e quantificou os 110 agrotóxicos estudados em uma análise de 10 min.

Figura 4 — Cromatograma de íons totais obtido por UHPLC-MS/MS a partir de uma solução padrão $10 \mu\text{g L}^{-1}$ preparada na matriz de mamão.



Legenda: Eixo x: tempo (minutos), Eixo y: intensidade em percentual (%). Fonte: A autora (2022).

4.2 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MAMÃO

4.2.1 Avaliação do método de preparo de amostras

Para o desenvolvimento de um método de preparo de amostras, rápido e simples para extração de resíduos de agrotóxicos de diferentes classes é necessário avaliar as variadas propriedades físico-químicas. Sendo assim, foram avaliadas as três variações do método QuEChERS, original (T1), acetato (T2) e citrato (T3), avaliando a sua capacidade para recuperar os compostos de interesse. Para isto foi utilizada uma etapa de limpeza de extrato, possibilitando a injeção do extrato mais limpo no sistema de UHPLC-MS/MS, conforme descrito na Tabela 11. Através dos ensaios de fortificação, para os 110 agrotóxicos avaliados, apresentou resultados considerados satisfatórios, com recuperação de 70 a 120% e RSD \leq 20%, de 105 compostos para o QuEChERS Original, 105 compostos para o QuEChERS Citrato e 101 compostos para o QuEChERS Acetato, conforme observado na Tabela 14.

Tabela 14 - Resumo dos resultados dos ensaios de fortificação em cada versão do método QuEChERS (T1: original, T2: acetato e T3: citrato), para 110 agrotóxicos avaliados.

Recuperação (%)	Número de compostos		
	T1: QuEChERS Original	T2: QuEChERS Acetato	T3: QuEChERS Citrato
70-120%	105	101	105
60-70 / 120-130%	2	2	2
50-60 / 130-140%	2	4	2
50 < / <140%	1	1	-
RSD > 20	-	2	1

Fonte: A autora (2022).

As diferenças encontradas nos resultados de recuperação de cada um dos métodos testados, podem estar associadas às influências do pH sobre o equilíbrio químico de cada composto na solução de extração. Geralmente, a grande maioria dos agrotóxicos são estáveis em pH ácido, mas alguns apresentam baixa recuperação, por estarem protonados e solubilizados na fase aquosa e não serem recuperados na etapa de partição (PRESTES *et al.*, 2009).

O mamão possui pH natural em torno de 5,0 e 5,9. Considera-se que no método QuEChERS original, que utiliza acetonitrila como solvente de extração sem uma etapa de tamponamento, o pH na extração final apresenta valor aproximado ao extrato inicial. O QuEChERS citrato, apesar de possuir uma etapa de tamponamento de pH 5,0 a 5,5 na solução (na etapa de partição), a extração também é realizada utilizando apenas acetonitrila (ANASTASSIADES *et al.*, 2007). Já no QuEChERS acetato, a extração ocorre com acetonitrila acidificada com ácido acético, e somente o efeito de tamponamento vai ocorrer na etapa de partição com a adição de acetato de sódio, com pH de aproximadamente 4,8 (LEHOTAY *et al.*, 2005).

Como mostrado na Tabela 14, o método QuEChERS acetato mostrou-se o menos adequado para a recuperação dos agrotóxicos no extrato da matriz mamão. Dentre os agrotóxicos que tiveram baixos percentuais de recuperação, estão os que apresentam maiores valores de pKa, como deltametrina, famoxadona, imazalil e teflubenzurom (Tabela 8). Supõe-se que, como esses compostos possuem menor caráter ácido, resulte em menores recuperações em meio ácido, devido a utilização da acetonitrila acidificada como solvente de extração, diminuindo o pH do extrato final.

O efeito matriz resultante foi calculado para cada versão do método QuEChERS (T1, T2 e T3). A Tabela 15, mostra a comparação do comportamento de todos os 110 agrotóxicos em relação ao efeito matriz calculado para estas versões do método. Percebe-se que, para o método QuEChERS original (T1), dos 110 agrotóxicos avaliados, 64 desses apresentam resultados de efeito matriz de $\pm 20\%$, valores estes que podem ser considerados desprezíveis como efeito matriz, de acordo com a literatura (SANTÉ, 2019). Também, 29 outros agrotóxicos apresentaram valores de efeito matriz de -20 a -50%, considerados brandos. Já 16 agrotóxicos apresentaram valores de efeito matriz considerados altos, de <-50 ou $>50\%$. O método QuEChERS citrato (T3) apresentou resultados semelhantes, dos 110 agrotóxicos avaliados, 65 apresentaram valores de efeito matriz de $\pm 20\%$, 29 agrotóxicos apresentaram valores brandos (-20 a -50%) e 15 apresentaram valores altos (<-50 ou $>50\%$). Por outro lado, quando utilizado o QuEChERS acetato (T2), dos agrotóxicos avaliados, 60 apresentam resultados de efeito matriz de $\pm 20\%$, outros 27 agrotóxicos apresentam efeito matriz brando entre as faixas de -20 a -50% e 22 agrotóxicos apresentam valores de efeito matriz de <-50 ou $>50\%$.

Tabela 15- Comparação do efeito matriz (%), por faixa percentual e calculado nos métodos QuEChERS (T1: original, T2: acetato e T3: citrato), para os 110 agrotóxicos avaliados.

Efeito Matriz	Número de compostos		
	T1: QuEChERS Original	T2: QuEChERS Acetato	T3: QuEChERS Citrato
-20 a +20%	64	60	65
-20 a -50%	29	27	29
20 a 50%	1	1	1
>50%	2	3	2
<-50%	14	19	13

Fonte: A autora (2022).

Os resultados do efeito matriz são percebidos pelas diferenças no comportamento dos compostos em relação ao método utilizado. Para quase a metade dos compostos foi observada uma supressão no sinal, levando a valores de efeito matriz negativo. Alguns agrotóxicos, como espinetoram e espinosade A e D, apresentam uma maior quantidade de coextrativos na fase orgânica, ou seja, efeito matriz >100% (observa-se mais acentuado para o QuEChERS acetato), provocando um aumento na competição dos analitos com os coextrativos. Outros compostos como o bitertanol, clorpirifós metílico e pirazofós apresentaram efeito matriz mais acentuado quando se utiliza o QuEChERS acetato. Na maioria dos compostos pode-se observar a presença do efeito de matriz (tanto como supressão, quanto aumento da resposta cromatográfica) para praticamente todos os agrotóxicos.

Tendo em vista que, os resultados de recuperação e efeito matriz para as versões do método QuEChERS original e citrato foram semelhantes e, considerando os bons resultados já demonstrados por outros estudos, escolheu-se o método QuEChERS original para a continuidade dos experimentos, já que utiliza menor quantidade de sais na etapa de partição como o QuEChERS citrato, sendo um método mais simples e mais econômico.

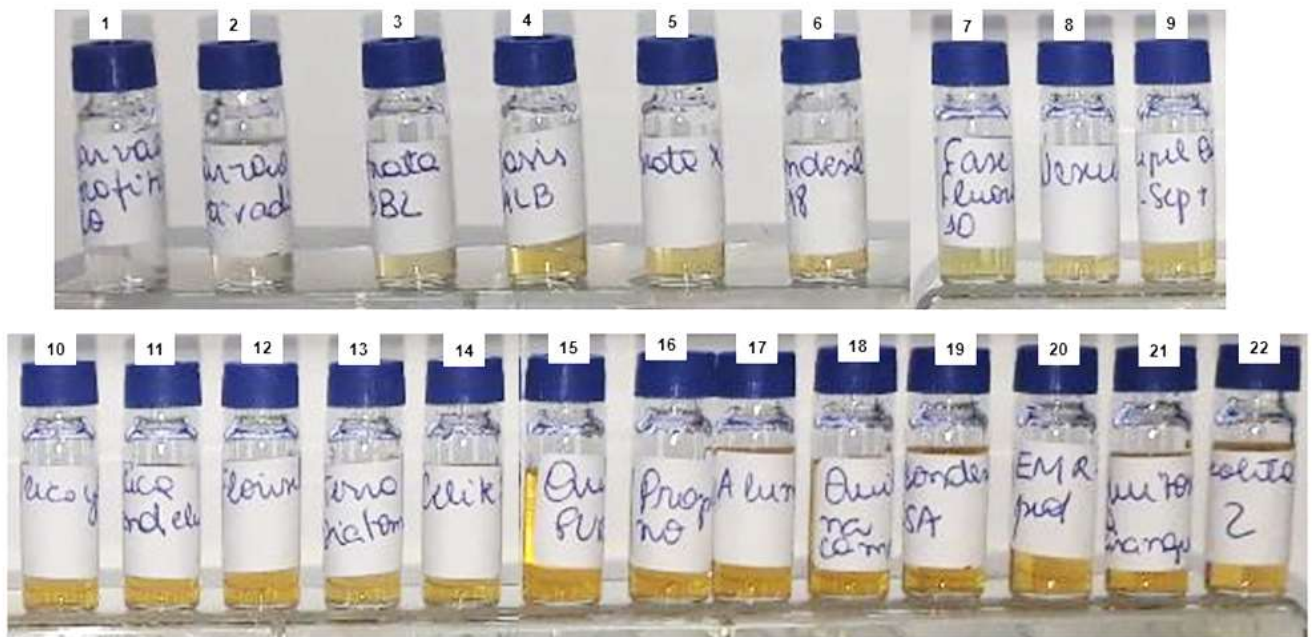
4.2.3 Avaliação dos sorventes utilizados na etapa de limpeza do extrato

Após a escolha e definição do melhor procedimento de extração, avaliou-se a utilização de diferentes sorventes na etapa de limpeza. Este processo pode resultar em perda de alguns compostos, aumentar o tempo e o custo das análises, esta etapa representa a alternativa mais recomendada para reduzir possíveis efeito de matriz,

como alterações nas porcentagens de recuperação, erros de identificação do analito, devido ao mascaramento do pico ou gerando um falso positivo, com o aumento do sinal do detector, causado quando impurezas voláteis são eluídas com mesmo tempo de retenção dos pesticidas, podendo também causar danos ao sistema cromatográfico (LAAJIMI *et al.*, 2022).

Há uma grande variedade de sorventes disponíveis, a maioria deles é composto por grupos orgânicos ligados a sílica (ZANELLA *et al.*, 2015). Assim, optou-se por realizar ensaios com diferentes materiais (testes T4 a T25), (Tabela 11), a fim de avaliar a remoção efetiva de coextrativos presentes na matriz, sem comprometer a recuperação dos compostos. Nesta avaliação, utilizou-se o método QuEChERS original para a obtenção dos extratos. A Figura 5 apresenta os extratos obtidos após a realização de cada um dos testes de limpeza descritos na Tabela 11.

Figura 5 – Extratos obtidos após utilização de diferentes sorventes na etapa de limpeza, em ordem visual de remoção dos pigmentos.



