

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

Giovane Santos dos Reis

MÉTODO MULTIRRESÍDUO RÁPIDO PARA A DETERMINAÇÃO DE  
AGROTÓXICOS EM ABOBRINHA EMPREGANDO QuEChERS  
MODIFICADO E UHPLC-MS/MS

Santa Maria, RS  
2022

Giovane Santos dos Reis

**MÉTODO MULTIRRESÍDUO RÁPIDO PARA A DETERMINAÇÃO DE  
AGROTÓXICOS EM ABOBRINHA EMPREGANDO QuEChERS  
MODIFICADO E UHPLC-MS/MS**

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

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella  
Coorientador: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

Santa Maria, RS  
2022

Reis , Giovane Santos dos  
Método Multirresíduo Rápido para a Determinação de  
Agrotóxicos em Abobrinha empregando QuEChERS modificado e  
UHPLC-MS/MS / Giovane Santos dos Reis .- 2022.  
109 p.; 30 cm

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

1. Abobrinha 2. Agrotóxicos 3. QuEChERS 4. UHPLC  
MS/MS I. Zanella, Renato II. Damian Prestes, Osmar III.  
Título.

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

Declaro, GIOVANE SANTOS DOS REIS , 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.

**Giovane Santos dos Reis**

**MÉTODO MULTIRRESÍDUO RÁPIDO PARA A DETERMINAÇÃO DE  
AGROTÓXICOS EM ABOBRINHA EMPREGANDO QuEChERS MODIFICADO 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 a obtenção do título de **Mestre em Química**, área de concentração Química Analítica.

Aprovada em 14 de outubro de 2022:

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

**Carla Sirtori, Dr<sup>a</sup>. (UFRGS)**

**Manoel Leonardo Martins, Dr. (FURG)**

Santa Maria, RS  
2022

*Pois Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.  
A ele seja a glória  
para sempre! Amém.  
Romanos 11:36*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Renato Zanella, pela orientação e por poder fazer parte do grupo do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP). Muitos momentos de aprendizado, construção de relações pessoais e profissionais foram proporcionados através dessa experiência única.

Ao Professor Dr. Osmar Damian Prestes e à Professora Dra. Martha Bohrer Adaime, pela acolhida ao grupo do LARP.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Química (PPGQ) da UFSM, por todos os ensinamentos ao longo do curso.

Aos funcionários do PPGQ, Ademir e Miguel, pela disposição e solicitude sempre que necessário.

À banca de defesa da dissertação, professores Dr. Manoel Leonardo Martins e Dra. Carla Sirtori, pela disponibilidade de avaliar este trabalho e por suas contribuições.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro fornecido.

Agradeço infinitamente a Deus por me capacitar e oportunizar viver essa experiência de realizar mais um sonho em minha caminhada. Sou o que sou, e estou onde estou, por Ele e não por mim mesmo. Pela graça e misericórdia de Cristo Jesus que sempre me acompanham e me sustentam, que concluo mais um ciclo na minha vida.

Gratidão aos meus familiares, por todas as orações e palavras de incentivo, em especial à minha mãe Marilene e meu pai Talcino por não medirem esforços para que os meus sonhos não fossem apenas mais do que um degrau a ser alcançado através do apoio, amor e suporte que me dedicam todos os dias.

Aos meus irmãos Guilherme e Gian, cunhada Bruna e minha sobrinha Lara pela compreensão e apoio incondicional.

Ao meu amigo Marcio, pela amizade e compartilhamento de momentos.

À minha amiga Carla, por todas as orações, palavras de carinho e amizade.

Aos meus amigos, integrantes do LARP, que fizeram desse caminho, um caminho menos árduo e mais prazeroso. Em especial ao Julliano, Rafael, Pimperelli, Júlia e Luana pelos momentos alegres vivenciados, sentirei saudades.

A todos que, de alguma forma me ajudaram na elaboração deste trabalho.

Muito obrigado!

## RESUMO

### MÉTODO MULTIRRESÍDUO RÁPIDO PARA A DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ABOBRINHA EMPREGANDO QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS

AUTOR: Giovane Santos dos Reis  
ORIENTADOR: Prof. Dr. Renato Zanella

Nas últimas décadas, o uso de agrotóxicos no Brasil e no mundo aumentou substancialmente, principalmente devido à demanda por alimentos. O Brasil possui destaque no cenário internacional, principalmente na produção e cultivo de frutas, hortaliças e grãos. A abobrinha, alimento de alto valor nutricional, fonte de carboidratos, vitaminas e antioxidantes está entre as principais hortaliças economicamente mais valiosas do país com alta produtividade anual. Embora seja necessário empregar estratégias que visem o aumento da qualidade e produtividade dos alimentos produzidos, como o uso de agrotóxicos, o uso incorreto e indiscriminado desses produtos químicos pode trazer efeitos prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente. Assim, agências de fiscalização e controle estabelecem limites máximos de resíduos (LMR) para diferentes agrotóxicos em alimentos. Logo, o desenvolvimento de métodos multirresíduos para determinação de agrotóxicos em alimentos, incluindo a abobrinha, se faz necessário e demonstra a importância do monitoramento e controle destes compostos para a garantia da segurança dos alimentos para o consumidor final. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método multirresíduo para a determinação de agrotóxicos em abobrinha utilizando método QuEChERS e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS). A extração consistiu em 10 g de amostra e 10 mL de acetonitrila. A etapa de partição foi realizada com 1 g de NaCl e 4 g de MgSO<sub>4</sub>, seguido de agitação manual e centrifugação a 3500 rpm por 8 minutos. O extrato foi diluído 1:4 em água ultrapura, filtrado em filtros de seringa 0,22 µm e analisado por UHPLC-MS/MS. Para as análises, foi utilizado o sistema Waters Acquity UPLC com espectrômetro de massas Xevo TQ equipado com fonte de ionização por eletronebulização (ESI). A análise cromatográfica foi realizada com coluna Acquity BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm) com fase móvel composta por (A) 2:98 metanol: água (v/v) e (B) 2:98 água: metanol (v/v), ambas contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico e formiato de amônio a 5 mmol L<sup>-1</sup>. A vazão foi de 0,225 mL min<sup>-1</sup> e o tempo total de corrida foi de 10 min. O monitoramento de reações selecionadas (SRM) foi utilizado como modo de aquisição. O método QuEChERS original sem etapa de limpeza foi validado para 99 compostos. O método foi aplicado em 20 amostras de abobrinha de diferentes cidades do Rio Grande do Sul, nas quais foram encontrados resíduos de 15 agrotóxicos. Com base nesses resultados, o método proposto mostrou-se adequado para determinação multiresíduo de agrotóxicos em abobrinha e pode ser aplicado em análises de rotina.

**Palavras-chave:** Preparo de amostra. Cromatografia. Diluição. LMR.

## ABSTRACT

### FAST MULTIRESIDUE METHOD FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDES IN ZUCCHINI USING MODIFIED QuEChERS AND UHPLC-MS/MS

AUTHOR: Giovane Santos dos Reis  
ADVISOR: Prof. Dr. Renato Zanella

In the last decades, the use of pesticides in Brazil and in the world has increased substantially, mainly due to the demand for food. Brazil stands out in the international scenario, mainly in the production and cultivation of fruits, vegetables and grains. Zucchini, a food of high nutritional value, source of carbohydrates, vitamins and antioxidants, is among the main economically most valuable vegetables in the country with high annual productivity. Although it is necessary to employ strategies aimed at increasing the quality and productivity of the food produced, such as the use of pesticides, the incorrect and indiscriminate use of these chemicals can have harmful effects on human health and the environment. Thus, inspection and control agencies establish maximum residue limits (MRL) for different pesticides in food. Therefore, the development of multi-residue methods for the determination of pesticides in foods, including zucchini, is necessary and demonstrates the importance of monitoring and controlling these compounds to ensure food safety for the final consumer. Thus, the objective of this work was to develop a multiresidue method for the determination of pesticides in zucchini using the QuEChERS method and ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Extraction consisted of 10 g of sample and 10 mL of acetonitrile. The partition step was performed with 1 g of NaCl and 4 g of MgSO<sub>4</sub>, followed by manual shaking and centrifugation at 3500 rpm for 8 minutes. The extract was diluted 1:4 in ultrapure water, filtered through 0.22 µm syringe filters and analyzed by UHPLC-MS/MS. For the analyses, the Waters Acquity UPLC system with a Xevo TQ mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) source was used. Chromatographic analysis was performed with an Acquity BEH C18 column (50 x 2.1 mm, 1.7 µm) with mobile phase composed of (A) 2:98 methanol:water (v/v) and (B) 2:98 water:methanol (v/v), both containing 0.1% (v/v) formic acid and ammonium formate at 5 mmol L<sup>-1</sup>. The flow rate was 0.225 mL min<sup>-1</sup> and the total run time was 10 min. Selected reaction monitoring (SRM) was used as the acquisition mode. The original QuEChERS method without cleaning step has been validated for 99 compounds. The method was applied to 20 zucchini samples from different cities of Rio Grande do Sul, in which residues of 15 pesticides were found. Based on these results, the proposed method proved to be suitable for multiresidue determination of pesticides in zucchini and can be applied in routine analysis.

**Keywords:** Sample preparation. Chromatography. Dilution. MRL.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção continental e mundial de abóboras, morangas e abobrinhas em 2018 .....	16
Figura 2 - Ranking brasileiro da produção em toneladas de abóboras, morangas e abobrinhas.....	17
Figura 3 – Representação das etapas do método QuEChERS.....	29
Figura 4 – Representação comparativa do método QuEChERS original, acetato e citrato.....	31
Figura 5 – Cromatograma de íons totais obtido por UHPLC-MS/MS a partir de uma amostra branco de abobrinha fortificada no nível 25 µg kg <sup>-1</sup> .....	62
Figura 6 – Número de compostos que apresentaram recuperações entre 70-120% e RSD ≤ 20% nas versões QuEChERS avaliadas .....	63
Figura 7 – Representação visual dos extratos após a utilização dos sorventes.....	65
Figura 8 – Número de compostos que apresentaram recuperações entre 70-120% e RSD ≤ 20% nos testes de limpeza do método QuEChERS original.....	66
Figura 9 – Teste T06 para avaliação de recuperação e efeito matriz dos compostos em diferentes fatores de diluição.....	68
Figura 10 – Cromatogramas GC-MS/MS no modo full scan dos extratos de amostra branco de abobrinha dos testes com limpeza e sem limpeza do extrato .....	71
Figura 11 – Representação visual do extrato filtrado após a diluição (T08a) e o extrato filtrado antes da diluição (T08b) .....	73
Figura 12 - Cromatogramas no modo full scan injetados no sistema GC-MS/MS Intuvo 9000 para os testes com limpeza e sem limpeza do extrato com filtração realizada antes e depois da diluição .....	74
Figura 13 - Representação do método QuEChERS modificado proposto para extração de agrotóxicos em abobrinha .....	75
Figura 14 - Cromatograma representativo obtido no modo SRM por UHPLC-MS/MS para o branco, branco reagente e o composto imidacloprido (50 µg kg <sup>-1</sup> ).....	76
Figura 15 - Curvas em solvente e em matriz do acefato .....	82
Figura 16 - Curva em solvente e em matriz do quinoxifeno .....	82
Figura 17 - Cromatograma positivo para o inseticida imidacloprido da amostra A9, sobreposto ao seu LMR e amostra branco de abobrinha.....	92

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Etapas do preparo de amostra QuEChERS original, acetato e citrato ....50

Quadro 2 - Comparativo dos resultados entre a utilização de C18 e sem limpeza ...69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal da abobrinha italiana .....	18
Tabela 2 - Agrotóxicos autorizados pela ANVISA para abobrinha e seus respectivos LMRs .....	20
Tabela 3 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos .....	22
Tabela 4 – Métodos de determinação de agrotóxicos em abobrinha e matrizes semelhantes .....	33
Tabela 5 - Parâmetros de avaliação na validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos.....	38
Tabela 6 – Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido, fórmula molecular e propriedades físico-químicas. ....	43
Tabela 7 - Amostras de abobrinha avaliadas no presente estudo e localidade de coleta .....	48
Tabela 8 - Gradiente da fase móvel utilizado para a determinação de agrotóxicos em abobrinha no sistema UHPLC-MS/MS .....	49
Tabela 9 – Sorventes utilizados na etapa de avaliação visual de limpeza dos extratos (T04).....	51
Tabela 10 – Condições empregadas no sistema cromatográfico UHPLC-MS/MS Xevo-TQ .....	57
Tabela 11 - Compostos determinados por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos tempos de retenção (tR), voltagem do cone (VC), íons precursores e produto, e energias de colisão (EC) utilizados. ....	58
Tabela 12 - Comparação do efeito matriz (%), por faixa percentual e calculado para todos os agrotóxicos avaliados, nas versões do método QuEChERS .....	64
Tabela 13 – Efeito matriz dos compostos avaliados para cada sorvente .....	66
Tabela 14 – Curvas analíticas no solvente e na matriz “branco” de abobrinha e coeficientes de determinação e valores de faixa linear .....	77
Tabela 15 - Resultados dos testes F e t Student e valor do efeito matriz para os compostos validados.....	79
Tabela 16 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS: LOQ, LOD, exatidão e precisão em termos de repetitividade e precisão intermediária .....	84

Tabela 17 – Resultados das análises das amostras de abobrinha em empregando o método desenvolvido e validado neste trabalho.....	91
--	----

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Cálculo do efeito matriz.....	51
Equação 2 – Equação da reta.....	53
Equação 3 – Cálculo do teste F.....	54
Equação 4 – Cálculo do t Student para variâncias iguais.....	54
Equação 5 – Cálculo do desvio padrão agrupado.....	55
Equação 6 – Cálculo do t Student para variâncias diferentes.....	55
Equação 7 – Cálculo do grau de liberdade.....	55
Equação 8 – Cálculo da recuperação.....	56
Equação 9 – Cálculo do desvio padrão relativo.....	56