Fonte: A autora (2022). Legenda: 1- Carvão grafitizado (GCB), Supelclean ENVI-Carb, não poroso, área superficial 100 m²/g; tamanho de partícula 120/400 mesh (Supelco, EUA); 2- Carvão ativado (Agilent Technologies, EUA); 3- Strata SDB-L (Phenomenex, EUA); 4- Oasis HLB (Waters, Irlanda); 5- Strata-X (Phenomenex, EUA); 6- Bondesil C18 (octadecilsilano) com tamanho de partícula de 40 µm (Supelco, EUA); 7- Fase fluorada (Unicamp, Brasil); 8- Nexus (Agilent Technologies, EUA); 9- Supel™ QuE Z-Sep+ (Sigma Aldrich, EUA); 10- Sílica gel 50 µm (Sigma-Aldrich, EUA); 11- Sílica BondElut SI (Agilent Technologies, EUA); 12- Florisil® (Sigma-Aldrich, Brasil); 13- Terra diatomacea (Sigma Aldrich, EUA); 14- Celite® 521; 15- Quitosana (FURG); 16- Propilamino (NH₂) (Agilent Technologies, EUA); 17- Alumina 100-125 mesh (Sigma Aldrich, EUA); 18- Quitosana de casca de camarão (Sigma-Aldrich, Islândia); 19 - Bondesil PSA com tamanho de partícula de 40 µm (Supelco, EUA); 20- EMR-Lipid (Agilent Technologies, EUA); 21- Quitosana de casca de caranguejo (Sigma-Aldrich, Japão); 22- Zeólita (Sigma-Aldrich, EUA);

Visualmente, é possível observar as diferentes colorações nos extratos da matriz obtidos. Nos testes os sorventes que demonstraram maior eficiência de limpeza (remoção de pigmentos) foram aqueles que utilizaram carvão ativado, carvão grafitizado, GCB, Oasis HLB, Strata-X e Strata SDB-L como sorventes. Assim sendo, optou-se por avaliar a remoção efetiva de coextrativos presentes na matriz dos 6 sorventes que apontaram melhor eficiência da remoção de pigmentos (numerados de 1 a 6 na Figura 5).

Os resultados de recuperação são apresentados na Figura 6. O número de compostos com resultados considerados satisfatórios (recuperação 70-120% e RSD $\leq 20\%$), foram avaliados em triplicata, com ensaios de fortificação em $10 \mu\text{g L}^{-1}$, equivalentes a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ na amostra (diluição 5 vezes do extrato final), com adição de padrão nas amostras antes (FA, fortificação na amostra) e após o procedimento de extração (PA, padrão na amostra).

Figura 6 – Quantidade de compostos que apresentaram recuperações satisfatórias (70-120% e RSD $\leq 20\%$), dos 110 agrotóxicos avaliados, obtidos através da limpeza de extrato por diversos sorventes.



Legenda: Eixo x: tipos de sorventes selecionados. Eixo y: número de compostos recuperados.
Fonte: A autora (2022).

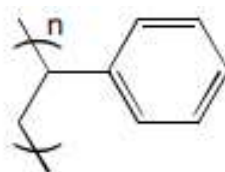
Visualmente, o carvão ativado (Teste T6) e o GCB (Teste T7) foram os sorventes que provocaram melhor remoção dos pigmentos do extrato, devido a sua grande área superficial e boa remoção de coextrativos apolares e são conhecidos por apresentarem forte interação com compostos planares. Ao verificarmos os resultados de recuperação, percebe-se que o carvão ativado teve o menor número de compostos com recuperação considerada satisfatória, dos 110 agrotóxicos avaliados, somente

78 deles foram recuperados usando carvão ativado. Entretanto, o GCB apresentou recuperação considerada satisfatória para 103 agrotóxicos avaliados.

Ao utilizar o C18 como sorvente de limpeza, apenas 94 dos 110 agrotóxicos avaliados apresentaram recuperações consideradas satisfatórias. Este sorvente é bastante utilizado, principalmente, em matrizes que contém gordura, a fim de remover substâncias graxas e lipídios, possuindo grande capacidade de remoção de interferentes apolares, além de possuir o mais amplo espectro de retenção entre os sorventes de sílica ligados (CABRERA *et al.*, 2012).

Os sorventes poliméricos Oasis[®] HLB (Teste T13), Strata[®]-X (Teste T22) e Strata[®] SDB-L (Teste T21), apresentam características lipofílicas e hidrofílicas, com uma superfície modificada polar e a outra não polar, com grande facilidade de retenção de compostos com uma ampla faixa de polaridade, pois são sorventes resistentes a mudança de pH (AGILENT, 2022). Os resultados da Figura 6 mostram que o número de agrotóxicos com percentuais de recuperação e RSD inadequados foi de cinco compostos quando utilizado o Strata[®]-X e dois compostos quando usado Oasis[®] HLB. Quando utilizado o sorvente Strata[®] SDB-L, o mesmo recuperou satisfatoriamente todos os compostos avaliados, sendo escolhido como sorvente ideal para a etapa de limpeza do extrato da amostra de mamão. Este sorvente é composto de polímero de estireno-divinilbenzeno de fase reversa com tamanho das partículas: 100 µm, tamanho dos poros de 260 Å e área superficial de 500 m²/g. A estrutura o sorvente polimérico Strata[®] SDB-L é apresentada na Figura 7 (PHENOMENEX, 2022).

Figura 7 –Estrutura do sorvente Strata SDB-L



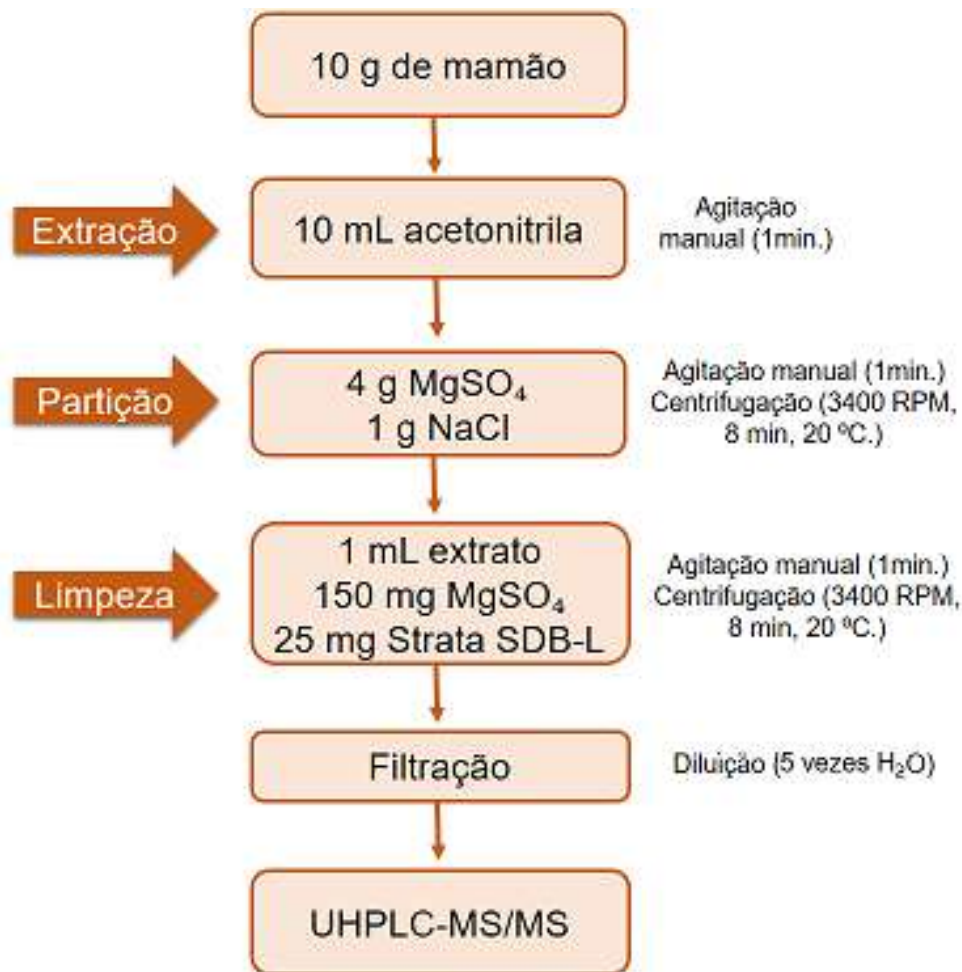
Fonte: (Penhomenex, 2022)

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

A validação do método QuEChERS utilizado neste estudo foi realizada com um processado de mamão, utilizando o sistema UHPLC-MS/MS, nas condições descritas no item 4.1. As soluções analíticas para o preparo da curva e fortificações foram feitas em solvente (acetonitrila). Já no início da validação apenas 1 composto foi retirado do

método (acefato), pois não apresentou valor satisfatório e presença de picos desde a execução dos testes. A partir disso, pode-se avaliar os parâmetros de validação do método analítico para 110 compostos com base na RDC 166/2017 (BRASIL, 2017). Com a aplicação do método foi possível validar 110 compostos através do método demonstrado na Figura 8 e os resultados estão apresentados na Tabela 16.

Figura 8 –Procedimento QuEChERS validado, envolvendo etapas de extração, partição e diluição dos extratos



Fonte: A autora (2022).

Sendo assim, o objetivo da validação de um método analítico é comprovar que ele é adequado à finalidade a que se destina e produz resultados confiáveis, ou seja, que ao ser avaliado atenda aos critérios de aceitação recomendados. A validação objetiva assegurar a qualidade dos resultados analíticos, conferindo-lhes confiabilidade, rastreabilidade, precisão e confiabilidade (ANVISA, 2017). Portanto, o método proposto (Figura 8), baseado no método QuEChERS original, foi desenvolvido, validado e aplicado no preparo de amostras de mamão.

A validação do método para os agrotóxicos relacionados na Tabela 12 foi realizada de acordo com os guias SANTÉ (2019), INMETRO (2020) e ANVISA (2017). As soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato obtido através do “branco” de mamão.

O método validado consiste em pesar 10 g da amostra de mamão, onde são adicionados 10 mL de acetonitrila, seguida por agitação manual por 1 min. Os sais de extração QuEChERS original (4 g de $MgSO_4$ e 1 g de NaCl) são adicionados e novamente é realizada uma agitação manual por 1 min e posterior centrifugação (8 min, 3400 rpm a 20 °C). Na etapa de limpeza do extrato, 1 mL de sobrenadante é adicionado a uma mistura de sorventes contendo 150 mg de $MgSO_4$ e 50 mg de Strata SDB-L. Após agitação por 1 min em vórtex e centrifugação (8 min, 3400 rpm a 20 °C), o extrato é filtrado (filtros de nylon de 13 mm e porosidade de 0,2 μm), em seguida é diluído 5 vezes em água ultrapura e, então, realizada a análise por UHPLC-MS/MS.

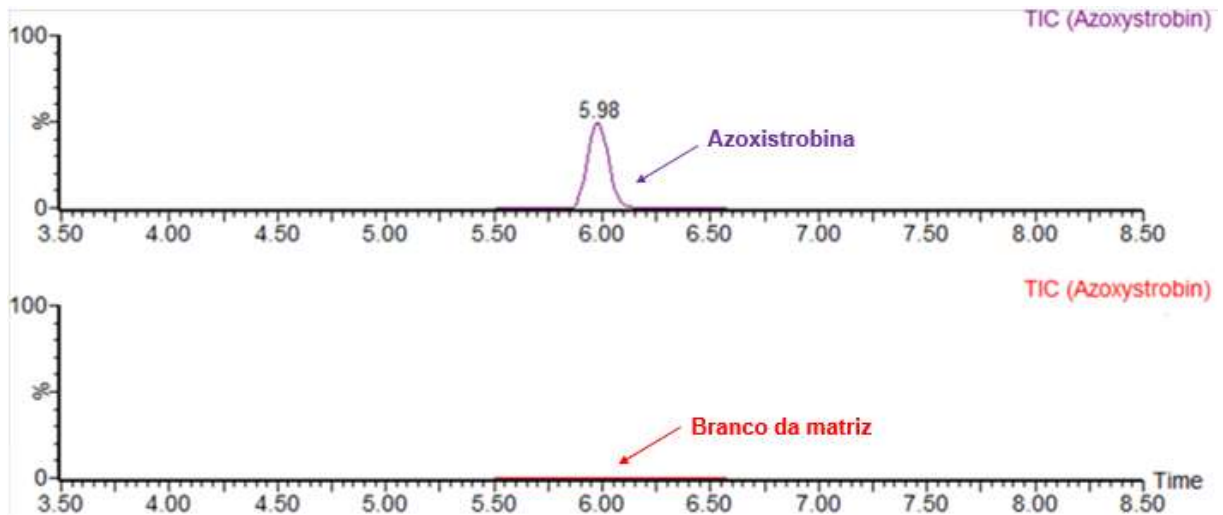
Desta maneira, avaliou-se os parâmetros de validação do método analítico para os 110 agrotóxicos em estudo para os seguintes critérios: seletividade, faixa de trabalho, efeito matriz, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária).

4.3.1 Seletividade

A seletividade de um método é a capacidade de assegurar a ausência de interferentes no mesmo tempo de retenção, íons de quantificação e de confirmação dos analitos de interesse, ou seja, garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI *et al.*, 2004). O método proposto apresentou uma seletividade apropriada, dado que a comparação dos cromatogramas do extrato “branco” da matriz de mamão, do “branco dos reagentes” e do extrato do “branco” de mamão fortificado com uma solução 10 $\mu g L^{-1}$ não foi verificada a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos agrotóxicos selecionados, garantindo a seletividade do método proposto.

A Figura 9 apresenta os cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para a amostra “branco” de mamão e da solução analítica de azoxistrobina (maior incidência nas reais amostras testadas) no extrato da matriz, na concentração de 10 $\mu g L^{-1}$. Observa-se que não foi verificada a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção (t_R 5,98 min) do agrotóxico.

Figura 9 –Cromatograma de íon total do composto azoxistrobina, obtidos para solução analítica no extrato da matriz (em lilás) na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e “branco” da amostra mamão (em vermelho), obtido por UHPLC-MS/MS.



Fonte: o autor, 2022.

4.3.2 Linearidade e faixa de trabalho

A linearidade do procedimento foi assegurada através da avaliação do coeficiente de determinação (r^2), que foi obtido em curvas preparadas no extrato da matriz. A curva analítica foi preparada inicialmente em solvente (acetonitrila) e, posteriormente, na matriz. As concentrações dos pontos da curva avaliados foram: 0,5; 1; 2; 5; 10 e $20 \mu\text{g L}^{-1}$, o que permitiu que cada composto avaliado apresentasse coeficiente de determinação (r^2) maior que 0,990, como pode ser observado na Tabela 16. Além disso, a faixa de trabalho ficou entre 0,5 a $20 \mu\text{g L}^{-1}$.

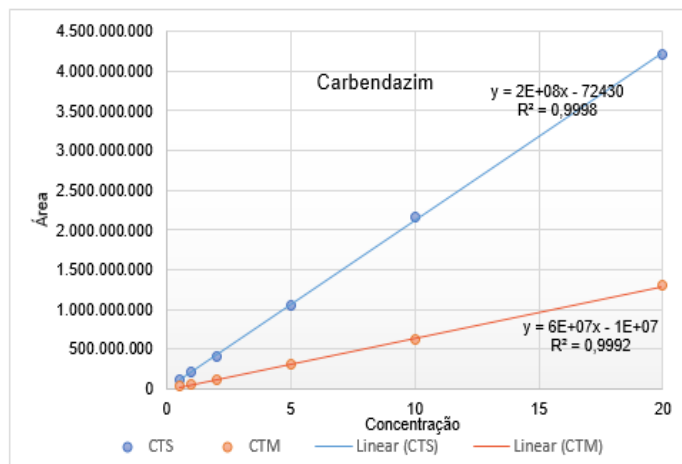
4.3.3 Sensibilidade

A sensibilidade do método validado foi avaliada através da inclinação da curva analítica (b), obtida através da equação da reta. De acordo com o INMETRO, o método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em uma maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação (INMETRO, 2020). Deste modo, o método avaliado apresentou uma boa sensibilidade, principalmente pela alta eficiência do sistema UHPLC-MS/MS.

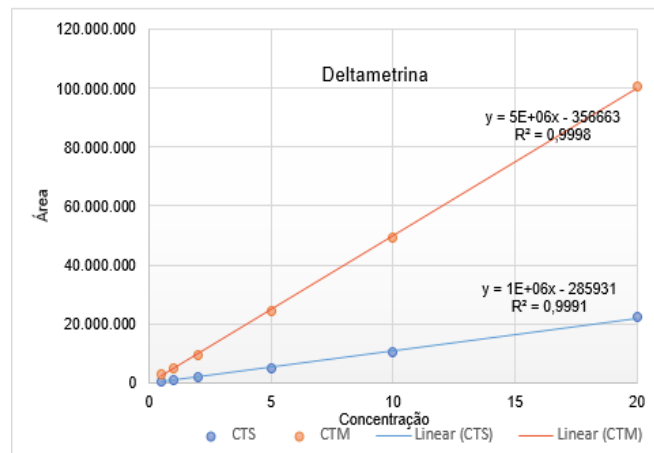
4.3.4 Efeito matriz

O efeito matriz (EM) foi avaliado através da comparação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas preparadas no solvente (acetonitrila) e no extrato da amostra “branco” de mamão, através da Equação 7 na tabela 12. A faixa de concentração avaliada foi de 0,5 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Como pode ser verificado na Figura 10, quando comparado o coeficiente angular das curvas analíticas preparadas no solvente e na matriz para o composto carbendazim, que apresentou efeito matriz de -64,7%, conforme a Tabela 16, percebe-se que o coeficiente angular do solvente é maior do que na matriz, ou seja, as áreas dos pontos da curva são maiores quando não há interferência da matriz.

Figura 10 –Gráfico representativo do efeito matriz ao comparar as curvas em solvente(CTS) em acetonitrila e na matriz de mamão (CTM), para os compostos carbendazim com efeito matriz positivo e deltametrina com efeito matriz negativo.



(a)



(b)

Fonte: A autora (2022).

Por outro lado, para o composto deltametrina, que apresentou efeito matriz de 306,3%, o coeficiente angular na matriz é maior do que no solvente, devido a presença de maior quantidade de coextrativos na fase orgânica e, conseqüentemente, aumento da resposta cromatográfica, dessa forma optou-se em preparar as curvas analíticas no extrato da matriz.

O aumento de sinal que produz um efeito matriz de $\pm 20\%$ é considerado aceitável ou depressível. Como pode ser observado na Tabela 16, é possível identificar através dos dados, que a matriz exerce influência no sinal analítico, com valores de efeito da matriz bem significantes. Avaliando os dados, percebe-se que os valores são prioritariamente positivos. Para os 110 dos compostos avaliados, 20 destes compostos apresentaram efeito matriz $> 20\%$, podendo-se considerar que o efeito matriz exerce influência no desempenho analítico do método para esses compostos, como o caso do inseticida e formicida deltametrina, que apresentou efeito matriz de 306%, ou seja, um aumento considerável no sinal do detector, causando a superestimação do resultado. Isso acontece quando impurezas voláteis são eluídas com mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse (TENGATTINI *et al.*, 2022).

Os valores negativos obtidos indicam efeito de supressão do sinal cromatográfico. De acordo com a Tabela 16, apenas 13 dos compostos avaliados apresentam valores de efeito matriz $\geq 20\%$. Geralmente, a ocorrência da supressão do sinal cromatográfico é oriunda da presença compostos co-eluídos, proveninetes da matriz, que competem com os analitos na ionização favorecendo as moléculas mais ionizáveis e de maiores concentrações, o que provoca a diminuição do sinal do composto de interesse (OSHITA; JARDIM, 2015).

4.3.5 Limite de detecção e de quantificação

O limite de quantificação (LOQ) foi determinado a partir dos ensaios de fortificação, onde foi considerado como sendo o menor nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$), que tenha sinal/ruído > 10 , no qual a precisão e a exatidão dos compostos de interesse demonstraram estar dentro dos níveis aceitáveis de recuperação e desvio padrão relativo (70 a 120%; $\text{RSD} \leq 20\%$) (SANTÉ, 2019). O valor do limite de detecção (LOD) foi obtido, a partir do valor do LOQ, dividindo-o por 3,33.

Como pode ser observado na Tabela 16, os valores de LOQ do método estiveram na faixa de 5 a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e os de LOD de 1,5 a 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Estes valores de

LOQ e LOD são considerados satisfatórios para o método desenvolvido e validado, uma vez que, para os compostos que possuem valores de LMRs estabelecidos para a cultura de mamão, os valores de LOQ obtidos na validação do método proposto estão abaixo dos limites estabelecidos, tanto pela ANVISA, como pela EU e Codex Alimentarius.

4.3.6 Exatidão e precisão

Com o propósito de avaliar a exatidão e a precisão do método, foram considerados os valores de recuperação e de desvio padrão relativo recomendados pela legislação internacional (SANTÉ, 2019), valores entre 70 e 120% e $RSD \leq 20\%$, respectivamente.

Para avaliar a exatidão do método foram realizados ensaios de recuperação dos compostos selecionados em 4 níveis de fortificação (5, 10, 25 e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$), cada nível com 5 replicatas. Os resultados mostraram que 108 dos 110 agrotóxicos avaliados apresentaram valores de recuperação aceitáveis no nível de fortificação mais baixo ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$) e acetamiprido e flutriafol apresentaram recuperações adequadas para $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Já para os valores de RSD, notou-se que todos os 110 compostos apresentaram valores adequados para os 4 níveis selecionados, conforme observado na Tabela 16.

Além da precisão do método, avaliada com base nas replicatas, a precisão intermediária foi avaliada em um intervalo de 3 dias em relação ao primeiro teste. O mesmo teste de validação foi repetido por um analista distinto, porém no mesmo local, nas mesmas condições e com o mesmo equipamento. Os resultados também se encontram dispostos na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS: LOQ, LOD, linearidade (coeficiente de determinação, r^2), exatidão e precisão em termos de repetitividade e precisão intermediária e efeito matriz (EM).

(continua)