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

ABCSEM	Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudanças
ACN	Acetonitrila
AGROFIT	Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C18	Octadecilsilano
CMD	Concentração média determinada
CTM	Curva de trabalho na matriz
CTS	Curva de trabalho no solvente
CV	Coeficiente de variação
DAD	Deteção por arranjo de diodos, do inglês <i>diode array detection</i>
DP	Desvio padrão
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
ECD	Detector por captura de elétrons, do inglês <i>electron capture detector</i>
EFSA	Autoridade europeia para a segurança alimentar, do inglês <i>european food safety authority</i>
EM	Efeito matriz
ESI	Ionização por eletronebulização, do inglês <i>electrospray ionization</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês <i>Food and Agriculture Organization</i>
FD	Detector por do inglês <i>fluorescence detection</i>
FDA	Administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos, do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FID	Detector por ionização por chama, do inglês <i>flame ionization detector</i>
FPD	Detector por fotometria de chamas, <i>flame photometric detector</i>
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 mMass spectrometry</i>
GHS	Sistema globalmente harmonizado, do inglês <i>globally harmonized system</i>
HAc	Ácido acético
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
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>
LMR	Limite máximo de resíduos
LOD	Limite de deteção, do inglês <i>limit of detection</i>

LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>limite of quantification</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>
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PC	Padrão de controle
pH	potencial Hidrogeniônico
PI	Padrão interno
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PSA	Amina primária secundária, do inglês <i>primary secondary amine</i>
QqQ	Triplo quadropolo
QuEChERS	Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, acrônimo do inglês <i>quick, easy, cheap, effective, rugged and safe</i>
rpm	Rotações por minuto
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>relative standard deviation</i>
SANTE	Saúde e proteção do consumidor, do francês <i>Santé et Protection des Consommateurs</i>
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 <sub>R</sub>	Tempo de retenção
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra alta eficiência, do inglês <i>ultra high performance liquid chromatography</i>
USDA	União Europeia e Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, do inglês <i>United States Department of Agriculture</i>
UV/Vis	Ultravioleta/visível
VC	Voltagem do cone

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1 OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
1.1.1 Objetivo geral .....	15
1.1.2 Objetivos específicos.....	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1 ABOBRINHA .....	16
2.1.2 Cultura da abobrinha italiana.....	18
2.2 RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS .....	21
2.3 MONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS .....	23
2.4 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS .....	24
2.4.1 Técnicas cromatográficas para determinação de resíduos de agrotóxicos .....	24
2.4.2 Cromatografia acoplada à espectrometria de massas para determinação de resíduos de agrotóxicos .....	25
2.4.3 Preparo de amostra para análise multirresíduo de agrotóxicos .....	26
2.4.3.1 Método QuEChERS .....	28
2.4.3.1.1 <i>Modificações do método QuEChERS</i> .....	31
2.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS E TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS NA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ABOBRINHA.....	32
2.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO .....	37
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
3.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	38
3.2 REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS UTILIZADOS .....	39
3.3 AGROTÓXICOS SELECIONADOS.....	41
3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS .....	42
3.5 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS .....	48
3.7 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO SISTEMA UHPLC-MS/MS .....	48
3.7.1 Escolha da fase móvel .....	48



3.7.2 Condições utilizadas no sistema UHPLC-MS/MS .....	49
3.8 TESTES DE PREPARO DE AMOSTRA .....	50
3.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABOBRINHA POR UHPLC-MS/MS.....	53
3.9.1 Seletividade.....	53
3.9.3 Efeito Matriz (EM).....	54
3.9.4 Exatidão e precisão .....	55
3.9.5 Limites de quantificação e detecção.....	56
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>57</b>
4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS EMPREGADO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ABOBRINHA.....	57
4.2 CONDIÇÕES DE IDENTIFICAÇÃO E CONFIRMAÇÃO POR UHPLC-MS/MS ..	57
4.3 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABOBRINHA .....	63
4.3.1 Avaliação da etapa de extração .....	63
4.3.2 Avaliação da etapa de limpeza.....	65
4.3.3 Avaliação das diluições do extrato .....	68
4.3.4 Avaliação qualitativa da limpeza e filtração dos extratos.....	70
4.3.5 Método de extração para a determinação de resíduos de agrotóxicos em abobrinha .....	75
4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS.....	75
4.4.1 Seletividade.....	76
4.4.2 Curva analítica e linearidade .....	76
4.4.3 Efeito matriz .....	79
4.4.4 Exatidão e precisão .....	83
4.4.5 Limite de detecção e quantificação .....	83
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>94</b>
<b>6 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS .....</b>	<b>95</b>
<b>7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>95</b>

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>96</b>
-------------------------	-----------

## 1 INTRODUÇÃO

A abobrinha é uma das hortaliças mais cultivadas no Brasil e está entre as hortaliças de maior valor econômico no país (CARPES *et al.*, 2008). É um alimento que possui alto valor nutricional e, por isso é utilizada in natura ou também como ingrediente principal na produção de tortas, doces e até ração animal (ARMOND *et al.*, 2016). Uma das principais formas de garantir a qualidade e produtividade da abobrinha e das mais diversas culturas de hortaliças e frutas é através do uso de agrotóxicos nas lavouras e plantações.

No Brasil, a utilização de agrotóxicos é uma das principais práticas realizadas para a fertilização de lavouras e plantações e isso advém do modelo agrícola brasileiro. O uso de agrotóxicos vem se intensificando substancialmente desde o início dos anos 1990, fazendo do país um dos principais consumidores desses produtos no mundo. Embora a utilização desses produtos químicos seja concentrada em algumas lavouras, como soja, milho e cana-de-açúcar, e em regiões como Centro-Oeste, Sul e no estado de São Paulo, a utilização de agrotóxicos gera resíduos que podem ser encontrados nas mais diversas matrizes alimentícias e, também, nos diferentes compartimentos ambientais (MORAES, 2019).

Uma vez que a geração de resíduos de agrotóxicos pode atingir o meio ambiente e ao ser humano, podendo causar danos ainda pouco conhecidos, as agências governamentais de diversos países estabelecem Limites Máximos de Resíduos (LMR) em alimentos a fim de garantir a segurança alimentar do consumidor e regulamentar o comércio externo de alimentos (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009).

No Brasil, a competência de estabelecer os LMR é da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que através das Monografias de Agrotóxicos estabelece quais são os limites máximos de resíduos de cada composto permitido para cada cultura de alimento. Com o objetivo de monitorar os índices de agrotóxicos nos alimentos em território nacional, a ANVISA criou o Programa de Monitoramento de Resíduos de Alimentos (PARA).

No último relatório divulgado pelo PARA no ano de 2020, referente às análises dos anos de 2017 e 2018, amostras de 14 culturas de alimentos foram analisadas. Os dados indicaram que 122 agrotóxicos dos 270 agrotóxicos pesquisados foram detectados nas amostras, além de 23% das amostras analisadas se encontrarem com algum tipo de irregularidade, evidenciando entre os fatores de monitoramento, a

utilização de diferentes agrotóxicos numa mesma cultura de amostra (ANVISA, 2020). No entanto, para se realizar a análise de amostras de alimentos de diferentes matrizes com o objetivo de determinar a concentração de diferentes classes de compostos de agrotóxicos de maneira simultânea, é necessário o desenvolvimento de um procedimento de preparo de amostra que abranja uma grande quantidade de compostos, os chamados métodos multirresíduo (PRESTES *et al.*, 2009).

O principal método de preparo de amostra multirresíduo empregado nos últimos anos é o método QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*). Esse método foi desenvolvido com a finalidade de extrair os agrotóxicos de hortaliças e frutas e preconiza que a extração seja realizada de uma maneira rápida, fácil, econômica, eficiente, robusta e segura (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Aliado ao preparo de amostra, técnicas analíticas de determinação e quantificação de agrotóxicos que forneçam resultados inequívocos são fundamentais em uma análise de resíduos de alimentos.

Dentre as técnicas analíticas desenvolvidas e largamente aplicadas para determinação de agrotóxicos em alimentos, a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC, do inglês *ultra high performance liquid chromatography*) com o acoplamento da espectrometria de massas em série (MS, do inglês *mass spectrometry*) é a que apresenta o maior grau de detectabilidade simultânea para um grande número de compostos, assim como a excelente distinção entre os compostos analisados, proporcionando ainda a quantificação dos compostos e a confirmação de suas identidades (SILVA; FARIA, 2020).

Assim, o presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento e validação de um método multirresíduo de extração para 112 agrotóxicos, com posterior análise por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS). O método proposto validado foi aplicado para análise de amostras de abobrinha do mercado local da cidade de Santa Maria/RS, bem como outros municípios gaúchos e um município catarinense.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método multirresíduo para determinação de agrotóxicos em abobrinha empregando a cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS).

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar as diferentes versões do preparo de amostra do método QuEChERS (original, acetato e citrato) a fim de encontrar as melhores condições para a extração dos analitos selecionados;
- Avaliar diferentes sorventes na etapa de limpeza por extração dispersiva em fase sólida visando minimizar a presença de coextrativos da matriz;
- Avaliar diferentes fatores de diluição do extrato visando as melhores condições de resposta do sinal analítico;
- Validar o método desenvolvido para a matriz de abobrinha seguindo os parâmetros estabelecidos pelo INMETRO (2020) e SANTE (2021);
- Aplicar o método desenvolvido na determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de abobrinha provenientes de diferentes cidades;

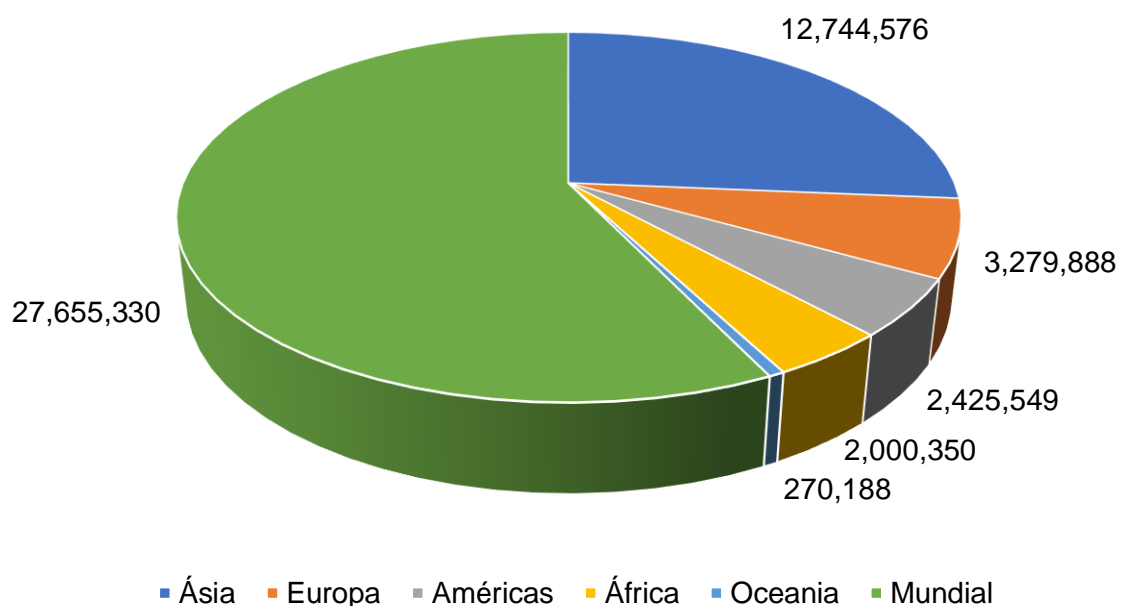
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ABOBRINHA

A abobrinha pertence à família das cucurbitáceas (Cucurbitaceae) e é conhecida no Brasil como abóbora de moita, abobrinha italiana, caserta ou abobrinha de tronco (FILGUEIRA, 2008). No Brasil, dois tipos principais de abobrinha são encontrados nos mercados: a abobrinha tipo menina, a qual possui o fruto com pescoço, e a tipo italiana, com o fruto alongado sem pescoço (SANTOS *et al.*, 2016). Além das abobrinhas, há diversas espécies de grande importância econômica na família das Cucurbitáceas, como a melancia, o melão, o pepino, o chuchu, a abóbora, a moranga entre outras (BISOGNIN, 2002).

De acordo com uma estimativa do último dado divulgado pela organização das nações unidas para a alimentação e a agricultura (FAO), a produção mundial de abóboras, morangas e abobrinhas juntas no ano de 2018 superou 27 milhões de toneladas em uma área de aproximadamente 2,04 milhões de ha. Na Figura 1 há a representação da divisão mundial de produção dessas culturas.

Figura 1 - Produção continental e mundial de abóboras, morangas e abobrinhas em 2018

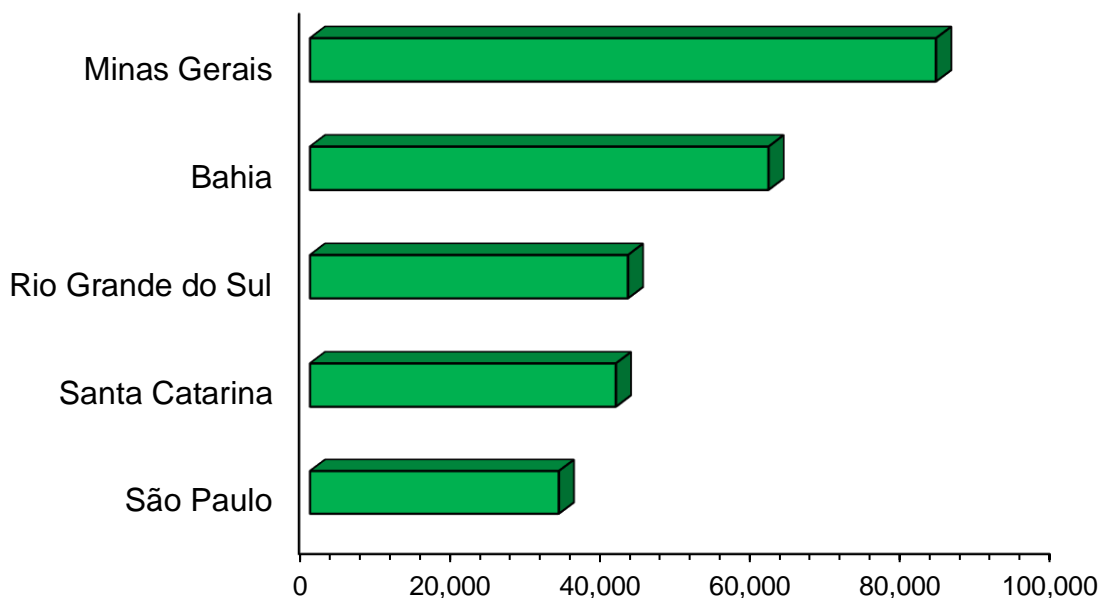


Fonte: Adaptado de FAO (2018).

Apesar de serem nativas da América, as abóboras em geral são produzidas e cultivadas ao redor do mundo. A Ásia é o continente com maior destaque, sendo responsável por 61,5% da produção mundial, tendo como a China como maior produtora desta cultura com quase 20% de toda a produção mundial (FAO, 2018).