Nº	Agrotóxicos	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	Nível de Repetitividade ($\mu\text{g kg}^{-1}$), n=5				Precisão Intermediária ($\mu\text{g kg}^{-1}$), n=5			EM (%)
					Recuperação (\pm RSD)				Recuperação (\pm RSD)			
					5	10	25	50	10	25	50	
1	Acetamiprido	10	3	0,9999	52 (7)	98 (3)	82 (4)	85 (7)	111 (4)	105 (8)	105 (1)	-22,9
2	Acibenzolar-S-metil	5	1,5	0,9983	87 (13)	91 (10)	93 (9)	90 (2)	96 (9)	94 (7)	92 (5)	1,4
3	Aldicarbe	5	1,5	0,9992	101 (14)	101 (7)	100 (6)	97 (7)	104 (7)	107 (4)	104 (5)	29,8
4	Ametrina	5	1,5	0,9989	113 (3)	100 (3)	94 (4)	92 (3)	98 (2)	97(9)	98 (1)	0,9
5	Atrazina	5	1,5	1,0000	104 (5)	100 (6)	98 (3)	95 (3)	93 (2)	100 (6)	105 (2)	-3,0
6	Azinfós-etil	5	1,5	0,9994	98 (14)	115 (6)	102 (15)	101 (7)	103 (12)	116(10)	112 (5)	22,3
7	Azinfós-metil	5	1,5	0,9991	111 (11)	111 (14)	105 (10)	89 (10)	87 (12)	95 (9)	100 (5)	17
8	Azoxistrobina	5	1,5	0,9995	102 (5)	96 (3)	97 (5)	96 (4)	103 (6)	104 (10)	100 (2)	5,4
9	Bitertanol	5	1,5	0,9982	113 (15)	113 (6)	89 (10)	84 (5)	98 (19)	101 (19)	87 (8)	30
10	Boscalida	5	1,5	0,9994	85 (8)	97 (8)	100 (4)	97 (3)	96 (6)	98 (15)	101 2)	-3,1
11	Bromoconazol	5	1,5	0,9986	88 (16)	93 (9)	103 (6)	96 (6)	91 (19)	101 (11)	95 (14)	-2,4
12	Buprofezina	5	1,5	0,9999	102 (2)	96 (3)	94 (5)	93 (3)	94 (2)	95 (3)	95 (3)	-4,3
13	Carbaril	5	1,5	0,9998	102 (6)	98 (4)	100 (3)	94 (4)	99 (4)	106 (4)	107 (3)	-1,1
14	Carbendazim	5	1,5	0,9996	87 (7)	93 (4)	75 (7)	84 (8)	114 (5)	114 (4)	71 (4)	-64,7
15	Carbofurano	5	1,5	0,9999	100 (2)	102 (3)	102 (2)	97 (3)	103 (2)	107 (4)	106 (1)	-2,5
16	Carbofurano-3-hidroxi	5	1,5	0,9999	98 (6)	98 (3)	94 (3)	88 (6)	105 (5)	105 (7)	102 (2)	-18,5
17	Carboxina	5	1,5	0,9999	101 (3)	99 (2)	98 (3)	93 (3)	98 (3)	102 (5)	101 (1)	-0,3
18	Cianazina	5	1,5	0,9999	101 (3)	100 (4)	98 (4)	97 (2)	103 (3)	104 (7)	104 (1)	34
19	Ciantraniliprole	5	1,5	0,9999	105 (8)	106 (5)	97 (4)	99 (3)	102 (9)	102 (9)	102 (4)	3,3
20	Cimoxanil	5	1,5	0,9997	119(4)	101 (4)	101 (7)	90 (11)	109 (5)	111 (4)	118 (2)	1,5
21	Ciprodinil	5	1,5	0,9999	79 (8)	86 (10)	89 (8)	89 (5)	93 (4)	97 (6)	92 (5)	-23,6
22	Cletodim	5	1,5	0,9999	98 (6)	96 (3)	90 (4)	84 (5)	98 (5)	98 (17)	94 (3)	3,1
23	Clomazone	5	1,5	0,9997	106 (3)	99 (3)	97 (4)	95 (2)	96 (3)	100 (5)	99 (2)	2,6

Tabela 16 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS: LOQ, LOD, linearidade (coeficiente de determinação, r^2), exatidão e precisão em termos de repetitividade e precisão intermediária e efeito matriz (EM).

(continua)

Nº	Agrotóxicos	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	Nível de Repetitividade ($\mu\text{g kg}^{-1}$), n=5				Precisão Intermediária ($\mu\text{g kg}^{-1}$), n=5			EM (%)
					Recuperação (\pm RSD)				Recuperação (\pm RSD)			
					5	10	25	50	10	25	50	
24	Clorantriprole	5	1,5	0,9999	111 (6)	93 (7)	99 (5)	93 (5)	71 (1)	112 (7)	110 (3)	-4,3
25	Clorimuron etil	5	1,5	0,9978	117 (17)	105 (9)	94 (16)	97 (12)	106 (4)	99 (12)	88 (8)	9,1
26	Clorpirifós	5	1,5	0,9992	87 (11)	94 (5)	99 (4)	98 (4)	102 (5)	102 (6)	100 (3)	9,5
27	Clorpirifós-metil	5	1,5	0,9999	116 (10)	99 (16)	91 (9)	89 (16)	93 (15)	95 (11)	105 (6)	-6
28	Clorprofam	5	1,5	0,9981	88 (11)	115 (20)	92 (14)	90 (11)	104 (19)	101 (11)	99 (15)	-4
29	Cresoxim-metil	5	1,5	0,9988	93 (16)	95 (4)	101 (8)	94 (12)	102 (11)	99 (16)	99 (8)	-14,7
30	Deltametrina	5	1,5	0,9998	119 (6)	99 (9)	95 (6)	93 (8)	96 (5)	86 (11)	101 (5)	306,3
31	Diazinona	5	1,5	0,9999	105 (3)	102 (3)	95 (3)	95 (9)	97 (4)	94 (18)	98 (2)	-0,2
32	Difenoconazol	5	1,5	0,9948	79 (20)	90 (19)	80 (20)	77 (9)	98 (5)	92 (12)	94 (2)	6,3
33	Dimetoato	5	1,5	0,9999	96 (5)	99 (4)	93 (3)	88 (5)	109 (2)	108 (8)	103 (2)	-28,4
34	Dimetomorfe	5	1,5	0,9999	97 (4)	97 (4)	100 (4)	96 (6)	97 (4)	101 (8)	100 (2)	4,7
35	Diuram	5	1,5	0,9998	97 (4)	97 (3)	98 (4)	96 (4)	97 (2)	103 (7)	104 (1)	-1,4
36	Epoxiconazol	5	1,5	0,9999	98 (6)	98 (4)	98 (5)	97 (4)	102 (6)	102 (9)	99 (2)	6
37	Espinetoram	5	1,5	1,0000	101 (6)	101 (5)	101 (4)	98 (5)	89 (7)	105 (7)	102 (4)	38,3
38	Espinosade A	5	1,5	1,0000	101 (3)	97 (4)	97 (5)	97 (6)	94 (4)	100 (9)	99 (6)	32,3
39	Espinosade D	5	1,5	1,0000	99 (7)	97 (4)	98 (5)	97 (3)	95 (6)	104 (10)	102 (3)	58,2
40	Espirodiclofeno	5	1,5	0,9989	82 (6)	97 (6)	101 (3)	101 (4)	97 (4)	110 (7)	105 (3)	52,4
41	Espiromesifeno	5	1,5	0,9991	100 (12)	100 (12)	110 (8)	102 (6)	106 (11)	114 (8)	102 (4)	3
42	Etefon	5	1,5	1,0000	101 (4)	101 (4)	103 (3)	101 (3)	99 (4)	105 (4)	103 (1)	0,8
43	Etofenproxi	5	1,5	1,0000	84 (5)	83 (5)	81 (4)	81 (6)	79 (4)	78 (6)	80 (5)	24,9
44	Famoxadona	5	1,5	0,9986	107 (13)	109 (10)	100 (11)	98 (9)	101 (13)	103 (12)	103 (3)	33,6
45	Fenpiroximato	5	1,5	0,9995	89 (5)	92 (3)	93 (5)	92 (4)	92 (4)	86 (13)	99 (4)	78
46	Fempropimorfe	5	1,5	0,9999	104 (8)	92 (11)	102 (7)	92 (6)	94 (4)	88 (15)	106 (1)	-20,3
47	Fenamidona	5	1,5	0,9990	87 (12)	93 (9)	106 (4)	103 (4)	98 (3)	105 (11)	106 (4)	-2,3

Tabela 16 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS: LOQ, LOD, linearidade (coeficiente de determinação, r^2), exatidão e precisão em termos de repetitividade e precisão intermediária e efeito matriz (EM).

(continua)

Nº	Agrotóxicos	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	Nível de Repetitividade ($\mu\text{g kg}^{-1}$), n=5				Precisão Intermediária ($\mu\text{g kg}^{-1}$), n=5			EM (%)
					Recuperação (\pm RSD)				Recuperação (\pm RSD)			
					5	10	25	50	10	25	50	
48	Fenamifós	5	1,5	0,9997	108 (10)	98 (14)	88 (12)	93 (16)	96 (11)	88 (18)	97 (2)	-14,5
49	Fenarimol	5	1,5	0,9979	71 (9)	85 (19)	96 (17)	96 (10)	98 (19)	102 (15)	99 (2)	-8,9
50	Fentiona	5	1,5	0,9996	109 (11)	102 (5)	98 (3)	90 (8)	101 (4)	101 (5)	100 (4)	2,9
51	Fipronil	5	1,5	0,9922	103 (12)	100 (18)	83 (18)	120 (14)	101 (9)	98 (17)	97 (12)	33,8
52	Fluopicolida	5	1,5	0,9983	82 (12)	96 (4)	105 (4)	101 (4)	94 (11)	107 (9)	106 (2)	0,8
53	Flupiradifurona	5	1,5	0,9999	93 (4)	100 (2)	93 (3)	90 (5)	111 (3)	104 (8)	97 (1)	4,4
54	Fluquiconazol	5	1,5	0,9941	88 (15)	92 (16)	113 (6)	104 (7)	94 (13)	111 (4)	111 (3)	0,2
55	Flutolanil	5	1,5	0,9999	100 (4)	97 (11)	103 (2)	99 (3)	99 (3)	101 (11)	103 (2)	1
56	Flutriafol	10	3	0,9999	51 (43)	98 (8)	85 (9)	84 (7)	102 (5)	105 (3)	107 (3)	8,2
57	Fluxaproxade	5	1,5	0,9983	74 (19)	77 (19)	105 (18)	104 (14)	100 (18)	113 (20)	102 (18)	-61,1
58	Formetanato	5	1,5	0,9968	107 (5)	94 (4)	86 (6)	84 (5)	90 (11)	92 (8)	90 (4)	-22,7
59	Fostiazato	5	1,5	0,9999	100 (2)	100 (2)	100 (3)	97 (3)	102 (2)	106 (5)	106 (1)	-2,4
60	Hexitiazoxi	5	1,5	1,0000	95 (5)	90 (3)	87 (4)	86 (5)	87 (3)	92 (8)	91 (4)	10
61	Imazalil	5	1,5	0,9997	104 (3)	99 (3)	100 (3)	95 (5)	102 (4)	107 (7)	107 (2)	-22,1
62	Imidacloprido	5	1,5	0,9993	100 (11)	95 (3)	95 (4)	86 (9)	111 (6)	110 (5)	110 (4)	13,1
63	Indoxicarbe	5	1,5	0,9991	93 (15)	103 (7)	104 (6)	103 (6)	98 (7)	112 (9)	107 (3)	33,4
64	Iprovalicarbe	5	1,5	0,9997	106 (2)	106 (4)	104 (5)	102 (2)	103 (5)	110 (8)	100 (3)	-1,4
65	Linuron	5	1,5	0,9998	103 (8)	100 (4)	100 (3)	95 (3)	94 (5)	100 (9)	101 (2)	-2
66	Malationa	5	1,5	0,9992	109 (14)	104 (12)	96 (8)	89 (10)	102 (6)	100 (11)	99 (3)	2,5
67	Mandipropamida	5	1,5	0,9996	95 (8)	101 (7)	105 (3)	102 (2)	99 (10)	106 (12)	107 (1)	3,2
68	Mecarban	5	1,5	0,9999	102 (13)	105 (9)	99 (12)	99 (12)	93 (11)	97 (18)	111 (2)	0,1
69	Mepronil	5	1,5	0,9996	93 (3)	97 (4)	100 (3)	98 (2)	97 (2)	101 (10)	102 (2)	-2,3
70	Metalaxil	5	1,5	0,9998	104 (4)	102 (3)	100 (3)	98 (4)	98 (4)	106 (4)	104 (1)	4,6
71	Metconazol	5	1,5	0,9997	93 (9)	97 (3)	101 (3)	100 (2)	92 (5)	95 (16)	99 (3)	-4,5

Tabela 16 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS: LOQ, LOD, linearidade (coeficiente de determinação, r^2), exatidão e precisão em termos de repetitividade e precisão intermediária e efeito matriz (EM).

(continua)

Nº	Agrotóxicos	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	Nível de Repetitividade ($\mu\text{g kg}^{-1}$), n=5				Precisão Intermediária ($\mu\text{g kg}^{-1}$), n=5			EM (%)
					Recuperação (\pm RSD)				Recuperação (\pm RSD)			
					5	10	25	50	10	25	50	
72	Metiocarbe	5	1,5	0,9993	114 (2)	100 (5)	96 (9)	95 (2)	94 (10)	102 (5)	100 (1)	6,1
73	Metomil	5	1,5	0,9998	99 (14)	90 (8)	89 (6)	92 (6)	101 (12)	117 (7)	80 (10)	-15,2
74	Metsulfuron metil	5	1,5	0,9998	95 (6)	103 (2)	105 (6)	105 (3)	98 (2)	104 (8)	99 (2)	35,2
75	Monocrotofós	5	1,5	0,9996	93(6)	97 (3)	86 (4)	89 (4)	109 (3)	107 (5)	82 (3)	-50,6
76	Monolinuron	5	1,5	0,9999	104 (4)	99 (4)	100 (3)	97 (4)	101 (4)	105 (4)	104 (2)	2,8
77	Novalurom	5	1,5	0,9993	97 (8)	101 (8)	104 (3)	105 (4)	103 (4)	115 (9)	112 (2)	55,1
78	Oxamil	5	1,5	1,0000	101 (5)	98 (4)	96 (5)	99 (4)	101 (8)	105 (6)	99 (6)	15,6
79	Picoxistrobina	5	1,5	0,9999	106 (8)	99 (8)	99 (7)	97 (9)	97 (9)	103 (2)	98 (2)	-13,9
80	Piraclostrobina	5	1,5	1,0000	96 (4)	95 (4)	95 (4)	94 (3)	92 (3)	99 (7)	97 (4)	5,2
81	Pirazofós	5	1,5	0,9998	90 (4)	100 (3)	90 (3)	88 (5)	97 (4)	107 (10)	95 (3)	22,7
82	Piridabem	5	1,5	0,9999	90 (5)	91 (5)	93 (4)	94 (6)	91 (3)	95 (5)	92 (2)	38,6
83	Piridafentiona	5	1,5	0,9973	87 (12)	94 (9)	105 (4)	97 (11)	101 (6)	103 (7)	103 (1)	-8,4
84	Pirimetanil	5	1,5	0,9990	109 (5)	96 (3)	91 (4)	88 (3)	96 (5)	96 (10)	95 (4)	+3,6
85	Pirimicarbe	5	1,5	0,9998	100 (2)	98 (2)	96 (3)	93 (3)	103 (1)	103 (6)	101 (1)	-8,1
86	Pirimifós metil	5	1,5	0,9999	106 (3)	99 (7)	97 (3)	95 (3)	98 (2)	100 (5)	97 (2)	-6
87	Piriproxifeno	5	1,5	1,0000	91 (5)	89 (5)	88 (4)	87 (6)	88(3)	96 (5)	91 (2)	14,1
88	Propamocarbe	5	1,5	0,9997	87 (4)	70 (1)	84 (4)	79 (4)	72 (2)	86 (4)	86 (2)	30,9
89	Propargito	5	1,5	0,9997	94 (3)	99 (4)	102 (3)	100 (4)	101 (2)	108 (6)	103 (2)	40,8
90	Propiconazol	5	1,5	0,9990	85 (9)	97 (5)	102 (2)	102 (3)	97 (6)	101 (14)	103 (2)	-3,2
91	Propoxur	5	1,5	0,9999	104 (2)	101 (4)	101 (2)	97 (3)	101 (4)	109 (4)	105 (2)	2,2
92	Quinoxifeno	5	1,5	0,9999	81 (4)	80 (5)	79 (8)	81 (4)	82 (3)	85 (4)	82 (3)	-9,5
93	Saflufenacil	5	1,5	0,9999	107 (5)	105 (3)	104 (4)	105 (3)	102 (3)	104 (10)	94 (3)	14,9
94	Simazina	5	1,5	0,9995	104 (7)	99 (3)	98 (3)	93 (4)	99 (6)	105 (4)	105 (1)	-7,1
95	Tebufenozida	5	1,5	0,9977	102 (17)	100 (15)	102 (15)	95 (11)	93 (17)	102 (12)	88 (11)	-32,5

Tabela 16 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS: LOQ, LOD, linearidade (coeficiente de determinação, r^2), exatidão e precisão em termos de repetitividade e precisão intermediária e efeito matriz (EM).

(continua)

Nº	Agrotóxicos	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	Nível de Repetitividade ($\mu\text{g kg}^{-1}$), n=5				Precisão Intermediária ($\mu\text{g kg}^{-1}$), n=5			EM (%)
					Recuperação (\pm RSD)				Recuperação (\pm RSD)			
					5	10	25	50	10	25	50	
96	Teflubezurom	5	1,5	0,9996	105 (9)	103 (10)	101 (9)	93 (11)	108 (10)	104 (6)	104 (5)	-1,3
97	Terbufós	5	1,5	0,9984	114 (16)	117 (3)	104 (10)	97 (7)	94 (16)	94 (4)	93 (9)	2
98	Terbutilazina	5	1,5	1,0000	102 (3)	98 (2)	98 (5)	96 (2)	97 (4)	100 (14)	102 (2)	-1,3
99	Tiabendazol	5	1,5	0,9995	97 (1)	92 (4)	86 (1)	83 (5)	101 (3)	96 (8)	87 (2)	-31,8
100	Tiacloprido	5	1,5	0,9998	100 (2)	99 (2)	94 (3)	91 (4)	106 (3)	100 (8)	99 (1)	11,1
101	Tiametoxam	5	1,5	0,9982	95 (10)	100 (9)	79 (9)	86 (7)	109 (13)	109 (13)	72 (5)	-76,1
102	Tiodicarbe	5	1,5	0,9997	110 (2)	101 (3)	94 (3)	87 (4)	91 (3)	96 (8)	94 (3)	,5
103	Tiofanato-metil	5	1,5	0,9999	96 (3)	97 (2)	94 (4)	92 (4)	104 (3)	105 (6)	104 (1)	12,6
104	Tolclofós-metil	5	1,5	0,9997	99 (13)	96 (7)	104 (3)	99 (7)	98 (7)	103 (7)	102 (3)	-9,6
105	Triadimenol	5	1,5	0,9984	115 (19)	103 (17)	85 (12)	97 (8)	93 (19)	113 (9)	103 (10)	15,4
106	Triazofós	5	1,5	0,9997	110 (6)	101 (10)	97 (9)	96 (3)	95 (7)	101 (10)	101 (2)	-1,8
107	Trifloxistrobina	5	1,5	0,9998	112 (2)	102 (4)	98 (3)	98 (5)	99 (4)	87 (4)	100 (1)	5
108	Triflumurom	5	1,5	0,9993	110 (12)	98 (6)	117 (6)	110 (4)	90 (9)	110 (8)	101 (12)	-9,3
109	Vamidotiona	5	1,5	0,9999	101 (3)	99 (5)	93 (3)	88 (6)	110 (2)	105 (5)	100 (1)	-26,5
110	Zoxamida	5	1,5	0,9966	77 (9)	100 (5)	109 (4)	106 (3)	96 (7)	105 (19)	108 (2)	-1,1

Fonte: A autora (2022).

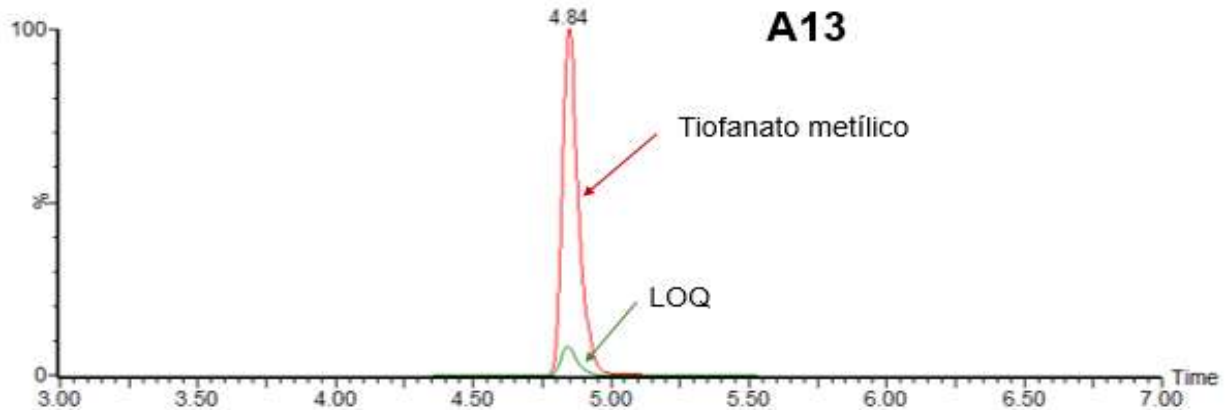
4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO EM AMOSTRAS COMERCIAIS

O método proposto e validado neste estudo foi aplicado a 18 amostras comerciais (A1 a A18), identificadas na Tabela 7 e comercializados em mercados, fruteiras e feiras no município de Santa Maria, no estado do Rio Grande do Sul. De acordo com a Tabela 17, das amostras avaliadas, todas apresentaram resíduos, de pelo menos, um dos agrotóxicos estudados. Dos 110 agrotóxicos avaliados neste estudo, 17 foram quantificados e/ou detectados nas amostras analisadas, sendo que cinco não são autorizados para a cultura de mamão no Brasil, como o carbendazim, clomazone, epoxiconazol, etefon e metalaxil.

Dos agrotóxicos encontrados, um dos que apareceu com maior frequência foi o fungicida carbendazim (9 amostras) com valores abaixo do LOQ. Sabe-se que carbendazim está entre os 20 agrotóxicos mais comercializados no Brasil, e possui o seu uso agrícola aprovado nas culturas de algodão, cana de açúcar, cevada, citros, feijão, maçã, milho, soja e trigo (ANVISA, 2022). Ele é o ingrediente ativo mais utilizado do grupo dos fungicidas benzimidazóis contra uma grande variedade de doenças, como as causadas pelos fungos em culturas de frutas e vegetais, tornando-se um poluente muito persistente tanto no solo quanto na água. Esse fungicida não é autorizado para uso na cultura do mamão, no entanto, ele é um produto de degradação do tiofanato metílico (ANVISA, 2022). Por outro lado, o tiofanato metílico foi detectado em 12 amostras, sendo 4 abaixo do LOQ., 8 amostras foram quantificadas, porém todas as amostras estavam com o valor abaixo do LMR permitido pela ANVISA de $0,50 \text{ mg kg}^{-1}$. A Figura 11 apresenta o cromatograma comparativo do sinal analítico da amostra A13 de mamão contaminada com tiofanato metílico e o LOQ do mesmo para o método desenvolvido.

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

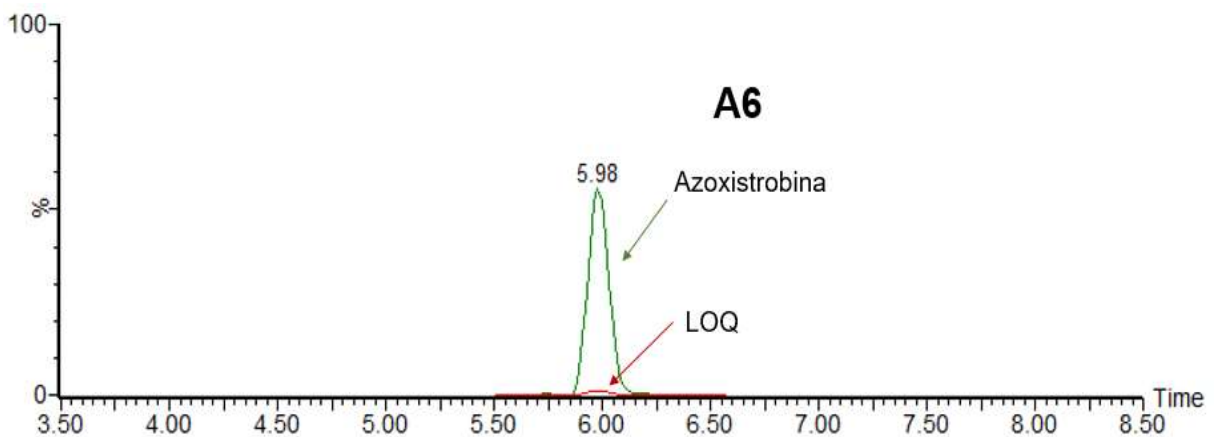
Figura 11 –Cromatograma comparativo entre a amostra A13 contaminada com resíduo de tiofanato metílico (0,060 mg kg⁻¹) e o seu LOQ (0,005 mg kg⁻¹).