No Brasil, há alguns dados que divergem quanto à produção dessa cultura. De acordo com o IBGE (2017), somadas as produções de abóboras e abobrinhas, a produção média anual pode ultrapassar 560 mil toneladas. Para a Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas (ABCSEM, 2014), a estimativa da produção brasileira é de 726 mil toneladas por ano somente de abóboras japonesas e 551 mil toneladas ao ano de abobrinhas. O IBGE divulgou, através do censo agropecuário de 2017, a estimativa da produção brasileira de abóboras, morangas e abobrinhas em torno de 417 mil toneladas. O estado de Minas Gerais lidera a produção dessas hortaliças, seguido de Bahia, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo, respectivamente, como mostra a Figura 2 (IBGE, 2017).

Figura 2 - Ranking brasileiro da produção em toneladas de abóboras, morangas e abobrinhas



Fonte: Adaptado de IBGE (2017).

### 2.1.2 Cultura da abobrinha italiana

A abobrinha italiana (*Cucurbita pepo* L.), também conhecida como abóbora de moita ou abobrinha de tronco integra a família das cucurbitáceas, possuindo importante destaque socioeconômico para as regiões Sudeste e Centro-Sul do Brasil, podendo ser cultivada em diferentes regiões pela sua adaptabilidade às condições edafoclimáticas (FILGUEIRA, 2008; BARBOSA; BIOTECH BRASIL; THEO, 2021).

Os estados que mais se destacam na produção de abobrinha italiana são São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná e Goiás, com uma produção de mais de 90% do total dessa hortaliça comercializada nos Ceasas, as centrais de abastecimentos e comercialização de produtos de hortifruticultura (AMARO *et al.*, 2021).

A abobrinha italiana tem ciclo de 50 a 80 dias e é um fruto colhido ainda verde. Quando o fruto é deixado na planta, ele se desenvolve até formar a abóbora madura. Essa espécie é originária do continente americano, do Peru até o sul dos Estados Unidos. É um fruto com poucas calorias e de fácil digestão, sendo rico em niacina, além de ser fonte de vitaminas do complexo B (SANTOS *et al.*, 2016). Os nutrientes presentes na abobrinha estão descritos na Tabela 1.

A abobrinha pode ser consumida de diferentes maneiras, seja refogada no óleo ou azeite, cozida em saladas frias, como suflê, frita à milanesa, recheada com outras hortaliças, queijo, ovos cozidos ou qualquer tipo de carne. Ela também pode ser usada como recheio de pratos assados, tais como bolo, pizza e tortas. Quando a abobrinha está bem nova e pequena, pode ser servida crua e ralada (SANTOS *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Composição centesimal da abobrinha italiana

<b>Componentes</b>	<b>Valor a cada 100 g</b>
Umidade (%)	93,9
Energia (kcal)	19
Proteína (g)	1,1
Lipídeos (g)	0,1
Carboidrato (g)	4,3
Fibra Alimentar (g)	1,4
Cinzas (g)	0,6
Vitamina C (g)	0,069

Fonte: LIMA *et al.*, (2011).



A abobrinha possui alto valor nutricional e versatilidade de consumo, corroborando para o crescente interesse em frutos de qualidade - e aumento da produtividade no cultivo dessa hortaliça. No entanto, entre as doenças que acometem essa cultura, um dos principais patógenos é o vírus do mosaico amarelo da abobrinha, transmitido por pulgões que ataca as folhas mais novas da hortaliça, produzindo manchas verde claro entre as nervuras e comprometendo o desenvolvimento da planta e na produção de frutos (LIMA, 2011).

A maneira mais eficiente de combater as doenças virais que afetam a abobrinha são as ações de caráter preventivo, uma vez que não existe controle curativo para as viroses. Uma opção empregada por muitos produtores a fim de combater o inseto vetor e reduzir a disseminação dos vírus é a realização do controle químico dos vetores que causam doenças na abobrinha e também a aplicação de inseticidas e produtos registrados para essa cultura (LIMA, 2011).

Assim, a aplicação correta e segura de produtos químicos registrados para a cultura da abobrinha contribui para evitar e prevenir o aparecimento de doenças. No entanto, o uso incorreto desses produtos pode resultar na presença de resíduos de agrotóxicos acima dos limites máximos de resíduos (LMR), definidos como a concentração mais alta de um agrotóxico que é legalmente tolerada dentro ou sobre um alimento quando esse composto é aplicado corretamente de acordo com as boas práticas agrícolas (FAO, 2022).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através do Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) fornece um banco de informações acerca dos agrotóxicos e afins registrados no MAPA. Paralelamente à consulta livre através do AGROFIT, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõe de um painel de monografias de agrotóxicos, no qual contém os agrotóxicos autorizados para cada matriz alimentícia no Brasil. Atualmente, são 42 monografias autorizadas pela ANVISA para uso em abobrinha.

Na Tabela 2, pode-se verificar os agrotóxicos autorizados para o uso nesta cultura de acordo com a ANVISA, assim como a classe e o LMR estabelecido para cada composto.

Tabela 2 - Agrotóxicos autorizados pela ANVISA para abobrinha e seus respectivos LMRs

<b>Nome comum</b>	<b>Classe</b>	<b>LMR (mg kg<sup>-1</sup>)</b>
Acetamiprido	Inseticida	0,20
Acibenzolar-S-metilico	Ativador de planta	0,50
Alfa-cipermetrina	Inseticida	0,01
Azoxistrobina	Fungicida	0,50
Buprofezina	Inseticida e Acaricida	0,30
Casugamicina	Fungicida e Bactericida	0,03
Ciantranilprole	Inseticida	0,07
Cimoxanil	Fungicida	0,10
Clorantranilprole	Inseticida	0,30
Clorotalonil	Fungicida	0,10
Deltametrina	Inseticida e Formicida	0,03
Difenoconazol	Fungicida	0,07
Dimetomorfe	Fungicida	0,10
Espinetoram	Inseticida	0,05
Espiromesifeno	Inseticida e Acaricida	0,60
Etofenproxi	Inseticida	0,10
Famoxadona	Fungicida	0,20
Fenamidona	Fungicida	0,20
Fenpiroximato	Acaricida	0,10
Fluopicolida	Fungicida	0,20
Flupiradifurone	Inseticida	0,60
Flutriafol	Fungicida	0,20
Fluxaproxade	Fungicida	0,10
Formetanato	Inseticida e Acaricida	0,10
Imidacloprido	Inseticida	0,05
Indoxacarbe	Inseticida, Cupinicida e Formicida	0,50
Lambda-cialotrina	Inseticida	0,01
Mandipropamida	Fungicida sistêmico	0,30
Metalaxil-M	Fungicida	0,10
Novalurom	Inseticida	0,20
Oxatiapirolina	Fungicida	0,06
Propamocarbe	Fungicida	2,00
Piraclostrobina	Fungicida	0,05
Pirimetanil	Fungicida	0,70
Piriproxifem	Inseticida	0,20
Tebuconazol	Fungicida	0,50
Tebufenozida	Inseticida	0,05
Teflubenzurom	Inseticida	0,01
Tiametoxam	Inseticida	0,02
Trifloxistrobina	Fungicida	0,20
Triflumurom	Inseticida	0,10
Zoxamida	Fungicida	0,10

Fonte: ANVISA, (2021).

## 2.2 RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

A utilização intensa de agrotóxicos nas mais diversas culturas está relacionada principalmente ao modelo de produção agrícola convencional brasileiro (MEIRA, 2015). A predominância de monoculturas dependentes de agrotóxicos para o combate às pragas e doenças, justifica o uso desses compostos para garantia de suprimento alimentar a nível nacional e internacional. O Brasil é um dos países que mais utiliza agrotóxicos no mundo (MEIRA, 2015).

No âmbito internacional, o *Codex Alimentarius* justifica a aplicação desses produtos químicos devido a crescente demanda por alimentos, o que obriga aos produtores a encontrar estratégias para manter a produção e colheita de maneira eficiente, levando ao uso de agrotóxicos (FAO, 2022).

Segundo a legislação brasileira vigente, por meio do Decreto nº 4.047, de 04 de janeiro de 2002, a qual regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, agrotóxicos e afins são:

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

Os resíduos de agrotóxicos deixados após o tratamento podem penetrar nos tecidos vegetais e aparecer na polpa de frutas e em hortaliças, além de possuir habilidade em se dissipar no solo, ar, águas superficiais e subterrâneas (CAMINO-SÁNCHEZ *et al.*, 2011).

Existem diferentes tipos de agrotóxicos para as mais diversas finalidades. A classificação dos agrotóxicos, portanto, pode ser feita em acaricidas, bactericidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, nematicidas, raticidas, vermífugos, entre outros, de acordo com as pragas que controlam (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009).

Há também a classificação dos agrotóxicos conforme a toxicidade que eles apresentam. No Brasil, essa classificação é de competência da ANVISA, que no ano de 2019 padronizou essa classificação segundo os parâmetros internacionais do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS), passando a ter regras harmonizadas com países da Ásia e União

Europeia (ANVISA, 2019). A Tabela 3 demonstra esta classificação toxicológica dos agrotóxicos.

Tabela 3 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos

<b>Categoria</b>	<b>Classificação</b>	<b>Faixa do rótulo</b>
1	Produto Extremamente Tóxico	Vermelha
2	Produto Altamente Tóxico	Vermelha
3	Produto Moderadamente Tóxico	Amarela
4	Produto Pouco Tóxico	Azul
5	Produto Improvável de Causar Dano Agudo	Azul
Não classificado	Produto Não Classificado	Verde

Fonte: ANVISA (2019).

Os agrotóxicos podem ocasionar intoxicações agudas e/ou crônicas nos seres humanos, além da contaminação ambiental. Logo, a importância de se conhecer os efeitos toxicológicos dos agrotóxicos no ambiente e no ser humano é crucial, mas ainda pouco desenvolvido e discutido (MEIRA, 2015).

Nesse sentido, o uso indevido de agrotóxicos em frutas e hortaliças é prejudicial à saúde humana, pois apesar do estabelecimento de LMRs impostos pela legislação de muitos países, os últimos relatórios de agências que monitoram esses compostos em alimentos, por exemplo, a Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA) e a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA), indicaram que os níveis encontrados em frutas e hortaliças estão consideravelmente altos (AL-NASIR *et al.*, 2020).

Apesar de Stachniuk e Fornal (2016) destacarem que frutas e vegetais contêm níveis mais altos de resíduos de agrotóxicos quando comparado com outros grupos de alimentos, a constatação de resíduos de agrotóxicos em alimentos pelas agências reguladoras é um dado importante e reforça a necessidade da criação e manutenção de programas de monitoramento desses resíduos.

## 2.3 MONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos é realizado no Brasil e no mundo pelas agências reguladoras e fiscalizadoras de cada país que através de parâmetros pré-estabelecidos estipulam os LMRs para cada alimento.

Na Europa, os LMRs são monitorados de forma contínua pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) nos países membros da União Europeia e são alterados conforme novas informações e dados são inseridos em seu sistema (EFSA, 2022). Nos Estados Unidos, a agência reguladora responsável pelo monitoramento de resíduos de agrotóxicos é a Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA, do inglês *Food and Drug Administration*).

No Brasil, o MAPA e o Ministério da Saúde, conforme suas respectivas competências, monitoraram os resíduos de agrotóxicos e afins em produtos de origem vegetal e animal, além de estabelecer o LMR e o intervalo de segurança de agrotóxicos e afins.

Há atualmente no Brasil dois programas de monitoramento de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal: o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) e o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), coordenados pela ANVISA e MAPA, respectivamente.

O PARA foi criado em 2001 com o objetivo de avaliar, continuamente, os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos em vegetais que chegam a mesa do consumidor (ANVISA, 2020).

Os resultados do último relatório divulgado pelo PARA referente ao Ciclo Plurianual 2017/2020, em que foram analisados 14 alimentos de origem vegetal, indicaram que no 1º Ciclo (compreendendo agosto de 2017 a junho de 2018), 122 agrotóxicos foram detectados dos 270 pesquisados. Das 4.616 amostras analisadas, 49% não foram detectados resíduos de agrotóxicos e 28% do total estavam dentro do limite permitido. As amostras com inconformidades somaram 23% do total de amostras analisadas. As frutas laranja, goiaba e uva foram as que obtiveram maiores índices de potencial risco agudo, respectivamente (ANVISA, 2020). O Programa de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos da FDA de 2017, constatou que frutas e vegetais têm uma porcentagem maior de resíduos de agrotóxicos detectáveis e uma maior porcentagem de amostras com níveis de resíduos superiores ao LMR do que qualquer outro alimento (AL-NASIR *et al.*, 2020).

Embora amostras de abobrinha não tenham sido analisadas no último relatório do PARA, no relatório de 2012 que foi divulgado em 2014, a abobrinha foi o alimento líder de resíduos de agrotóxicos. Entre as 229 amostras analisadas na época, 48% foram consideradas insatisfatórias, sendo quase metade desse valor pelo fato de possuir ingredientes ativos não autorizados para essa cultura, como o carbofurano (ANVISA, 2020).

É evidente que os dados obtidos através dos relatórios dos programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos contribuem para tomadas de decisões. Al-Nasir e colaboradores (2020) apontam que os programas de monitoramento cumprem um importante papel de proteger a saúde pública e auxiliam na tomada de decisões baseadas em evidências.

## 2.4 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

### 2.4.1 Técnicas cromatográficas para determinação de resíduos de agrotóxicos

As técnicas cromatográficas podem ser conceituadas como métodos físico-químicos de separação. Entre as duas principais técnicas de separação analítica estão a cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*) e a cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*). A cromatografia gasosa é uma técnica analítica de separação de compostos orgânicos com excelente resolução. É aplicada para a análise de compostos voláteis ou volatilizáveis e que sejam termicamente estáveis. O modo de separação é baseado na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária e uma fase móvel composta por um gás carreador (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Após a separação cromatográfica na coluna, os analitos alvo chegam ao sistema de detecção, resultando em um sinal analítico. Os principais sistemas de detecção na cromatografia gasosa são: detector por ionização por chama (FID, do inglês *flame ionization detector*), detector por captura de elétrons (ECD, do inglês *electron capture detector*), detector por fotometria de chamas (FPD, *flame photometric detector*) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Esta técnica é empregada para a determinação de agrotóxicos em frutas e vegetais como manga, tomate, pepino, abobrinha, maçã entre outros (MENEZES FILHO; DOS SANTOS; DE PAULA PEREIRA, 2010; CÁMINO-SANCHEZ *et al.*, 2011).