Legenda: Eixo x: tempo (minutos), Eixo y: intensidade em percentual (%). Fonte: A autora (2022).

Das amostras analisadas de mamão a mais contaminada foi a A16, em que foram encontrados sete agrotóxicos (azoxistrobina, difenoconazol, epoxiconazol, espiromesifeno, flutriafol, propamocarbe e tiofanato metílico), sendo azoxistrobina o agrotóxico em maior concentração na amostra, se comparada com as demais. O fungicida azoxistrobina é um fungicida genotóxico e que pode causar mutações ou induzir alterações na sequência de nucleotídeos ou na estrutura das fitas de DNA do organismo e possui toxicidade hepática (PPDB, 2020). A Figura 12 apresenta o cromatograma comparativo do sinal analítico da amostra A6 de mamão contaminada com azoxistrobina e o LOQ do mesmo para o método desenvolvido.

Figura 12 –Cromatograma comparativo entre a amostra A6 contaminada com resíduo de azoxistrobina (0,202 mg kg⁻¹) e o seu LOQ (0,005 mg kg⁻¹).



Legenda: Eixo x: tempo (minutos), Eixo y: intensidade em percentual (%). Fonte: A autora (2022).

Os triazóis são fungicidas de ação sistêmica, formados por compostos heterocíclicos constituídos por três átomos de nitrogênio no mesmo núcleo cíclico. São sintéticos e possuem atividade biológica, sendo divididos em três sais: 1,2,3-triazol monocíclico, benzotriazóis e 1,2,3-triazol. Neste último grupo encontra-se o difenoconazol que foram encontrados em 12 amostras em quantidades abaixo do LMR permitido pela ANVISA (ANVISA, 2013).

O inseticida imidacloprido também foi detectado em uma das amostras analisadas numa faixa de concentração abaixo do LOQ. Esse agrotóxico possui o uso autorizado no Brasil para a cultura do mamão com LMR de $0,50 \text{ mg kg}^{-1}$. Ele é um inseticida sistêmico e de contato altamente efetivo, usado geralmente na aplicação foliar contra insetos sugadores, como a mosca branca e outros polinizadores, e até mesmo no controle de pulgas em animais domésticos, moscas em animais de fazenda e piolhos em ovelhas (RAFATIAN *et al.*, 2022). Ele se encontra entre os nove ingredientes ativos de pesticidas mais comercializados no Brasil no ano de 2020. Segundo relatório do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2020), neste mesmo ano, foram vendidas em território nacional 9.401,65 toneladas do princípio ativo. Ele é considerado um inseticida altamente seletivo, e por esse motivo não deveria apresentar toxicidade em mamíferos. Porém, há inúmeros estudos apontam que o imidacloprido tem alta capacidade de danificar o fígado, provocando lesões do tipo hepatocelular (MCCULLOCH *et al.*, 2022).

O inseticida acetamiprido foi detectado e quantificado em três das amostras analisadas e apresentou uma faixa de concentração abaixo do LOQ. Este possui registro no Brasil para uso na cultura do mamão com LMR estabelecido $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$ e na EU com LMR de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$. Tem sua utilização através de pulverizações terrestres ou aéreas, geralmente para o controle da mosca-branca na cultura, sendo considerado, junto com outros neonicotinoides como imidacloprido e tiametoxam, responsável pela diminuição considerável na população de abelhas (XU *et al.*, 2022).

A Tabela 17 apresenta os resultados para a análises das 18 amostras em que foi possível identificar algum resíduo de agrotóxicos avaliado neste estudo. Cabe destacar que nenhuma das amostras possuía o selo de alimento orgânico. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com outros estudos publicados para a determinação de agrotóxicos em mamão, conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 17 – Resíduos de agrotóxicos, em mg kg⁻¹, encontrados nas amostras de mamão analisadas através do método validado, utilizando QuEChERS e UHPLC-MS/MS.

Agrotóxicos	LOQ (mg kg ⁻¹)	Concentração nas amostras (mg kg ⁻¹) dos agrotóxicos detectados																	
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18
Acetamiprido	0,010	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ
Azoxistrobina	0,005	<LOQ	n.d	0,013	n.d	n.d	0,202	0,005	0,008	0,007	0,010	n.d	<LOQ	n.d	<LOQ	0,226	0,005	0,044	<LOQ
Carbendazim	0,005	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d	<LOQ	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ
Clomazone	0,005	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d
Difenoconazol	0,005	n.d	n.d	<LOQ	0,015	0,025	0,013	0,012	0,008	0,008	0,007	n.d	0,008	n.d	n.d	n.d	<LOQ	0,027	<LOQ
Epoxiconazol	0,005	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d
Espiromesifeno	0,005	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	0,006	n.d	n.d
Etefon	0,005	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Flutriafol	0,005	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d
Imidacloprido	0,005	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Mandipropamida	0,005	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Metalaxil	0,005	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Picoxistrobina	0,005	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Propamocarbe	0,005	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d
Tiabendazol	0,005	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Tiofanato Metílico	0,005	n.d	0,007	n.d	n.d	n.d	0,070	n.d	<LOQ	0,020	0,050	<LOQ	<LOQ	0,060	0,030	0,317	0,007	<LOQ	n.d
Trifloxistrobina	0,005	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Fonte: o autor, 2022. Legenda: n.d.- não detectado.

Outros agrotóxicos também foram detectados, estes em concentrações baixas ou abaixo do LOQ do método. Os resultados são apresentados de forma resumida na Tabela 18, onde é apresentado o número de amostras em que cada um dos compostos foi encontrado, a variação da concentração, o LOQ e os LMRs de cada um dos agrotóxicos.

Tabela 18 – Resultados da análise de 18 amostras comerciais de mamão, em relação a concentração encontrada, limite de quantificação do método (LOQ) e o limite máximo de resíduos (LMR) permitidos pela ANVISA, UE e Codex Alimentarius.

Agrotóxicos	Número de amostras	Concentração encontrada (mg kg⁻¹)	LOQ (mg kg⁻¹)	ANVISA (mg kg⁻¹)	UE (mg kg⁻¹)	Codex Alimentarius (mg kg⁻¹)
Acetamiprido	3	<LOQ	0,010	0,10	0,01	-
Azoxistrobina	13	<LOQ a 0,226	0,005	6,00	0,30	0,30
Carbendazim	9	<LOQ	0,005	-	0,02	-
Clomazone	2	<LOQ	0,005	-	-	-
Difenoconazol	12	<LOQ a 0,027	0,005	0,30	0,20	0,20
Epoxiconazol	1	<LOQ	0,005	-	-	-
Espiromesifeno	1	<LOQ a 0,006	0,005	0,70	1,00	-
Etefon	1	<LOQ	0,005	-	-	-
Flutriafol	1	<LOQ	0,005	0,50	0,01	-
Imidacloprido	1	<LOQ	0,005	2,00	0,01	-
Mandipropamida	1	<LOQ	0,005	2,00	0,01	-
Metalaxil	1	<LOQ	0,005	-	-	-
Picoxistrobina	1	<LOQ	0,005	0,10	0,01	-
Propamocarbe	1	<LOQ	0,005	2,00	0,01	-
Tiabendazol	1	<LOQ	0,005	6,00	10,00	10,00
Tiofanato metílico	12	<LOQ a 0,317	0,005	0,50	1,00	-
Trifloxistrobina	1	<LOQ	0,005	0,05	0,60	0,60

Fonte: A autora (2022), adaptado de ANVISA (2022a); EU (2022); FAO (2022).

Legenda: *Limite mínimo de determinação analítica.

5 CONCLUSÃO

O trabalho visou o desenvolvimento de um método QuEChERS para determinação multirresíduo de ampla gama de agrotóxicos em amostras de mamão utilizando UHPLC-MS/MS. Foram avaliadas as diferentes versões do método QuEChERS bem como a eficiência de diferentes sorventes a serem utilizados na etapa de limpeza.

Os parâmetros de validação demonstraram que o método é adequado para análise dos 110 agrotóxicos em amostras mamão. O método demonstrou boa linearidade ($r^2 > 0,990$), exatidão (recuperações entre 70 e 120%) e precisão (RSD $\leq 20\%$), com valores de LOQ do método entre 0,005 e 0,010 mg kg⁻¹, abaixo dos LMRs estabelecidos pela ANVISA, União Europeia e *Codex Alimentarius* para a cultura. A detecção dos compostos utilizando equipamentos UHPLC-MS/MS proporcionou satisfatória detectabilidade, seletividade, exatidão e precisão na etapa de validação.

O método validado demonstrou ser eficiente para analisar amostras comerciais de mamão e nestas foram encontrados resíduos de agrotóxicos em todas as 18 amostras analisadas. Para os compostos que possuem LMR estabelecido, os resultados estão de acordo com a legislação. O agrotóxico que se destacou foi a azoxistrobina, sendo encontrado em 13 das 18 amostras avaliadas. Foram encontrados agrotóxicos que não possuem seu uso autorizado para esta cultura, o que destaca a importância da necessidade de avaliações e monitoramento de resíduos para essa cultura.

Quando avaliado, o método proposto é considerado adequado para a determinação multirresíduos de agrotóxicos em mamão e matrizes semelhantes, apresentando as vantagens de ser um procedimento simples, rápido e abrangente, podendo ser usado na rotina de laboratório, assegurando a confiabilidade dos resultados, bem como atingindo os objetivos propostos, visto que todos os parâmetros de validação atenderam as exigências de validação de métodos analíticos.

Sendo assim, o método proposto, empregando QuEChERS original com etapa de limpeza do extrato utilizando Strata SDB-L e a quantificação por sistema UHPLC-MS/MS demonstrou-se eficaz para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em mamão, podendo ser amplamente utilizado em análises de rotina. Este trabalho é de grande importância para as áreas de saúde humana e poluição ambiental, pois proporciona um método rápido, fácil e barato para ser empregado na determinação

de alimentos e outras matrizes. Tendo em vista que várias matrizes alimentares possuem resíduos de agrotóxicos que implicam diretamente em danos à saúde humana e na contaminação ambiental.

6 DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos gerados durante a execução do presente trabalho foram separados em sólidos e líquido e identificados. Em seguida tais resíduos foram encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. Então, a partir do almoxarifado os resíduos foram encaminhados para uma empresa terceirizada, a qual realiza o tratamento e descarte adequado.

Os resíduos líquidos foram divididos em halogenados e não halogenados e acondicionados em frascos identificados, de acordo com recomendação do departamento. Já os resíduos sólidos foram colocados em sacos plásticos identificados como material contaminado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAFRUTAS (Brasília). Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frutas e Derivados. **Dados estatísticos**. 2021. Disponível em: <https://abrafrutas.org/dados-estatisticos/>. Acesso em: 10 ago. 2022.