A cromatografia líquida por sua vez, utiliza colunas preenchidas com materiais que promovem separações e análises quantitativas de uma ampla variedade de compostos em uma determinada faixa de tempo, em conjunto com uma fase móvel

líquida sob elevadas pressões (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Os principais sistemas de detecção para a cromatografia líquida são: detector ultravioleta e visível (UV-Vis, do inglês *ultraviolet-visible*), detectores por arranjo de diodos (DAD, do inglês *diode-array detection*) e por fluorescência (FD, do inglês *fluorescence detection*). Estes detectores apresentam especificidade limitada, apresentando menos aplicações quando comparados à espectrometria de massas (MS).

#### **2.4.2 Cromatografia acoplada à espectrometria de massas para determinação de resíduos de agrotóxicos**

A escolha do sistema de detecção depende dos objetivos que se deseja alcançar na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos. A espectrometria de massas pode ser acoplada em ambas as técnicas cromatográficas. Esse acoplamento combina a alta seletividade e eficiência de separação do cromatógrafo com a obtenção de informações estruturais e de massa molar do espectrômetro de massas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Segundo o documento para validação de métodos analíticos para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos da SANTE (2021), a espectrometria de massas acoplada a um sistema de separação cromatográfica é “uma ferramenta muito poderosa para identificação de um analito no extrato da amostra. Ela fornece simultaneamente tempo de retenção, razão massa/carga ( $m/z$ ) e dados de abundância relativa (intensidade)”.

De acordo com Lanças (2009), a fonte de ionização que apresentou uma maior eficiência de acoplamento com a cromatografia líquida foi a fonte de ionização por eletronebulização (ESI).

O autor explica que:

este modo consiste na formação de íons a pressão atmosférica, onde uma amostra dissolvida em um solvente é pressurizada em um tubo capilar, sob uma voltagem entre 3.000 e 5.000 volts. Desta forma o eluente da coluna se transforma em um aerossol, e os analitos são dessolvatados, e seus íons são induzidos ao espectrômetro de massas (LANÇAS, 2009, p.40).

A configuração do espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (QqQ) constitui-se da presença de três quadrupolos em série. O primeiro quadrupolo seleciona os íons a serem monitorados e promove a fragmentação dos mesmos no segundo quadrupolo através de uma dissociação induzida por colisão com um gás inerte (CID, do inglês *collision-induced dissociation*), sendo também utilizado para o direcionamento destes íons, também chamados de íons filhos ou precursores ao

terceiro quadrupolo. O segundo quadrupolo não possui por finalidade a separação de íons de razão  $m/z$  específica, mas atua como uma cela de colisão. O terceiro quadrupolo é configurado para selecionar um íon fragmentado específico de razão  $m/z$  única obtendo-se um sinal analítico (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

No aspecto das técnicas de varredura para obtenção do espectro de massas em MS/MS, algumas utilizadas são: Varredura completa (do inglês *full scan*), Monitoramento do Íon Selecionado (SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring*), Varredura do Íon Produto, Varredura do Íon Precursor e Monitoramento Seletivo de Reações (SRM, do inglês *Select Reaction Monitoring*). A varredura full scan, SIM e SRM destacam-se como as três principais técnicas de monitoramento de íons (STACHNIUK; FORNAL, 2016).

No modo full scan, a utilização se dá principalmente quando não se conhece os componentes presentes na amostra. O cromatograma obtido do monitoramento total de íons (TIC, do inglês *total ion chromatogram*) oferece todo o espectro de massa do intervalo de  $m/z$  pré-definido. No SIM, o monitoramento é realizado quando se tem um quadrupolo, mas também pode ser aplicado no sistema QqQ. O cromatograma permite o registro de um ou mais íons selecionados. Por fim, o SRM é o modo de monitoramento que permite a confirmação da presença de íons fragmentados formados a partir de um íon precursor específico (STACHNIUK; FORNAL, 2016).

De acordo com Stachniuk e Fornal (2016), a sensibilidade e seletividade dos métodos de gravação de íons aumenta na seguinte ordem: TIC<SIM<SRM. Ademais, o alto nível de seletividade do SRM torna-o um dos métodos mais confiáveis para confirmar a presença de um composto específico na amostra e tem sido a técnica mais utilizada frequentemente no monitoramento de íons na análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. A análise direcionada de agrotóxicos termicamente lábeis é rotineiramente realizada usando cromatografia líquida de ultra alta performance acoplado à espectrometria de massas em série operando em reações selecionadas ou múltiplos modo de monitoramento (WONG *et al.*, 2018).

### **2.4.3 Preparo de amostra para análise multirresíduo de agrotóxicos**

A determinação de resíduos de agrotóxicos tem se tornado um grande desafio devido a fatores como o grande número de agrotóxicos e seus metabólitos existentes, além dos baixos níveis de concentração em diferentes matrizes e *commodities* (CÁMINO-SANCHEZ *et al.*, 2011). Essas limitações encontradas na determinação de



resíduos de agrotóxicos foram minimizadas após o desenvolvimento dos métodos multirresíduo.

De acordo com Prestes e colaboradores (2011), a capacidade em analisar um grande número de compostos, com índices elevados de recuperação dos analitos, remoção dos possíveis interferentes da amostra, além da boa precisão e robustez fazem dos métodos multirresíduo uma vantagem quando comparados com outros métodos.

As principais etapas envolvidas no preparo de amostra na determinação de compostos orgânicos são: homogeneização das amostras, isolamento dos analitos de interesse, remoção dos interferentes e adequação da concentração a um nível adequado para sua determinação (QUEIROZ, 2015).

Os métodos multirresíduo pioneiros para extração de agrotóxicos foram desenvolvidos entre os anos de 1960 e 1980, sendo os principais utilizados na época: o método de Mills, o método de Storherr, o método de Luke e a sua miniaturização (método Mini-Luke). Apesar desses métodos analisarem uma maior quantidade de compostos simultaneamente, todos utilizavam um grande volume de solvente e amostra, possuíam um alto custo de execução e várias etapas (QUEIROZ, 2015).

Historicamente, o desenvolvimento de novos métodos de preparo de amostra vem sendo desenvolvidos com a finalidade de reduzir a morosidade de diversas etapas, emprego de grandes volumes, alto custo, entre outros (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

O início desse desenvolvimento data a década de 1990, quando ocorreu um grande despontar de métodos alternativos de extração baseados na redução do volume de solvente utilizado na etapa de extração. Os que mais se destacaram e são empregados atualmente em algumas análises de rotina foram: a extração em fase sólida (SPE do inglês *solid phase extraction*), a qual também é empregada com frequência na etapa de limpeza do extrato para amostras de alimentos; a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *matrix solid phase dispersion*); microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase microextraction*) e extração com membrana assistida por solvente (MASE, do inglês *membrane-assisted solvent extraction*). Esses métodos de extração foram desenvolvidos com o objetivo de simplificação de etapas (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

#### 2.4.3.1 Método QuEChERS

Desenvolvido no ano de 2003 por Anastassiades, Lehotay, Stajnbaher, e Schenck, o método QuEChERS (do acrônimo em inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) foi introduzido com o objetivo de superar as limitações práticas dos métodos multirresíduo até então existentes para extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

O método QuEChERS revisa as condições comumente utilizadas na análise multirresíduo de agrotóxicos e propõe um procedimento de preparo de amostra que envolve uma etapa de extração seguida por uma partição líquido-líquido e uma etapa de limpeza usando extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid phase extraction*) (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011; ROTTA *et al.*, 2019).

Na etapa de extração, a utilização de acetonitrila como solução extratora foi a mais eficiente pela capacidade em extrair uma ampla gama de agrotóxicos de vários alimentos (por exemplo, frutas, vegetais, ração animal e grãos) e matrizes ambientais (tais como, solo e sedimento), produzindo taxas de recuperação satisfatórias entre 80–110% (GRIMALT; DEHOUCK, 2016; KIM *et al.*, 2019).

Segundo Lehotay (2011), devido às suas várias vantagens sobre acetona e/ou acetato de etila, a acetonitrila é o solvente mais comumente empregado no método QuEChERS. O autor enumera algumas dessas vantagens, entre elas: a miscibilidade em água, boa separação da água quando sais são adicionados como NaCl e MgSO<sub>4</sub>, não coextrai grandes quantidades de lipídios e proteínas, aplicável para análises de LC e GC e é compatível para d-SPE, levando a extratos finais mais limpos (LEHOTAY, 2011).

Após a ação da solução extratora na amostra, previamente processada e cominuída, adicionam-se sulfato de magnésio anidro (MgSO<sub>4</sub>) e cloreto de sódio (NaCl). Esses sais são responsáveis por promover o “efeito *salting-out*”, que consiste em diminuir a solubilidade dos compostos polares na fase aquosa e a quantidade de água na fase orgânica, melhorando, assim, a recuperação dos analitos. A reação de hidratação do sulfato de magnésio anidro é exotérmica, aumentando a temperatura do meio em aproximadamente 40-45 °C, corroborando na eficiência da extração de agrotóxicos apolares (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011; KIM *et al.*, 2019).

Na etapa de limpeza, 1 mL do sobrenadante do extrato resultante das etapas anteriores é transferido para um outro tubo contendo 150 mg de MgSO<sub>4</sub> e 25 mg de

amina primária-secundária (PSA, do inglês *primary secondary amine*). Esta retém as interferências da matriz, além de possuir uma estrutura bidentada com elevado efeito quelante capaz de reter ácidos graxos e compostos polares, enquanto o  $MgSO_4$  remove a água presente no extrato e auxilia na partição da matriz. Esta etapa é essencial para garantir a robustez e confiabilidade dos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Na Figura 3 é apresentado um diagrama das etapas do método QuEChERS.

Figura 3 – Representação das etapas do método QuEChERS



Fonte: Adaptado de Kim *et al.*, (2019).

Os sorventes no método QuEChERS são utilizados para possibilitar a remoção de coextrativos no extrato como pigmentos, lipídios, ácidos, entre outros, que atuam como interferentes nas análises multiclasse de resíduos de agrotóxicos devido à alta complexidade da matriz (GARCÍA-REYES *et al.*, 2007; OSHITA; JARDIM, 2014; BELARBI *et al.*, 2021).

Segundo Martins e colaboradores (2017), outros sorventes como octadecilsiloxano (C18) e carbono grafitizado (GCB), têm sido usados para melhorar o d-SPE na etapa de limpeza. O C18 é eficaz para a remoção de lipídios e o GCB para pigmentos coextraídos, nomeados carotenoides e clorofila, típicos de matrizes altamente pigmentadas (por exemplo, vegetais de folhas verdes). O uso de GCB deve

ser cauteloso, pois pode remover agrotóxicos de estruturas planares em sua estrutura (PERESTRELO *et al.*, 2019).

Além desses sorventes, outros tipos de materiais estão continuamente sendo utilizados para ampliar a gama de aplicações do método QuEChERS, exemplos são EMR-lipid<sup>®</sup>, Z-sep<sup>+</sup> e quitosana. É importante a escolha de sorventes que permitem uma limpeza eficaz do extrato, além de promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos no sistema cromatográfico (PERESTRELO *et al.*, 2019).

A estrutura do EMR-Lipid<sup>®</sup> é desconhecida devido ao período de patente do fabricante. Mas tem-se o conhecimento de que ele não atua como um adsorvente sólido como na d-SPE, mas dissolve a saturação presente no extrato. Este mecanismo envolve tanto a exclusão de moléculas por seu tamanho como também por interações hidrofóbicas, onde hidrocarbonetos de cadeia longa associados aos lipídios se encaixam na estrutura EMR-Lipid<sup>®</sup>, levando a formação do complexo lipid-EMR-Lipid, o qual é precipitado na solução ou permanece na fase aquosa no final da etapa *salting-out* (HAN *et al.*, 2016).

O Z-Sep e Z-Sep<sup>+</sup>, são nanopartículas de zircônio estabilizadas com óxido de ítrio (ZrO<sub>2</sub>/ Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) e C18, em proporções 2:5, que apresentam em sua estrutura alta área superficial, podendo obter excelentes recuperações de agrotóxicos em matrizes que apresentam grande quantidade de óleos em sua composição. A sua aplicação tem apresentado resultados superiores a sorventes já utilizados na área como PSA e C18 (RAJSKI *et al.*, 2013; UCLÉS *et al.*, 2015).

Em métodos mais antigos, o Florisil<sup>®</sup> era empregado sob forma de cartuchos para percolação de extratos, mas atualmente tem sido aplicado em etapas de d-SPE para limpeza de extratos de matrizes oleaginosas. É composto de silicato de magnésio, sendo a sílica um sorvente amplamente aplicado em cromatografia com aplicações conhecidas na separação de componentes hidrofóbicos como ácidos graxos e aldeídos (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

O sorvente quitosana ( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) D-glucosamine) é um biopolímero obtido através do processo de desacetilação da quitina ( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) N-acetyl-D-glucosamine). A quitina, naturalmente encontrada nos exoesqueletos de insetos e crustáceos, é encontrada de forma abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose. Este sorvente tem sido aplicado em etapas de limpeza, apresentado resultados satisfatórios com baixo custo (WESKA *et al.*, 2007; ARIAS *et al.*, 2014).

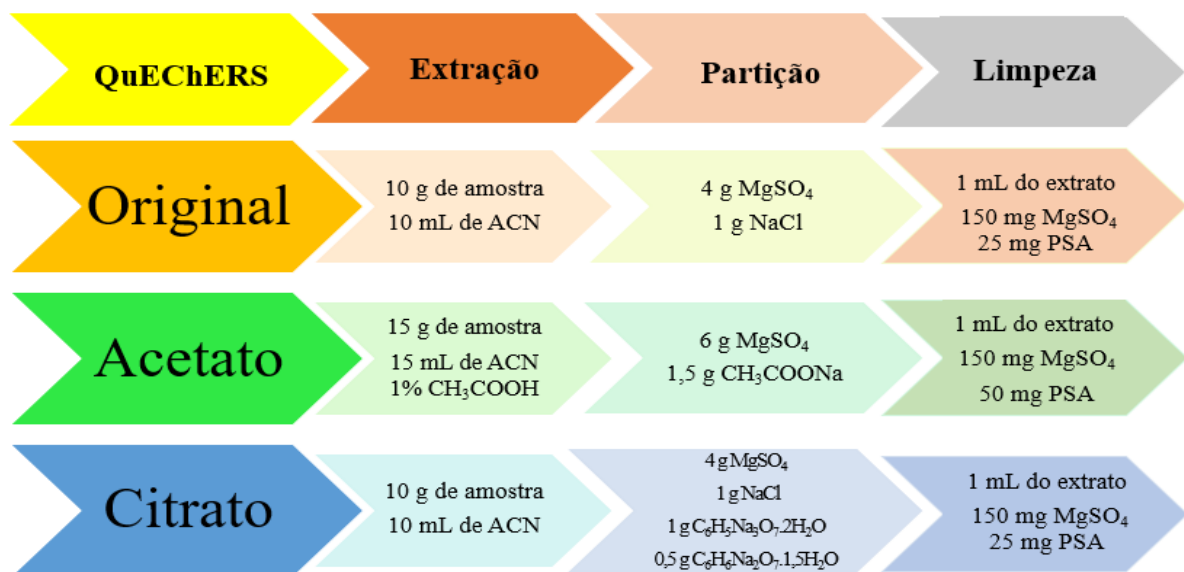
### 2.4.3.1.1 Modificações do método QuEChERS

Ao longo dos anos, o método QuEChERS sofreu modificações, incluindo a adição de sistemas tamponados com sais acetato ou citrato para melhorar a recuperação e estabilidade de alguns compostos (LEHOTAY; MAÒTOVSKÁ; LIGHTFIELD, 2005; ANASTASSIADES *et al.*, 2007).

Lehotay e colaboradores (2005), encontraram alguns agrotóxicos dependentes do pH, estes apresentaram valores de recuperação inferiores ao requerido quando empregou-se o método original. Com isso, um procedimento de tamponamento foi proposto e aplicado, melhorando os resultados para a pequena porcentagem de agrotóxicos afetados pelo pH. No método QuEChERS acetato desenvolvido por Lehotay e colaboradores, emprega-se portanto, um tampão de acetato com a adição de 1,5 g de acetato de sódio.

De maneira independente, Anastassiades e colaboradores (2007), optaram pela utilização de método de tamponamento de citrato. No método QuEChERS citrato utiliza-se um tampão citrato com a adição de 1 g de citrato trissódico di-hidratado e 0,5 g de hidrogenocitrato de sódio sesqui-hidratado. Com os tampões, ambos os métodos produzem um solvente de extração com um pH em torno de 4 e 5, que é adequado para a extração de compostos que dependem do pH (por exemplo, pimetozina, diclofluanida, clorotalonil e folpet). A Figura 4 representa as diferentes versões do método QuEChERS.

Figura 4 – Representação comparativa do método QuEChERS original, acetato e citrato



Fonte: o autor, (2022).

Apesar do método QuEChERS ter sido inicialmente desenvolvido para a determinação de agrotóxicos em alimentos, outros compostos, como sulfonamidas e seus metabólitos, além de micotoxinas e reguladores de crescimento de plantas já foram caracterizados usando o método QuEChERS, demonstrando o potencial desse método e suas modificações nas análises de rotina de laboratório (JUAN *et al.*, 2017; JIA; SHI; CHU, 2018; MUHAMMAD *et al.*, 2018).

## 2.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS E TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS NA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ABOBRINHA

Na literatura é possível encontrar algumas possibilidades quanto ao preparo de amostras e instrumentos que podem ser utilizados para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de abobrinha (Tabela 4). É possível observar que para a determinação de resíduos de agrotóxicos em abobrinha e matrizes semelhantes há diferentes tipos de preparo de amostras empregado, no entanto, o método QuEChERS em suas diferentes versões é o mais utilizado.

Tabela 4 – Métodos de determinação de agrotóxicos em abobrinha e matrizes semelhantes

(continua)

Matriz	Método de extração	Etapa de Limpeza	Agrotóxicos	Técnica	Referência
Abobrinha, tomate e melancia	15 g de amostra + 15 mL de ACN 1% HAc. → 6 g MgSO <sub>4</sub> anidro + 1,5 g CH <sub>3</sub> COONa anidro → agitação por 1 min + centrifugação a 3700 rpm por 2 min.	5 mL de extrato + 250 mg de PSA + 750 mg de MgSO <sub>4</sub> → agitação 20 s + centrifugação a 3700 rpm por 2 min → 1 mL evaporado até a secura com corrente de N <sub>2</sub> → reconstituir com 1 mL de H <sub>2</sub> O:MeOH (9:1).	Forclorfenurã o - regulador do crescimento das plantas	LC/TOF-MS	Valverde et al., 2010
Abobrinha, melancia, melão, berinjela tomate entre outros	15 g de amostra + 10 mL ACN → agitação por 1 min → 6 g MgSO <sub>4</sub> anidro + 1,5 g de NaCl anidro + 1,5 g Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> .2H <sub>2</sub> O + 0,75 g C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .1,5H <sub>2</sub> O → agitação por 1 min e centrifugação por 5 min.	5 mL de extrato + 125 mg de PSA e 750 mg de MgSO <sub>4</sub> → Agitação manual por 30 s e centrifugação por 5 min.	121 agrotóxicos	GC-MS/MS	Camino-Sánchez et al., 2011
Abobrinha, tomate, pimentão, laranja e alho poró	10g de amostra + 10 mL ACN → Agitação em extrator axial automático por 8 min → 4 g MgSO <sub>4</sub> + 1 g NaCl + 1 g Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> .2H <sub>2</sub> O + 0,5 g de C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .1,5H <sub>2</sub> O → Agitação no extrator axial automático por 8 min seguido de centrifugação a 3700 rpm por 5 min.	5 mL de extrato + 750 mg MgSO <sub>4</sub> + 125 mg PSA + 125 mg C18 → Agitação por 30 s → centrifugação a 3700 rpm por 5 min. Acidificação com 10 µL ácido fórmico 5% por mL de extrato.	97 agrotóxicos	LC-QTOF-MS	Malato et al., 2011
Melão	10 g de amostra + 10 mL ACN → Agitação por 1 min → 4 g MgSO <sub>4</sub> + 1 g de NaCl + 1 g Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> .2H <sub>2</sub> O + 0,5 g C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .1,5H <sub>2</sub> O → Agitação por 1 min e centrifugação por 10 min a 3600 rpm	4 mL de extrato + 600 mg MgSO <sub>4</sub> + 100 mg PSA → Agitação + centrifugação a 3600 rpm por 10 min → 10 µL HCOOH 5% → secura → extrato reconstituído em 3 mL de ciclohexano:acetato de etila (1:1)	35 agrotóxicos	GC-SQ/MS	Sousa et al., 2013

(continuação)

Matriz	Método de extração	Etapa de Limpeza	Agrotóxicos	Técnica	Referência
Abobrinha	50 g de amostra + 150 mL de acetona homogeneizadas por 2 min → Filtração com algodão limpo. 100 mL de extrato + 100 e 50 mL de cloreto de metileno → agitação → 10 mL solução NaCl. O orgânico combinado as fases foram secas por filtração através de sulfato de sódio anidro (ativado durante a noite a 105°C). O extrato foi evaporado apenas até a secura usando um evaporador rotativo operando a 40 °C.	Coluna em florisil usando cloreto de metileno: n-hexano: ACN (50:48,5:1,5) como solvente de eluição. Diluição em 10 mL do solvente de eluição → filtrado através de uma coluna cromatográfica (2,5 cm i.d.) → Lavagem com 5 mL do solvente de eluição → evaporação sob vácuo até a secura → solubilização em 10 mL de etil acetato → GC	Malation e lambda-cialotrina	GC-FPD e GC-ECD	Lofty; Abd el-Aleem; Monir, 2013
Tomate	15 g de amostra + 15 mL ACN 1% ácido acético → 6 g de MgSO <sub>4</sub> + 1,5 g de acetato de sódio → agitação por 1 min e centrifugação a 5000 rpm por 1 min.	4 ml de extrato + 0,6 g de MgSO <sub>4</sub> + 0,2 g de PSA → Agitação 1 min e centrifugação a 5000 rpm por 1 min	109 agrotóxicos	LC-MS/MS	Golge; Kabak, 2015
Abobrinha	10 g da amostra + 10 mL de n-hexano → Centrifugação a 4500 rpm por 5 min	Concentração do sobrenadante a 1 mL sob uma corrente suave de N <sub>2</sub> . → adição NaSO <sub>4</sub> para eliminar resíduos de água e a solução final foi injetada no GC-MS.	Óleos essenciais (fungicidas) α-pineno 1,8-cineol terpinen-4-ol eugenol	GC-MS	Milano; Donnarumma, 2017
Abobrinha	10 g de amostra + 10 mL ACN → agitação 1 min → partição com sais de QuEChERS citrato → agitação por 1 min e 5 min de centrifugação a 3000 rpm; 1 mL do extrato transferido para um vial e acidificado com 10 µL ACN 5% Ác.Fórmico → Seguido para injeção	-	Piriproxifeno Deltametrina Imidacloprido Trifloxistrobin a Dietofencarbe Miclobutanil	LC-MS e GC-MS	Oliva et al., 2017
Abobrinha, tomate, pimentão, berinjela e outras matrizes	15 g de amostra + 15 mL ACN → agitação em vórtex por 1 min → 4 g de MgSO <sub>4</sub> + 1 g de NaCl → Agitação e centrifugação	Sobrenadante + 50 mg de PSA + 50 mg de GCB + 150 mg de MgSO <sub>4</sub> → Agitação e centrifugação → reconstituição para 3 mL com ACN para LC-MS/MS e 1 mL com tolueno para GC-MS	34 agrotóxicos	GC-MS e LC-MS/MS	Jallow et al., 2017



(continuação)

Matriz	Método de extração	Etapa de Limpeza	Agrotóxicos	Técnica	Referência
Abobrinha, tomate, pimentão, melão, melancia, entre outros	10 g de amostra + 10 mL ACN → agitação por 1 min → 4 g de MgSO <sub>4</sub> + 1 g de NaCl + 1 g Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O + 0,5 g C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ·1,5H <sub>2</sub> O → agitação vigorosa por 1 min → centrifugação a 5°C por 5 min a 4000 rpm	1 mL de extrato + 150 mg MgSO <sub>4</sub> + 25 mg PSA + 7,5 mg GCB → vórtex por 2 min → centrifugação a 5°C por 2 min a 4000 rpm → 0,5 mL diluído com 0,5 mL de ACN com 10 µL de HCOOH 5% ACN	113 agrotóxicos	LC-MS/MS	Algharibeh; Affararjeh, 2018
Alface laranja, pimentão, tomate e cenoura	15 g de amostra + 15 mL ACN 1% ácido acético → 6 g MgSO <sub>4</sub> + 1,5 g CH <sub>3</sub> COONa anidro → Agitação manual por 1 min e centrifugação por 10 min a 3000 g.	1 mL de extrato + 150 mg de MgSO <sub>4</sub> + 50 mg de PSA + 50 mg de GCB → agitação por 1 min e centrifugação por 5 min a 3000g → ressuspensão em n-hexano sob uma corrente de N <sub>2</sub>	35 agrotóxicos	GC-MS	Mac Loughlin et al., 2018
Abobrinha, pepino, berinjela, tomate e alguns citros	15 g de amostra + 15 ml ACN 1% ácido acético → Agitação em vórtex por 2-3 min → 6 g MgSO <sub>4</sub> + 1,5 g de NaCl → vortex por 3 min → centrifugação a 3000 rpm por 5 min à temperatura ambiente	1 mL de extrato + 150 mg MgSO <sub>4</sub> + 50 mg PSA + 7,5 mg GCB → Agitação por 20 s e centrifugação a 3000 rpm por 5 min → Evaporação até secura com fluxo de N <sub>2</sub> a 40°C. Reconstituição em 500 µl ACN + 500 µL H <sub>2</sub> O	304 agrotóxicos	LC-MS/MS	Al-Nasir et al., 2020
Abobrinha, batata, pepino, cebola, alho, tomate, cenoura, berinjela, alface, pimentão entre outros	2 g de amostra + 6 mL ACN A amostra foi processada por extração assistida por ultrassom (UAE) em 200 W por 10 min → Centrifugação a 4 °C a 4500 rpm por 10 min. Filtração do sobrenadante e evaporação até quase a secura (~200 mL) sob um fluxo suave de N <sub>2</sub> . Reconstituição do extrato do UAE em 10 mL H <sub>2</sub> O e ajustado para pH 4 com HCl diluído ou NaOH conforme necessário.	Extratos redissolvidos → SPE contínuo de coluna (80 mg de LiChrolut EN, localizado na alça de IV1). Extratos orgânicos evaporados para ~ 25 mL sob um fluxo suave de N <sub>2</sub> → 70 mL de uma mistura BSTFA þ1% TMCS foi adicionada manualmente → forno de microondas doméstico → compostos alvo derivatizados a 350 W durante 3 min	24 desreguladores endócrinos	GC-MS	Hejji et al., 2021

(conclusão)					
Matriz	Método de extração	Etapa de Limpeza	Agrotóxicos	Técnica	Referência
Tomate, pepino, pimentão vermelho doce e alface americana	3 g de amostra triturada com nitrogênio líquido + 3 mL ACN → Agitação por 30 s → 1,3 g MgSO <sub>4</sub> + 0,33 g NaCl + 0,16 g C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ·1,5H <sub>2</sub> O + 0,33 g Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O → Agitação por 60 s e centrifugação por 5 min a 2400 rcf	1,5 mL de extrato + 50 mg PSA + 300 mg MgSO <sub>4</sub> . 50 mg PSA + 15 mg de ENVI-Carb + 300 mg de MgSO <sub>4</sub> → Agitação por 30 s e centrifugação por 5 min a 2400 rcf. 1ml do extrato reduzido em 100 µL sob um suave fluxo de N <sub>2</sub>	88 agrotóxicos	GC-MS	Ferracane et al., 2021
Alface, couve chinesa, repolho, couve-flor, pepino, tomate, cenoura entre outros	10 g de amostra + 15 mL ACN 1% ácido acético → vórtex por 1,5 min → 6 g MgSO <sub>4</sub> + 1,5 g CH <sub>3</sub> COONa + 1 g NaCl → agitação e centrifugação por 5 min a 6000 rpm.	4 mL de extrato + 600 mg de MgSO <sub>4</sub> + 200 mg de PSA → Agitação por 1 min e centrifugação a 6.000 rpm por 5 min → 3 mg de GCB adicionados ao extrato obtido da limpeza → agitação por 1,5 min → Centrifugação a 6.000 rpm por 2 min a - 2°C → Acidificação, evaporação e ressuspensão do extrato final em tolueno → filtração	250 agrotóxicos	GC-MS	Kardani; Jelyani; Dahanzadeh, 2022
Abobrinha, maçã, tomate, pepino, abóbora, pimentão entre outros	10g de amostra + 10 mL ACN → Agitação por 1 min → 4 g de MgSO <sub>4</sub> + 1 g de NaCl + 1 g Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O + 0,5 g C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ·1,5H <sub>2</sub> O → agitação por 1 min e centrifugação por 5 min a 4400 rpm	1 mL do extrato + 25 mg de PSA + 150 mg de MgSO <sub>4</sub> → Agitação por 30 s e centrifugação por 5 min a 4400 rpm	31 agrotóxicos	GC-MS/MS	Tankiewicz; Berg, 2022

Fonte: o autor, (2022).