AGILENT, 2022. **Bond Elut NEXUS & Bond Elut NEXUS WCX Solid Phase Extraction (SPE)** Disponível em: <https://www.agilent.com/en/product/sample-preparation/solid-phase-extraction-spe/bond-elut-nexus-bond-elut-nexus-wcx>. Acesso em: 28 jul. 2022.

AGROFIT. **Consulta aberta**: ministério da agricultura, pecuária e abastecimento - coordenação-geral de agrotóxicos e afins/dfia/sda. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/SDA. 2021. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.>. Acesso em: 01 ago. 2022.

AGUIAR, C. A. S. J. *et al.* Extração em fase sólida de resíduos de agrotóxicos de água superficial, empregando um sorvente de menor retenção. **Química Nova**, v. 6, n. 41, p. 643-647, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170223>. Acesso em: 15 ago. 2022.

ALBARNAZ, K. S. da. **Desenvolvimento de método multirresíduo para determinação de agrotóxicos em suco de uva integral utilizando método QUECHERS acetato e LC-MS/MS**. 2021. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Química Analítica, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2021.

ANASTASSIADES, M. *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-31, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12723926/> Acesso em: 15 ago. 2022.

ANASTASSIADES M. SCHERBAUM E, TASDELEN B, STAJNBAHER D. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. **Crop protection, public health, environmental safety**, v. 439. Wiley-vch, Weinheim. Germany, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9783527611249.ch46>. Acesso em: 15 ago. 2022.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério da Saúde. RDC nº 166, de 24 de junho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 25 jul. 2017. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em: 15 ago. 2022.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA 2017-2018**. 2019a. Disponível

em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3770json-file-1>. Acesso em: 17 mai 2022.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério da Saúde. RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Dispõe sobre os critérios para avaliação e classificação toxicológica, priorização da análise e comparação da ação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 31 jul. 2019b. ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Monografias Autorizadas. 2022a. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias>. Acesso em: 21 jul. 2022.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério da Saúde. RDC nº 739/2022 do dia 08 de agosto de 2022. Dispõe sobre a proibição do ingrediente ativo Carbendazim em produtos agrotóxicos no país e sobre as medidas transitórias de mitigação de riscos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 08 ago. 2022b. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>. Acesso em: 15 ago. 2022.

ARRUDA, M. A. Z.; SANTELLI, R. E. Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 638-646, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40421997000600012>. Acesso em: 15 ago. 2022.

BALCON GARDEN WEB. 14 Different Types of Papayas: Best Tasting Papaya Variety. Disponível em: <https://balconygardenweb.com/different-types-of-papayas-best-tasting-variety/>. Acesso em: 24 out 2022.

BARKER, S. A.; HSIEH, L. C.; SHORT, C. R. Methodology for the analysis of fenbendazole and its metabolites in plasma, urine, feces and tissue homogenates. **Anal. Biochem.** 155, 112-118, 1989. Disponível em: DOI: 10.1016/0003-2697(86)90234-4. Acesso em: 15 ago. 2022.

BASSO, C.; SIQUEIRA, A. C. F.; RICHARDS, N. S. P. dos S. Impactos na saúde humana e no meio ambiente relacionados ao uso de agrotóxicos: uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, [S.L.], v. 10, n. 8, p. 1-14, 15 ago. 2022. Research, Society and Development. Disponível em: DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17529>. Acesso em: 15 ago. 2022.

BEDASSA, T., GURE, A., MEGERSA, N. Modified QuEChERS method for the determination of multiclass pesticide residues in fruit samples utilizing high-performance liquid chromatography. **Food analytical methods**, v. 8, n. 8, p. 2020-2027, 2015. Disponível em: DOI: 10.1007/s12161-014-0081-7. Acesso em: 15 ago. 2022.

BENBROOK, C. M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, v. 28, n. 1, p. 1-15, 2016. Disponível em: doi: 10.1186/s12302-016-0070-0. Acesso em: 15 ago. 2022.

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

BOTERO-COY, A. M., MARÍN, J. M., IBÁÑEZ, M., SANCHO, J. V., HERNANDEZ, F. Multi-residue determination of pesticides in tropical fruits using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 402, n. 7, p. 2287-2300, 2012. Disponível em: DOI: 10.1007/s00216-011-5431-3. Acesso em: 15 ago. 2022.

BRASIL, 2017. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano de Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pncrcvegetal>>. Acesso em: 16 set. 2022.

BRASIL, 2017. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166 de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 de julho de 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 15 ago. 2022.

BRASIL, 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 05**, de 23 de abril de 2019. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-econtaminantes/InstruoNormativa N05.2019PNCRC2019.pdf/view>>. Acesso em: 15 set. 2022.

BRASIL. Lei Federal 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. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 11 jul. 1989. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm>. Acesso em: 15 set. 2022.

CABRERA, L. C. *et al.* Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 227-240. Brasil, 2012. Disponível em: DOI:10.4322/sc.2012.013. Acesso em: 15 ago. 2022.

CALDAS, S. S. *et al.* Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000900021>. Acesso em: 15 ago. 2022.

CANINI, A. *et al.* Gas chromatography–mass spectrometry analysis of phenolic compounds from *Carica papaya* L. leaf. **Journal of food composition and analysis**,

v. 20, n. 7, p. 584-590, 2007. Disponível em: DOI:10.1016/j.jfca.2007.03.009. Acesso em: 15 ago. 2022.

CARNEIRO, F. F. *et al.* Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. **EPSJV/Expressão Popular**, 2015. Disponível em: https://conferenciaclacso.org/programa/resumen_ponencia.php?&ponencia=Conf-1-4002-39314&. Acesso em: 15 ago. 2022.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000300030>. Acesso em: 15 ago. 2022.

CIOLA, R. **Fundamentos de Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 1998. 178 p.

CISCATO, C. H. P.; GEBARA, A. B.; MONTEIRO, S. H. Pesticide residue monitoring of Brazilian fruit for export 2006–2007. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v. 2, n. 2, p. 140-145, 2009. Disponível em: DOI:10.1080/19440040903330326. Acesso em: 15 ago. 2022.

CODEX ALIMENTARIUS. Method validation, joint FAO/WHO food standards programme. **Codex on Methods of Analysis and Sampling**, Budapeste, 2001. Disponível em: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/zh/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-1540%252FCRD%252Fmas40_CRD04_rev1e.pdf. Acesso em: 15 ago. 2022.

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

COELLO-VILLANUEVA, J. M., ACERETO-ESCOFFIÉ, P. O. M., BARRÓN-ZAMBRANO, J. A., MUÑOZ-RODRÍGUEZ, D. Evaluation of QuEChERS Method for GC Analysis of Pesticides in Tropical Fruits from Yucatan, Mexico. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 61, n. 4, p. 290-296, 2017. Disponível em: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870249X2017000400290 Acesso em: 15 ago. 2022.

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

COSTA, A. de FS da; PACOVA, Braz Eduardo Vieira. Caracterização de cultivares, estratégias e perspectivas do melhoramento genético do mamoeiro. Martins, DS y Costa, AFS A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção. Vitória: Incaper, Cap, v. 3, p. 59-102, 2003.

DE AMORIM TOMAZ, P. H. *et al.* Conservação de frutos de mamão na pós-colheita com uso de biofilme à base de fécula de mandioca. **Brazilian Journal of**

Development, v. 7, n. 9, p. 88564-88574, 2021. Disponível em: DOI:10.34117/bjdv7n9-154. Acesso em: 15 ago. 2022.

MELO, A. S. DE; COSTA, C. X.; BRITO, M. E. B.; VIÉGAS, P. R. A.; SILVA JÚNIOR, C. D. Produção de mudas de mamoeiro em diferentes substratos e doses de fósforo. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, p.257-261, 2007. Disponível em: DOI: <https://doi.org/10.5039/agraria.v2i4a1838>. Acesso em: 15 ago. 2022.

DEGANI, A. L.; CASE, Q. L.; VIERA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21-25, 1998. Disponível em: https://www.academia.edu/36672093/Cromatografia_um_breve_ensaio. Acesso em: 15 ago. 2022.

DE MEDEIROS, M. B. *et al.* Principais Produtos Químicos Responsáveis por Acidentes de Intoxicações em Municípios da Paraíba **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, 2009. Disponível em <https://revistas.aba-agroecologia.org.br/cad/article/download/4981/3640/20983> Acesso em: 15 ago. 2022.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **O cultivo do mamão**. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/642741/o-cultivo-do-mamao>. Acesso em: 10 out. 2022.

FACCIN, H. *et al.* Study of ion suppression for phenolic compounds in medicinal plant extracts using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1427, p. 111-124, 2016. Disponível em: DOI: 10.1016/j.chroma.2015.12.017. Acesso em: 15 ago. 2022.

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

FAOSTAT (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). **Indicators**: commodity balances. 2018. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/CB>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

FAOSTAT (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). **Indicators**: products - papaya. Products – carica papaya. 2021. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

FEKETE, S. *et al.* Current and future trends in UHPLC. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 63, p. 2-13, 2014. Disponível em: DOI:10.1016/j.trac.2014.08.007. Acesso em: 15 ago. 2022.

FREITAS, S. S., SERAFIM, F. A., LANÇAS, F. M. Fernando M. Determination of target pesticide residues in tropical fruits employing matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction followed by high resolution gas chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, p. 1140-1148, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180041>. Acesso em: 15 ago. 2022.

GALLI, A. *et al.* Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100020>. Acesso em: 15 ago. 2022.

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

HABER, R. A. *et al.* Papaya (*Carica papaya* L.) for cancer prevention: Progress and promise. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-21, 2022. Disponível em: DOI: 10.1080/10408398.2022.2079607. Acesso em: 15 ago. 2022.

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

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

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Produção agropecuária: produção de mamão**. Produção de Mamão. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/mamao/br>. Acesso em: 15 ago. 2022.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. Norma nº DOQ-CGCRE-008: **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. rev. 09. Rio de Janeiro. Jun. 2020. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_08.pdf. Acesso em: 15 ago. 2022.

JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. **Química Nova**, v. 32, p. 1898-1909, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000700036>. Acesso em: 15 ago. 2022.

KOUL, B. *et al.* *Carica papaya* L.: A Tropical Fruit with Benefits beyond the Tropics. **Diversity**, v. 14, n. 8, p. 683, 2022. Disponível em: DOI:10.3390/d14080683. Acesso em: 15 ago. 2022.

LAAJIMI, H. *et al.* Experimental methods in chemical engineering: Gas chromatography—GC. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cjce.24395>. Acesso em: 15 ago. 2022

LAMBROPOULOU, D.A.; ALBANIS, T.A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography—mass spectrometry-based techniques: a review. **Anal Bioanal Chem**, p. 1663-1683, Grécia, 2007. Disponível em: DOI: 10.1007/s00216-007-1348-2. Acesso em: 15 ago. 2022.

LANÇAS, F.M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27-46, 2009. Disponível em: DOI:10.4322/sc.2013.005. Acesso em: 15 ago. 2022.

LARA-ABIA, S. *et al.* High hydrostatic pressure-assisted extraction of carotenoids from papaya (*Carica papaya* L. cv. Maradol) tissues using soybean and sunflower oil as potential green solvents. **Food Engineering Reviews**, v. 13, n. 3, p. 660-675, 2021. Disponível em: DOI:10.1007/s12393-021-09289-6. Acesso em: 15 ago. 2022.

LEHOTAY, S. J. *et al.* Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 88, p. 615-629, 2005. Disponível em: PMID: 15859090. Acesso em: 15 ago. 2022.

LEMOS, M. F., LEMOS, M. F., PACHECO, H. P., SCHERER, R. Monitoring of organophosphorous pesticide residues in samples of banana, papaya, and bell pepper. **Química Nova**, v. 38, p. 268-273, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150005>. Acesso em: 15 ago. 2022.