## 2.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

No Brasil, a ANVISA, o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e o MAPA são os órgãos que dispõe de guias, documentos e manuais orientadores acerca da validação de métodos analíticos. A ANVISA no Art. 4º da Resolução da Diretoria Colegiada RDC Nº 166, de 24 de Julho de 2017 define que “a validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos”.

O INMETRO, através do documento de caráter orientativo DOQ-CGCRE-008 define a validação como “a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos” (ABNT, 2017). O MAPA, por sua vez, disponibiliza o Manual de Garantia da Qualidade Analítica, onde estão definidos parâmetros e critérios de aceitação que podem ser aplicados para a determinação de diferentes categorias de analitos em alimentos como medicamentos veterinários, agrotóxicos, contaminantes inorgânicos e micotoxinas. Alguns órgãos internacionais, como *Codex Alimentarius*, Comissão Europeia (EC, do inglês *European Commission*) e FDA também estabelecem orientações e guias para a validação de métodos analíticos. Um desses principais guias no âmbito internacional é o documento nº 1132/2021 da SANTE (Saúde e Proteção do Consumidor, do francês *Santé et Protection des Consommateurs*), que estabelece o controle de qualidade e validação de métodos analíticos para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (SANTE, 2021).

O objetivo que se deseja alcançar em uma validação de um método analítico é a garantia de que todas as medições futuras em análises de rotina sejam próximas o suficiente do valor verdadeiro desconhecido para o conteúdo do analito na amostra. Dessa maneira, os objetivos da validação não são unicamente para obter estimativas de veracidade e precisão, mas também são critérios de avaliação dos riscos que podem ser expressos pela incerteza de medição associada ao resultado (RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2012).

Os parâmetros para validação do método que definidos em diferentes grupos de trabalho de comitês nacionais e internacionais e são amplamente descritos na literatura, estão listados na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros de avaliação na validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos

Parâmetro	Definição	Aplicação
Seletividade	Estimar o grau de interferência na quantificação do analito na presença de outros analitos	Comparação dos extratos branco e branco fortificado
Faixa linear de trabalho	Intervalo de concentrações em que x e y se correlacionam linearmente com precisão, exatidão e linearidade adequadas	Curva analítica ( $y = ax + b$ )
Linearidade	Habilidade (dentro de uma dada faixa) em obter resultados os quais são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra	Coefficiente de determinação ( $r^2 \geq 0,99$ )
Efeito Matriz	Influência dos componentes da matriz no sinal analítico	Comparação entre as inclinações das curvas em solvente e em extrato branco da matriz
Exatidão	Proximidade de resultado em relação a uma referência	Ensaio de Recuperação
Precisão	Grau de dispersão de resultados entre ensaios diferentes	Repetibilidade e Precisão Intermediária
Limite de detecção	Menor concentração do analito que pode ser detectada	LOD= LOQ/3,33
Limite de quantificação	Menor concentração do analito que pode ser quantitativamente determinado	Menor nível de fortificação com exatidão e precisão aceitáveis

Fonte: INMETRO (2020); SANTE (2021).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) fazendo-se o uso de reagentes e instrumentos disponíveis no local.

#### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram:

- Agitador multiturbo vórtex, modelo Fisher Scientific;
- Agitador vortex, modelo VX 38;
- Centrífuga refrigerada, modelo NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- Centrífuga modelo 80-2B (Centribio, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha)
- Sistema de purificação de água, Mili-Q Direct UV3R (Millipore, Bedford, MA, EUA);

- Processador de alimentos mixer;
- Compressor de ar Atlas Copco, modelo SF2FF (Bélgica);
- Sistema gerador de nitrogênio Peak, modelo NM30L-MS (Reino Unido);
- Gás argônio 6.0 (White Martins, Brasil) usado como gás de colisão no sistema UHPLC-MS/MS;
- Sistema GC-MS/MS, modelo Agilent Intuvo 9000, contendo analisador de massas tipo triplo quadrupolo (QqQ) modelo Agilent 7010 GC-MS/MS e amostrador automático modelo Agilent 7693 (Agilent Technologies, EUA);
- Sistema UHPLC-MS/MS Waters (EUA) equipado com:
  - Cromatógrafo líquido;
  - Coluna ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 x 50 mm; 1,7 µm), Waters (EUA);
  - Detector MS triplo quadrupolo, modelo Xevo TQ;
  - Interface/fonte de ionização por eletronebulização;
  - Sistema controlador de solventes (sistema binário de bombas) para operação de gradientes de alta pressão;
  - Sistema de injeção;
  - Software de aquisição de dados MassLynx 4.1 (Waters, EUA);
  - Gerador de nitrogênio PEAK NM30L-MS (Peak Scientific, Escócia);

### 3.2 REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS UTILIZADOS

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

- 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<sup>®</sup> 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)
- Carvão ativado (Agilent Technologies, EUA):

- Carvão grafitizado (GCB), Supelclean ENVI-Carb, não poroso, área superficial 100 m<sup>2</sup>/g; tamanho de partícula 120/400 mesh (Supelco, EUA);
- Celite® 521 Terra diatomácea (Sigma Aldrich, EUA);
- Citrato de sódio diidratado, pureza ≥ 99% (Sigma-Aldrich, EUA);
- Cloreto de sódio (Sigma-Aldrich, EUA);
- EMR-Lipid (Agilent Technologies, EUA);
- Extran® neutro (Merck, Brasil);
- Fase fluorada, d.p 35-70 µm, diâmetro de poro 60 nm, 9% de carbono (Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas /SP – Brasil);
- Filtros de nylon de 13 mm e porosidade de 0,22 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 sesquidratado, pureza ≥ 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;
- Propilamino (NH<sub>2</sub>) (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*) com d.p. de 62-76 µm (Rio Grande, Brasil);
- Quitosana de casca de camarão (Sigma-Aldrich, Islândia);
- Quitosana de casca de caranguejo (Sigma-Aldrich, Japão);
- Silica BondElut 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);

- Supel 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 1 (Kenia);
- Zeólita 2 (Kenia).

### 3.3 AGROTÓXICOS SELECIONADOS

Para o desenvolvimento do método foram selecionados os agrotóxicos autorizados pela ANVISA através das monografias autorizadas para a cultura de abobrinha. A fim de ampliar o método, selecionou-se também, compostos que são frequentemente encontrados nas mais diferentes culturas de frutas e hortaliças nas análises de rotina do laboratório, considerando-se a disponibilidade dos padrões no laboratório.

As propriedades físico-químicas dos agrotóxicos são parâmetros importantes que podem ser avaliados para estabelecer um conhecimento prévio sobre o risco potencial ao meio ambiente e saúde humana, além da forma como esses compostos interagem e se estabilizam em diferentes meios (PRIMEL *et al.*, 2005). A Tabela 6 apresenta os compostos selecionados para esse trabalho, assim como suas respectivas classes, grupos químicos, pureza do padrão sólido e propriedades físico-químicas. Com o objetivo de garantir que um método analítico tenha sido executado corretamente, empregam-se padrão de controle e padrão interno. Compostos estáveis e/ou que possuam um comportamento semelhante ao analito, mas que não interajam com o mesmo e que sejam improváveis de se encontrar na amostra, podem ser empregados como um desses padrões (SANTE, 2021).

A atrazina deuterada empregada como padrão de controle (PC) foi adicionada ao branco fortificado e às amostras previamente ao procedimento de extração, para avaliar as possíveis fontes de erro em todas as etapas do método. Foi adicionada na mesma concentração dos ensaios de fortificação (5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). No preparo das curvas analíticas em solvente e em matriz, a atrazina deuterada também foi adicionada. Adicionado ao extrato final, o padrão interno (PI) é utilizado para avaliar o sinal do instrumento. O trifenilfosfato foi escolhido como padrão interno e foi adicionado na concentração de 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  aos brancos fortificados, amostras e no preparo das curvas analíticas em solvente e na matriz.

### 3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

As soluções estoques dos agrotóxicos utilizados para aplicação neste estudo foram preparadas a partir de padrões sólidos na concentração de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ . Estas soluções foram preparadas em solventes como acetonitrila e metanol grau UHPLC.

A partir destas soluções estoque preparou-se uma mistura contendo todos os compostos na concentração de  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , a qual foi utilizada para realizar os ensaios de fortificação e avaliar a linearidade do método. Desta mistura, preparou-se uma solução de trabalho na concentração de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  em solvente acetonitrila para o preparo das curvas analíticas nas concentrações 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 e  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ , em acetonitrila e no extrato da matriz branco de abobrinha. Todas as soluções analíticas foram acondicionadas em frascos âmbar e a temperaturas abaixo de  $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ .



Tabela 6 – Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido, fórmula molecular e propriedades físico-químicas.

									(continua)
Nº	Compostos	Classe (s)	Grupo Químico	Pureza (%)	Fórmula molecular	pKa	log Kow	Koc (mg L <sup>-1</sup> )	Solubilidade (mg L <sup>-1</sup> )
1	Acefato	Inseticida	Organofosforado	99	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>3</sub> PS	8,35	-0,85	302	790000
2	Acetamiprido*	Insecticida	Nicotenoide	99	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> CIN <sub>4</sub>	0,7	0,8	20	29,50
3	Acibenzolar-S-metílico*	Fungicida	Benzotiadiazol	97	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> OS <sub>2</sub>	-	3,1	1200	7,7
4	Aldicarbe	Insecticida	Carbamato	99	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	-	1,15	36	4930
5	Ametrina	Herbicida	Triazina	98,2	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> S	4,1	2,63	96	1,8 10 <sup>3</sup>
6	Atrazina	Herbicida	Triazina	98,1	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> CIN <sub>5</sub>	1,7	2,61	122	30
7	Azinfós etílico	Inseticida	Organofosforado	97,7	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	-	3,4	237,1	8,25
8	Azinfós metílico	Inseticida	Organofosforado	99	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	5	2,53	69,7	43,54
9	Azoxistrobina*	Fungicida	Estrobilurina	99,2	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	0,94	2,5	740,2	11,61
10	Bitertanol	Fungicida	Triazol	99	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> NaO <sub>8</sub>	3,35	1,03	302	64000
11	Boscalida	Fungicida	Anilida	99	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	-	4,11	-	3,8
12	Bromuconazol	Fungicida	Triazol	99,5	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	10,7	4	3,74 10 <sup>7</sup>	2,61
13	Buprofezina*	Inseticida e acaricida	Tiadiazinona	99,3	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> OS	0,38	4,3	5741	2,43
14	Carbaril	Inseticida	Metilcarbamato de naftila	100	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	10,4	2,36	241,7	416,2
15	Carbendazim	Fungicida	Benzimidazol	98,5	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	4,2	1,55	175,8	2441
16	Carbofurano	Inseticida, cupinicida, acaricida e nematocida	Metilcarbamato de benzofuranila	99	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	3,78	2,32	70,85	353,9
17	Carbofurano-3-OH	Metabolito do carbofurano	Carbamato	97	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>	3,6	0,76	10	62000
18	Carboxim	Fungicida	Oxatina	99,5	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> S	0,5	2,14	79,96	423,7
19	Ciantranilprole*	Insecticida	Carboxamida	97,5	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> BrCIN <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	-	3,18	-	-
20	Cianazina	Herbicida	Triazina	99	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> CIN <sub>6</sub>	12,9	2,22	123,8	183,8
21	Cimoxanil*	Fungicida	Cianoacetamida oxima	97	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	9,3	4,24	38	10,62
22	Ciprodinil	Fungicida	Anilino pirimidina	99,9	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub>	4,44	4	-	13
23	Cletodim	Herbicida	Oxima ciclohexanodion	90	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> CINO <sub>3</sub> S	4,47	4,14	-	5450

Tabela 6 – Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido, fórmula molecular e propriedades físico-químicas.

(continuação)

Nº	Compostos	Classe (s)	Grupo Químico	Pureza (%)	Fórmula molecular	pKa	log Kow	Koc (mg L <sup>-1</sup> )	Solubilidade (mg L <sup>-1</sup> )
24	Clomazone	Herbicida	Isoxazolidinona	98,5	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> ClNO <sub>2</sub>	-	2,5	4770	197,5
25	Clorantranilipole*	Inseticida	Antranilamida	94	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> BrCl <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	10,8	3,98	2724	0,37
26	Clorimurom etílico	Herbicida	Sulfonilureia	99,5	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S	4,2	2,5	78,19	18,15
27	Clorpirifós	Inseticida	Organofosforado	99,9	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	4,55	4,96	6829	0,36
28	Clorpirifós metílico	Acaricida e inseticida	Organofosforado	99,9	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	-	4,31	2008	1,89
29	Cloroprofam	Herbicida	Carbamato	99,5	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> ClNO <sub>2</sub>	14,5	3,79	470	110
30	Cresoxim metílico	Fungicida	Estrobilurina	98	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	-	3,4	3,8	2
31	Deltametrina*	Inseticida e formicida	Piretróide	99,6	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Br <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	10,6	6,2	1,02 10 <sup>7</sup>	0,0002
32	Diafentiuron	Inseticida e acaricida	Feniltiouréia	99,5	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> OS	-	5,76	43546	0,06
33	Diazinona	Inseticida	Organofosforado	97,5	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	2,6	3,81	1337	6,45
34	Difenoconazol*	Fungicida	Triazol	99	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	1,07	4,3	2,43 1	0,6
35	Dimetoato	Inseticida	Organofosforado	99,4	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	2	0,28	24,52	66000
36	Dimetomorfe*	Fungicida	Morfolina	99	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>4</sub>	1,30	2,63	1,36	41,8
37	Diuron	Herbicida	Uréia	97,5	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	7,8	-	-	0,42
38	Epoconazol	Fungicida	Triazol	98,5	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> ClFN <sub>3</sub> O	-	-	-	0,66
39	Espinetoram*	Inseticida	Espinosinas	97,9	C <sub>42</sub> H <sub>69</sub> NO <sub>10</sub>	9,17	-	-	-
40	Espinosade A	Inseticida	Espinosinas	91	C <sub>41</sub> H <sub>65</sub> NO <sub>10</sub>	8,10	3,91	-	235
41	Espinosade D	Inseticida	Espinosinas	93	C <sub>42</sub> H <sub>67</sub> NO <sub>10</sub>	7,87	4,38	-	0,332
42	Espirodiclofeno	Inseticida	Cetoenol	98	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-	-	-	-
43	Espiromesifeno*	Inseticida	Cetoenol	98,94	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	-	4,55	-	0,13
44	Etefon	Regulador de crescimento	Gerador de etileno	96	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> ClO <sub>3</sub> P	2,5	-0,22	608	1 10 <sup>6</sup>
45	Etofemproxi*	Inseticida	Piretróide	98	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	-	6,9	-	0,0225
46	Famoxadona*	Fungicida	Oxazolidinonas	99,0	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	10	4,65	3890	0,052
47	Fenpiroximato*	Acaricida	Pirazol	95,4	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-	5,01	12000	0,023
48	Fempropimorfe	Fungicida	Morfolina	94,5	C <sub>20</sub> H <sub>33</sub> NO	6,98	3,3	2937	19
49	Fenamidona*	Fungicida	Imidazol	96	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> OS	-	2,8	2352	7,8

Tabela 6 – Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido, fórmula molecular e propriedades físico-químicas.