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

MCCULLOCH, M. *et al.* The impact of imidacloprid and its metabolites on long-term neurodevelopmental and neurodegenerative disorders in a Zebrafish model. **Toxicologie Analytique et Clinique**, v. 34, n. 3, p. S140-S141, 2022. Disponível em: DOI: 10.1080/15287390701613140. Acesso em: 15 ago. 2022.

MAFFEI, D. F.; NOGUEIRA, A. R. de A.; BRONDI, S. H. G. Determinação de resíduos de pesticidas em plasma bovino por cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1713-1716, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000700006>. Acesso em: 15 ago. 2022.

MALDANER, L.; JARDIM, I. UHPLC Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**. v. 4, p. 197-207, 2012. Disponível em: <https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v4n3a14.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2022.

MARTINS, M. L. *et al.* Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 29-45, 2012. Disponível em: <https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v4n1a4.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2022.

MERCK, 2022. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/applications/analytical-chemistry/sample-preparation/solid-phase-extraction>. Acesso em: 28 jul. 2022. Acesso em: 15 ago. 2022.

MORAES, C. R. L.; SHINOHARA, N. K. S. Diversidade frutífera no território da Universidade Federal Rural de Pernambuco–UFRPE Sede. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 10, p. e240111032628-e240111032628, 2022. Disponível em: DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i10.32628>. Acesso em: 15 ago. 2022.

MORAIS, E. H. da C.; BEGNINI, F. R.; JARDIM, I. C. S. F. Técnicas de preparo de amostra empregadas na determinação de agrotóxicos carbamatos em água e solo. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 2, p. 146-162, 2013. Disponível em: <https://doi.editoracubo.com.br/10.4322/sc.2013.011>. Acesso em: 15 ago. 2022.

MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; PERES, F. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n.2, p.299-311, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-81232002000200010>. Acesso em: 15 ago. 2022.

MOREIRA, J.C. *et al.* Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola em Nova Friburgo-RJ, **Ciência e Saúde Coletiva**. v.7, p. 1-22, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-81232002000200010>. Acesso em 15 ago. 2022.

MPF (Ministério Público Federal). **MPF/DF quer suspender registro de agrotóxicos com carbendazim no Brasil**: Processo 0051862-73.2013.4.01.3400. 2013. Disponível em: <http://www.mpf.mp.br/df/@_@search?path=&SearchableText=0051862-73.2013.4.01.3400>. Acesso em: 11 ago. 2022.

OLIVEIRA, T. A. **Desenvolvimento de filmes à base de fécula de mandioca e aditivos naturais e sua aplicação na conservação de mamão**. 2014. Tese de Doutorado. Tese (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

OPS (Organização Pan-americana da Saúde). Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. **Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância Sanitária. Brasília: Organização Pan-americana da Saúde/OMS, 1996 Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro2.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2022.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F.; Evaluation of dispersive and cartridge SPE clean-up procedures using the modified QuEChERS method for the analysis of pesticides in strawberries; **Anal. Methods**, v. 7, p. 982, 2015. Disponível em: DOI <https://doi.org/10.1039/C4AY01867B>. Acesso em: 15 ago. 2022.

PANIAGUA-ZAMBRANA, Narel Y.; BUSSMANN, Rainer W.; ROMERO, Carolina. Carica papaya L. Vasconcellea pubescens A. DC. C aricaceae. **Ethnobotany of the Andes**, p. 1-10, 2020. Disponível em: DOI:10.1007/978-3-319-77093-2_57-1. Acesso em: 15 ago. 2022.

PANO-FARIAS, N. S., CEBALLOS-MAGAÑA, S. G., JURADO, J. M., AGUAYO-VILLARREAL, I. A., MUÑIZ-VALENCIA, R. Analytical method for pesticides in avocado and papaya by means of ultra-high performance liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass detector: Validation and uncertainty assessment. **Journal of food science**, v. 83, n. 8, p. 2265-2272, 2018. Disponível em: DOI: 10.1111/1750-3841.14210. Acesso em: 15 ago. 2022.

PATERNINA, G. A.; LUNA, F. V.; BERMUDEZ, A. A. Nutraceutical, thermophysical and textural characteristics of papaya (*Carica papaya* L) and incidence for post-harvest management. **Heliyon**, v. 8, n. 4, p. e09231, 2022. Disponível em: DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e09231. Acesso em: 15 ago. 2022.

PELAEZ, V. M. *et al.* A (des)coordenação de políticas para a indústria de agrotóxicos no Brasil. **Revista Brasileira de Inovação**, 14, p. 153-178, 2015. Disponível em: <https://revista.fct.unesp.br/index.php/cpg/article/download/7760/5870/30173>. Acesso em: 15 ago. 2022.

PERES, F.; MOREIRA, J.C.; DUBOIS, G.S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F.; MOREIRA, J.C.; orgs. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. p. 21-41. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2005000100042>. Acesso em: 15 ago. 2022.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Instituto Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002. Disponível em: <http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/bio/v64_2/peres.pdf>. Acesso em: 29 set. 2022

PEREZ, M. A. F. Validação de métodos analíticos: Como fazer. **Instituto de tecnologia de alimentos**. Cetea: Informativo, v. 22. n. 3, p.1-9, 2010. Disponível em: <https://ital.agricultura.sp.gov.br/arquivos/cetea/informativo/v22n3/v22n3_artigo2.pdf>. Acesso em: 11 out. 2022.

PIGNATI, W. Entenda por que o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo. [Entrevista cedida a] Mariana Lucena. **Galileu**, [s.l.]: Notícias/perigo, dez. 2018. Disponível em: <<http://revistagalileu.globo.com/Revista/Common/0,,ERT150920-17770,00.html>>. Acesso em: 22 set. 2022.

PPDB- Pesticide Properties Database: Creating Tools For Pesticide Risk Assessment and Management in Europe Developed by The Agriculture & Environment Research Unit (AERU), University Of Hertfordshire (Funded by UK National Sources and The EU Funded Project). 2020. Disponível em: <https://Sitem.Herts.Ac.Uk/Aeru/Ppdb/En/> Acesso em: 12 jun 2022.

PRESTES, O. D. **Desenvolvimento e validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em arroz polido utilizando método QuEChERS modificado, clean-up dispersivo e GC-MS (NCI-SIM)**. 2007. 117 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 51-64, 2011. Disponível em: <https://doi.editoracubo.com.br/10.4322/sc.2011.004>. Acesso em: 29 set. 2022

PRESTES, Osmar D. *et al.* QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6,

p. 1620-1634, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600046>. Acesso em: 29 set. 2022

PROGRAMA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS PARA <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3778json-file-1>. Disponível em: Acesso em: 29 set. 2022

RAFATIAN, Z.; ZANDI-SOHANI, N.; YARAHMADI, F. Sublethal effects of some insecticides on the functional response of *Aenasius bambawalei* Hayat, 2009 (Hymenoptera: Encyrtidae). **Acta agriculturae Slovenica**, v. 118, n. 2, p. 1-8, 2022. Disponível em: doi: 10.1093/jee/toy069. Acesso em: 29 set. 2022

REBELO, R. M.; CALDAS, E. D. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1199-1208, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140165> Acesso em: 29 set. 2022

REIS, R. C. *et al.* Compostos bioativos e atividade antioxidante de variedades melhoradas de mamão. **Ciência Rural**, v. 45, p. 2076-2081, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140776>. Acesso em: 29 set. 2022

RIBANI, M.; BETTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>. Acesso em: 29 set. 2022

RUGGIERO, C.; MARIN, S. L. D.; DURIGAN, J. F. Mamão, uma história de sucesso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 76-82, out. 2011. Número especial. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000500011>. Acesso em: 29 set. 2022

SANCHO, L. E. Gayosso-García; Y., Elhadi M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1284-1291, 2011. Disponível em: DOI:10.1016/j.foodres.2010.12.001. Acesso em: 29 set. 2022

SANTANA, L. R. R.; MATSUURA, F. C. A. U; CARDOSO, R. L. Genótipos melhorados de mamão (*Carica papaya* L.): avaliação sensorial e físico-química dos frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 217-222, abr./jun. 2004. Disponível em: DOI: 10.1590/S0101-20612004000200010. Acesso em: 29 set. 2022

SANTÉ, EUROPEAN COMMISSION. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. **Document nº SANTE/12682/2019**. Disponível em: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf. Acesso em: 29 set. 2022

SERRANO, Luiz Augusto Lopes; CATTANEO, Laercio Francisco. O cultivo do mamoeiro no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452010000300001>. Acesso em: 29 set. 2022

SILVA, E. P.; SOUZA, J. R. de; CALDAS, Eloisa Dutra. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 111-122, 2014. Disponível em: DOI:10.5935/1981-2965.20200047. Acesso em: 29 set. 2022

SILVA, Fernanda Aparecida *et al.* Competitividade das exportações brasileiras de mamão, 1995 a 2008. **Revista de Economia e Agronegócio**, v. 9, n. 3, 2011. Disponível em: <https://periodicos.ufv.br/rea/article/download/7516/3107/32304>. Acesso em: 29 set. 2022

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

TENGATTINI, S. *et al.* Effect of mobile phase pH on liquid chromatography retention of mepartricin related compounds and impurities as support to the structural investigation by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 220, p. 114971, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114971>. Acesso em: 29 set. 2022

UNICAMP (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS). **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO**. 4. ed. UNICAMP: Campinas, 2011. Disponível em: <https://www.cfn.org.br/wpcontent/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf>. Acesso em: 09 set. 2022.

VALERA-TARIFA, N. M. *et al.* Development and full validation of a multiresidue method for the analysis of a wide range of pesticides in processed fruit by UHPLC-MS/MS. **Food chemistry**, v. 315, p. 126304, 2020. Disponível em: DOI:10.1016/j.foodchem.2020.126304. Acesso em: 29 set. 2022

VAN DROOGENBROECK, B. *et al.* AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, n. 2, p. 289-297, 2002. Disponível em: DOI:10.1007/s00122-002-0983-4. Acesso em: 29 set. 2022

VERAS, J. N. A.; DE PINHO, R. C.; MACHADO, A. Importância das plantas alimentícias não convencionais (PANC) para a segurança alimentar na comunidade Pium (TI Manoá-Pium, Roraima, Brasil). **Tellus**, p. 61-82, 2022. Disponível em: DOI: <https://doi.org/10.20435/tellus.v22i47.770>. Acesso em: 29 set. 2022

VINHA, A. F., *et al.* Chemical Composition and Antioxidant Activity of Portuguese Diospyros Kaki Fruit by Geographical Origins. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 2, p. 281-289, 2012. Disponível em: doi:10.5539/jas.v4n2p281. Acesso em: 29 set. 2022

WIJAYA, H. Flavour of papaya (*Carica papaya* L.) fruit. **BIOTROPIA-The Southeast Asian Journal of Tropical Biology**, v. 20, n. 1, 2013. Disponível em: DOI: <https://doi.org/10.11598/btb.2013.20.1.288>. Acesso em: 29 set. 2022

WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 803-812, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.094>. Acesso em: 29 set. 2022.

XU, M. *et al.* Neonicotinoid Microsphere Immunosensing for Profiling Applications in Honeybees and Bee-Related Matrices. **Biosensors**, v. 12, n. 10, p. 792, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/bios12100792>. Acesso em: 29 set. 2022

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

ZOU, Z. *et al.* Genomic Analysis of LEA Genes in *Carica papaya* and Insight into Lineage-Specific Family Evolution in Brassicales. **Life**, v. 12, n. 9, p. 1453, 2022. Disponível em: DOI:10.3390/life12091453. Acesso em: 29 set. 2022.