(continuação)

Nº	Compostos	Classe (s)	Grupo Químico	Pureza (%)	Fórmula molecular	pKa	log Kow	Koc (mg L <sup>-1</sup> )	Solubilidade (mg L <sup>-1</sup> )
50	Fenamifós	Inseticida	Organofosforado	93	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>3</sub> PS	10,5	3,23	1686	400
51	Fenarimol	Fungicida	Pirimidinil carbinol	99	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	-	3,62	3786	14
52	Fentiona	Inseticida, formicida, acaricida e cupinicida	Organofosforado	95,5	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	-	4,09	-	2
53	Fipronil	Inseticida, formicida e cupinicida	Pirazol	96,7	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>6</sub> N <sub>4</sub> OS	-	4	-	3,78
54	Fluopicolida*	Fungicida	Benzamida piridina	95	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>3</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O	-	3,26	373	2,8
55	Flupiradifurona*	Inseticida	Butenolida	99,8	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> ClF <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	1,2	-	3200
56	Fluquinconazol	Fungicida	Triazol	98,5	C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>5</sub> O	0,9	3,24	870	1,15
57	Flutolanil	Fungicida	Carboxamida	99,5	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	-	3,7	680	6,53
58	Flutriafol*	Fungicida	Triazol	99,5	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O	2,3	23	292	95,0
59	Fluxaproxade	Fungicida	Carboxamida	96,5	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> F <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O	12,5 8	3,06	1240	2,44
60	Formetanato*	Inseticida e acaricida	Metilcarbamato de fenila	98	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	8,1	-	616	822000
61	Fostiazato	Inseticida e nematocida	Organofosforado	97	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	-	1,68	71	9850
62	Hexitiazoxi	Acaricida	Tiazolidina carboxamida	99	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	-	5,57	6200	0,5
63	Imazali	Fungicida	Imidazol	97,5	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	6,53	-	2080	0,22
64	Imidacloprido*	Inseticida	Neonicotinóide	98,5	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	11,1	0,76	300	580
65	Indoxacarbe*	Insecticida e formicida	Oxadiazina	99	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	-	4,65	8100	0,20
66	Iprovalicarbe	Fungicida	Carbamato	98	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	3,18	106	17,8
67	Linuron	Herbicida	Uréia	99,4	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	12,1	3,2	860	75
68	Malationa	Acaricida e inseticida	Organofosforado	99	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> PS <sub>2</sub>	6,8	2,7	1800	143
69	Mandipropamida*	Fungicida	Éter mandelamida	97,5	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>4</sub>	-	3,2	1294	4,2
70	Mecarbam	Acaricida e inseticida	Organofosforado	98	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>5</sub> PS <sub>2</sub>	-	-	2,31	-
71	Mepronil	Fungicida	Carboxamida	99	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>2</sub>	-	3,66	974	12,7

Tabela 6 – Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido, fórmula molecular e propriedades físico-químicas.

(continuação)

Nº	Compostos	Classe (s)	Grupo Químico	Pureza (%)	Fórmula molecular	pKa	log Kow	Koc (mg L <sup>-1</sup> )	Solubilidade (mg L <sup>-1</sup> )
72	Metalaxil*	Fungicida	Acilalaninato	99,5	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	-	1,71	163	8,41
73	Metconazol	Acaricida e inseticida	Itraconazol	99,5	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O	11,3	3,85	1,71	30,4
74	Metiocarbe	Inseticida, moluscicida e repelente de passaros	Metilcarbamato de fenila	99	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub> S	-	3,1	655	27
75	Metomil	Acaricida e inseticida	Metilcarbamato de oxima	99	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	-	0,09	43	5,5 10 <sup>4</sup>
76	Metsulfurom metílico	Herbicida	Sulfolinuréia	99	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S	3,3	0,02	57	172
77	Monocrotofós	Inseticida	Organofosforado	98	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>11</sub>	6,6	5,43	-	3,0x10 <sup>-3</sup>
78	Monolinuron	Herbicida	Uréia	99,5	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>5</sub> P	-	0,22	19	8,1x10 <sup>5</sup>
79	Novalurom	Inseticida	Benzoiluréia	98	C <sub>17</sub> H <sub>9</sub> ClF <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-	5,27	-	0,95
80	Oxamil	Acaricida, inseticida e nematocida.	Carbamato	99	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	12,4	0,44	17	1,5x10 <sup>5</sup>
81	Picoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	98,5	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	-	3,6	898	3,1
82	Piraclostrobina*	Fungicida	Estrobilurina	97,5	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-	3,99	9300	20
83	Pirazofós	Fungicida e inseticida	Fosforotioato de heterociclo	97	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> PS	-	3,8	646	4,2
84	Piridabem	Inseticida e acaricida	Piridazinona	99	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>2</sub> OS	-	6,37	66503	0,02
85	Piridafentiona	Inseticida e acaricida	Organofosforado	99	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> PS	-	3,1	7211	100
86	Pirimetanil*	Fungicida	Anilino pirimidina	99,5	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub>	3,52	2,84	301	121
87	Pirimicarbe	Inseticida	Dimetilcarbamato	99,3	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	4,44	1,7	388	31000
88	Pirimifós metílico	Inseticida e acaricida	Organofosforado	97,6	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS	4,3	4,2	1100	11
89	Piriproxifem*	Inseticida	Éter piridiloxipropílico	99,9	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	6,87	5,37	-	0,37
90	Propamocarbe*	Fungicida	Carbamato	96,5	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9,48	1,12	100	9 10 <sup>5</sup>
91	Propargito	Acaricida	Sulfito de alquila	94,5	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> S	-	5,7	-	0,215
92	Propiconazol	Fungicida	Triazol	97,5	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	1,09	3,72	656	100
93	Propoxur	Inseticida	Carbamato	99,9	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	-	1,56	30	18000
94	Quinoxifem	Fungicida	Fenoxiquinolona	99	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> FNO	-	4,66	22929	0,05

Tabela 6 – Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido, fórmula molecular e propriedades físico-químicas.

(continuação)

Nº	Compostos	Classe (s)	Grupo Químico	Pureza (%)	Fórmula molecular	pKa	log Kow	Koc (mg L <sup>-1</sup> )	Solubilidade (mg L <sup>-1</sup> )
95	Saflufenacil	Herbicida	Uracila	99	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> ClF <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S	4,41	2,57	368,2	2100
96	Simazina	Herbicida	Triazina	98	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>5</sub>	1,62	2,1	340	6
97	Tebufenozida*	Inseticida	Diacilhidrazina	99	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	4,25	35000	0,83
98	Teflubezurom	Inseticida	Benzoiluréia	96,5	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	8,16		26062	0,02
99	Terbufós	Inseticida e nematicida	Organofosforado	99	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> O <sub>2</sub> PS <sub>3</sub>	-	4,48	500	4,5
100	Terbutilazina	Herbicida	Triazina	99,5	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub>	2	3,21	219	6,6
101	Tiabendazol	Fungicida	Benzimidazol	99	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> S	-	2,39	2500	30
102	Tiacloprido	Inseticida	Neonicotinóide	98	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub> S	-	-	615	184
103	Tiametoxam*	Inseticida	Neonicotinóide	99,5	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	-	0,13	64	41000
104	Tiodicarbe	Inseticida	Metilcarbamato de oxima	97,4	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sub>3</sub>	-	1,62	418	22
105	Tiofanato metílico	Fungicida	Benzimidazol (precursor de)	99	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	7,38	1,5	225	25
106	Tolcofós metílico	Fungicida	Organofosforado	99	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	-	4,56	-	0,708
107	Triadimenol	Fungicida	Triazol	98,5	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	-	3,08	273	72
108	Triazofós	Inseticida, acaricida e nematicida	Organofosforado	98,5	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS	-	3,34	358	35
109	Trifloxistrobina*	Fungicida	Estrobilurina	98,8	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-	4,5	2377	0,61
110	Triflumurom*	Inseticida	Benzoiluréia	99	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	4,91	11891	0,04
111	Vamidationa	Inseticida	Organofosforado	98	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>	-	-	70	4 10 <sup>6</sup>
112	Zoxamida*	Inseticida	Organofosforado	95	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>3</sub> ON <sub>2</sub>	3,76	5,06	1240	18

Fonte: autor (2022). \*compostos de uso autorizado pela ANVISA para abobrinha; 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 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras branco de abobrinha utilizadas durante a realização dos testes de preparo de amostra foram obtidas em um supermercado local da cidade de Santa Maria/RS. O processamento das amostras branco foi feito através do corte em pequenos pedaços e a utilização de um mixer para homogeneização da amostra com casca e sementes, retirando-se apenas o pedúnculo da abobrinha. Após a homogeneização, as amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos e armazenadas em freezer à temperatura abaixo de  $-10^{\circ}\text{C}$ .

As 20 amostras comerciais utilizadas no presente estudo foram adquiridas em estabelecimentos comerciais de diferentes cidades do estado do Rio Grande do Sul (RS) e uma amostra proveniente do estado de Santa Catarina (SC). O processamento e armazenamento dessas amostras seguiu-se o procedimento realizado para as amostras branco. A identificação das amostras comerciais, assim como as cidades de origem de cada amostra estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Amostras de abobrinha avaliadas no presente estudo e localidade de coleta

<b>Identificação</b>	<b>Origem</b>	<b>Identificação</b>	<b>Origem</b>
A1	Itaara/RS	A11	Passo Fundo/RS
A2	Caçapava do Sul/RS	A12	Florianópolis/SC
A3	Cruz Alta/RS	A13	Alegrete/RS
A4	Seberi/RS	A14	Santa Maria/RS
A5	Frederico Westphalen/RS	A15	Santa Maria/RS
A6	Itaqui/RS	A16	Santa Maria/RS
A7	Ijuí/RS	A17	Santa Maria/RS
A8	Sant`ana do Livramento/RS	A18	Santa Maria/RS
A9	Nova Petrópolis/RS	A19	Santa Maria/RS
A10	Santo Augusto/RS	A20	Iraí/RS

Fonte: o autor (2022).

### 3.7 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO SISTEMA UHPLC-MS/MS

#### 3.7.1 Escolha da fase móvel

A escolha da fase móvel é importante porque sua composição assim como o gradiente utilizado influenciam de maneira direta na separação dos compostos. A escolha por dois aditivos na fase móvel gerara melhores intensidades e respostas reprodutíveis (Zhan *et al.*, 2013). Para os analitos em estudo, quando de utilização de ácido fórmico no modo de ionização positivo há formação de íons  $[M + H]^+$  e, no caso do formiato de amônio ocorre a formação de adutos de amônio  $[M + NH_4]^+$  os quais impedem a formação de adutos de sódio com os agrotóxicos, os quais podem ser

formados espontaneamente, por alguns analitos quando se utiliza a ionização por ESI (CHIARADIA, 2009).

Dessa maneira, a fim de melhorar a otimização dos compostos analisados neste trabalho, através do sistema UHPLC-MS/MS, a fase móvel consistiu em: fase móvel A: água ultrapura/metanol (98:2, v/v) e fase móvel B: metanol/água ultrapura (98:2, v/v), ambas contendo ácido fórmico 0,1% (v/v) e formiato de amônio 5 mmol L<sup>-1</sup>. O tempo total de corrida cromatográfica foi de 10 min, sob a vazão constante de 0,225 mL min<sup>-1</sup>. Na Tabela 8 estão apresentados os gradientes da fase móvel em função do tempo de análise cromatográfica.

Tabela 8 - Gradiente da fase móvel utilizado para a determinação de agrotóxicos em abobrinha no sistema UHPLC-MS/MS

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

Fonte: Kemmerich *et al.*, 2014.

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

A seguir estão descritas as condições gerais utilizadas para o desenvolvimento do método e determinação de agrotóxicos em amostras de abobrinha que foram otimizadas previamente no LARP-UFSM na análise de amostras de rotina.

- Temperatura da coluna: 40 °C
- Voltagem capilar: 0,5 no ESI+ e 2,0 kV no ESI-;
- Temperatura de dessolvatação: 500 °C
- Vazão do gás de dessolvatação (N<sub>2</sub>): 600 L h<sup>-1</sup>
- Vazão do spray: 80 L h<sup>-1</sup>
- Vazão do gás de colisão: 0,15 mL min<sup>-1</sup>
- Temperatura da fonte: 150 °C
- Volume de injeção: 10 µL
- Tempo de residência (dwell time): 0,01 s
- Tempo de aquisição: 30 s

As transições foram avaliadas no modo SRM, onde foi utilizada a transição de maior intensidade para quantificação do analito e a segunda transição de maior intensidade para confirmação do analito.

### 3.8 TESTES DE PREPARO DE AMOSTRA

Os testes de preparo de amostra para a determinação de agrotóxicos em abobrinha foram realizados inicialmente empregando método QuEChERS nas suas três versões: original, acetato e citrato.

Os testes foram identificados pelo prefixo T (T01, T02 e T03; QuEChERS original, acetato e citrato, respectivamente). Esses testes foram realizados em triplicata com o objetivo de apontar os melhores resultados e condições de extração dos analitos da amostra através da avaliação dos ensaios de fortificação na concentração  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ . O Quadro 1 apresenta os três testes realizados.

Quadro 1 - Etapas do preparo de amostra QuEChERS original, acetato e citrato

<b>Etapa</b>	<b>QuEChERS original (T01)</b>	<b>QuEChERS acetato (T02)</b>	<b>QuEChERS citrato (T03)</b>
Quantidade de amostra	10 g	15 g	10 g
Extração	10 mL acetonitrila	15 mL acetonitrila 1% ácido acético	10 mL acetonitrila
Homogeneização	Agitação 1 min (vórtex)		
Partição	4 g MgSO <sub>4</sub> 1 g NaCl	6 g MgSO <sub>4</sub> 1,5 g CH <sub>3</sub> COONa	4 g MgSO <sub>4</sub> 1 g NaCl 1 g C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,5 g C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .1,5H <sub>2</sub> O
Separação I	Agitação 1 min (vórtex) + centrifugação 3400 rpm/8min/20°C		
Limpeza	2 mL de extrato + 300 mg MgSO <sub>4</sub> + 50 mg PSA	2 mL de extrato + 300 mg MgSO <sub>4</sub> + 100 mg PSA	2 mL de extrato + 300 mg MgSO <sub>4</sub> + 50 mg PSA
Separação II	Agitação 1 min (vórtex) + centrifugação 3500 rpm/8min/20°C		
Filtração	Filtro de nylon 0,2 $\mu\text{m}$		
Diluição	5x em H <sub>2</sub> O		
Análise	UHPLC-MS/MS		

Fonte: o autor, (2022).

O efeito matriz (EM) também foi avaliado percentualmente para esses testes de maneira pontual através da comparação entre a média das triplicatas do sinal de



área da concentração  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  da curva em extrato da matriz com a média das triplicatas do sinal de área da concentração  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  da curva em solvente. Para isso, aplicou-se a Equação 1. Para esse percentual é preciso considerar que valores entre -50 e -20% ou +20 e +50% demonstram um efeito matriz médio e valores abaixo de -50% e acima de +50% indicam um efeito matriz alto, os valores de -20 a +20% são considerados “insignificativos” (FERRER *et al.*, 2011). Os critérios de aceitação no ensaio de fortificação foram valores entre 70-120% para a recuperação dos compostos e  $\text{RSD} \leq 20\%$ .

$$EM (\%) = \left( \frac{Am}{As} - 1 \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

Am é a área da solução analítica preparada no extrato da matriz (abobrinha)  
As é a área da solução analítica preparada no solvente (acetoneitrila)

Outra etapa avaliada, foi o emprego de diferentes tipos de sorventes para a etapa de limpeza por d-SPE após a etapa de partição do método QuEChERS original. Inicialmente, analisou-se 23 diferentes sorventes. Essa etapa foi denominada T04. Para todos os sorventes avaliados, adicionou-se 300 mg de  $\text{MgSO}_4$  anidro. O volume do extrato que foi submetido à limpeza foi de 2 mL. Os resultados obtidos foram avaliados através da avaliação colorimétrica (avaliação visual) da eficiência de limpeza dos extratos. A Tabela 9 apresenta os sorventes avaliados.

Tabela 9 – Sorventes utilizados na etapa de avaliação visual de limpeza dos extratos (T04)

Sorvente		
1. Carvão ativado	9. Florisil	17. Sílica BondElut SI
2. Carvão grafitizado (GCB)	10. Nexus	18. Celite Terra diatomácea
3. Oasis HLB	11. Alumina	19. EMR-Lipid
4. Strata-X	12. Propilamino	20. Supel QuE Z-Sep+
5. C18	13. Quitosana (FURG)	21. Terra diatomácea
6. Strata SDB-L	14. Quitosana de caranguejo	22. Zeólita 1
7. PSA	15. Quitosana de camarão	23. Zeólita 2
8. Fase fluorada	16. Sílica gel $50 \mu\text{m}$	

Fonte: o autor, (2022).

Em seguida, foram escolhidos os sete melhores sorventes (carvão ativado, GCB, Oasis HLB, Strata-X, C18, Strata SDB-L e PSA) pelo critério visual de limpeza do extrato (T04) para se realizar os ensaios de fortificação. Esses ensaios foram

realizados em triplicata na concentração de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  com o objetivo de avaliar a recuperação dos compostos somente na etapa de limpeza por d-SPE, portanto, as fortificações foram realizadas diretamente no sobrenadante do extrato logo após a etapa de partição seguido de diluição 1:4 em água ultrapura. Foram avaliados os resultados de recuperação e efeito matriz dos sorventes. O efeito matriz foi avaliado de maneira pontual através da comparação entre a média das triplicatas das áreas obtidas na concentração  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  a partir do solvente acetonitrila com a média das triplicatas das áreas obtidas na mesma concentração em extrato da matriz branco fortificado conforme Equação 1. As massas dos sorventes, do  $\text{MgSO}_4$  anidro e o volume do extrato foram mantidas conforme citado anteriormente no teste T04. O teste para avaliação da recuperação dos compostos utilizando os sete sorventes escolhidos foi denominado T05. Os critérios de aceitação foram de 70-120% de recuperação e  $\text{RSD} \leq 20\%$  no nível  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Além disso, realizou-se testes de diferentes fatores de diluição do extrato em água ultrapura sem o emprego da etapa de limpeza d-SPE, denominado T06. Para a análise dos resultados, foram realizados ensaios de fortificação em triplicata no nível de concentração  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  com o objetivo de avaliar as recuperações dos compostos. O efeito matriz em cada fator de diluição foi calculado utilizando a Equação 1. Os fatores de diluição estudados foram de (1:1, 1:2, 1:4, 1:9, 1:20, v/v) em água ultrapura.

Posteriormente, foram realizados testes adicionais (T07 e T08) qualitativamente, a fim de fazer o comparativo entre os testes de limpeza do extrato com o emprego de sorvente (T05) e o teste com diferentes fatores de diluição (T06). Assim, o teste T07 consistiu em uma avaliação qualitativa da presença de coextrativos no extrato através da análise de cromatogramas gerados pelo modo de varredura em GC-MS/MS, no qual os extratos foram diluídos 5x em acetonitrila antes da injeção, e não houve fortificação da amostra. No teste T08, analisou-se a eficiência da eliminação da cor do extrato fazendo-se a filtração do extrato antes ou depois da diluição 1:4 (v/v) em água ultrapura. Para ambos os testes, a avaliação foi realizada qualitativamente.

### 3.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABOBRINHA POR UHPLC-MS/MS

O método de extração que obteve os melhores resultados foi validado de acordo com os documentos orientadores de validação de métodos analíticos estabelecidos pelo INMETRO e SANTE. Os parâmetros utilizados para a validação do método analítico foram: seletividade, curva analítica e linearidade, efeito matriz, exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária), limite de detecção e limite de quantificação.

#### 3.9.1 Seletividade

A seletividade do método proposto foi avaliada a partir da comparação dos cromatogramas obtidos da injeção no sistema UHPLC-MS/MS dos extratos de amostras branco com as amostras branco fortificadas com os compostos em estudo analisados no método. Como na avaliação da seletividade, é necessária uma análise da matriz da amostra, pois esta pode conter componentes que interferem no desempenho da medição, ampliando ou reduzindo o sinal analítico, fez-se necessário a investigação do efeito matriz.

Logo, no estudo de seletividade investigou-se também a existência de efeito de matriz (INMETRO, 2020). Assim, nos subitens 3.9.3 e 4.4.3, os critérios e resultados do estudo do efeito matriz são apresentados.

#### 3.9.2 Curva analítica e linearidade

A linearidade da curva analítica foi avaliada a partir da injeção em triplicata das curvas analíticas preparadas a partir da solução padrão nas concentrações 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; e 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Essas soluções foram preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato branco da matriz abobrinha. Posteriormente, realizaram-se os cálculos da média da área de cada analito para obter a regressão linear e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) que deve ser maior ou igual a 0,990. A equação da reta (Equação 2) relaciona a área do pico de cada analito à concentração e a sensibilidade.

$$y = a + bx \quad (2)$$

Onde:

y é a resposta medida, ou seja, a área do pico;

x é a concentração;

a é o coeficiente linear (intersecção com o eixo y, quando  $x = 0$ ).

b é o coeficiente angular (inclinação da curva analítica) que é igual a sensibilidade;

### 3.9.3 Efeito Matriz (EM)

Diferentemente do cálculo do EM da Equação 1 utilizado nos testes para a avaliação do método de extração, na validação do método buscou-se analisar de uma forma estatisticamente aplicada o efeito que a matriz incide aos analitos em estudo.

Portanto, para avaliar o EM, comparou-se as inclinações das curvas analíticas dos padrões realizados no solvente (acetoneitrila) e no extrato branco da matriz de abobrinha.

Inicialmente, foram comparadas as variâncias da curva em solvente e em extrato branco da matriz de abobrinha através do teste F (Fisher-Snedecor) pela Equação 3.

$$F_{calc,i} = \frac{s_{i,1}^2}{s_{i,2}^2} \quad (3)$$

Onde:

$S^2_1$  e  $S^2_2$  são as variâncias das médias das triplicatas das curvas em solvente e em extrato branco da matriz para cada analito, com a maior variância no numerador.

Para as variâncias estatisticamente iguais foram aplicadas as Equações 4 e 5 para o cálculo do t de Student (nível de 95% de confiança) a fim de verificar a igualdade estatística das inclinações  $a_1$  e  $a_2$  das curvas analíticas em solvente e em extrato branco da matriz, respectivamente.

$$t_{a,calc} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{S_{a,p}^2 \left( \frac{1}{N_{x1}} + \frac{1}{N_{x2}} \right)}} \quad (4)$$

Onde:

$a_1$  é a inclinação da curva em solvente e  $a_2$  é a inclinação da curva na matriz,  
e:

$$s_{a,p}^2 = \frac{(N_{x1} - 1)s_{a1}^2 + (N_{x2} - 1)s_{a2}^2}{(N_{x1} + N_{x2} - 2)} \quad (5)$$

Onde:

$N_{x1}$  e  $N_{x2}$  correspondem as replicatas das curvas analíticas em solvente e no extrato branco da matriz, respectivamente.

Para as variâncias estatisticamente diferentes, foi aplicada a Equação 6 e 7 para o cálculo do t de Student (nível de 95% de confiança).

$$t_{a,calc} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\frac{s_{a1}^2}{N_{x1}} + \frac{s_{a2}^2}{N_{x2}}}} \quad (6)$$

Neste caso o número de graus de liberdade é igual a:

$$v = \frac{\left(\frac{s_{a1}^2}{N_{x1}} + \frac{s_{a2}^2}{N_{x2}}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_{a1}^2}{N_{x1}}\right)^2}{N_{x1} + 1} + \frac{\left(\frac{s_{a2}^2}{N_{x2}}\right)^2}{N_{x2} + 1}} - 2 \quad (7)$$

Assim, se o valor de  $t_{calc}$  for menor que o valor de  $t_{crit}$ , pode-se concluir que as curvas analíticas com as duas matrizes (solvente e extrato branco) têm a mesma inclinação e, por conseguinte, não há diferença significativa entre elas. Se o valor de  $t_{calc}$  for maior que  $t_{crit}$ , pode-se concluir que as curvas analíticas com as duas matrizes têm inclinações diferentes e, por conseguinte, há diferença significativa entre elas.

### 3.9.4 Exatidão e precisão

A exatidão e precisão do método foram avaliadas a partir dos valores de recuperação e RSD. Os ensaios de recuperação, a partir da fortificação das amostras

branco da matriz abobrinha nos níveis 5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , foram realizados em sete replicatas. A recuperação foi calculada através da Equação 8.

$$\text{Recuperação (\%)} = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (8)$$

Onde:

C1 é a concentração do analito na amostra fortificada;  
 C2 é a concentração do analito na amostra não fortificada;  
 C3 é a concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

A precisão, expressa através do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*), é calculada através da Equação 9.

$$\text{Desvio Padrão Relativo (\%)} = \left( \frac{DP}{CMD} \right) \times 100 \quad (9)$$

Onde:

DP é o desvio padrão;  
 CMD é a concentração média determinada.

A precisão intermediária foi avaliada a partir da execução do método em dias diferentes, empregando-se os ensaios de fortificação nos níveis 5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (n=7).

Os critérios de aceitação para a exatidão e precisão foram de acordo com normativas descritas pela SANTE, que preconiza que as recuperações médias da validação inicial devem estar dentro da faixa de 70-120%, com uma repetibilidade associada  $RSDr \leq 20\%$ , para todos os analitos (SANTE, 2021).

### 3.9.5 Limites de quantificação e detecção

A partir da avaliação dos resultados dos ensaios de recuperação e de linearidade das curvas analíticas, de todos os analitos, realizou-se a definição do limite de detecção e do limite de quantificação. O LOQ foi estabelecido como a menor concentração fortificada na amostra branco de abobrinha que apresentou recuperações entre 70 e 120% com  $RSD \leq 20\%$ . Calculou-se o LOD partindo-se do LOQ estabelecido dividido por 3,33.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS EMPREGADO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ABOBRINHA

A Tabela 10 apresenta as condições utilizadas no sistema cromatográfico UHPLC-MS/MS para separação e ionização dos analitos sob avaliação neste estudo.

Tabela 10 – Condições empregadas no sistema cromatográfico UHPLC-MS/MS Xevo-TQ

<b>Condições cromatográficas</b>	
<b>Sistema cromatográfico</b>	UHPLC-MS/MS (Xevo TQ®, Waters, EUA)
<b>Detector</b>	Detector MS do tipo triplo quadrupolo, modelo Xevo-TQ
<b>Coluna</b>	Acquity UPLC™ BEH C18 (50 × 2,1 mm d.i.; 1,7 μm)
<b>Temperatura da coluna</b>	40 °C
<b>FM A</b>	Água: metanol (98:2, v/v) contendo formiato de amônio 5 mmol L <sup>-1</sup> e 0,1% (v/v) de ácido fórmico
<b>FM B</b>	Metanol:água (98:2, v/v) contendo formiato de amônio 5 mmol L <sup>-1</sup> e 0,1% (v/v) de ácido fórmico
<b>Volume de injeção</b>	10 μL
<b>Vazão</b>	0,225 mL min <sup>-1</sup>
<b>Modo de aquisição</b>	SRM
<b>Tipo de ionização</b>	Positiva e negativa
<b>Gás de colisão</b>	Argônio
<b>Gás de dessolvatação</b>	Nitrogênio (500 °C)
<b>Temperatura da fonte</b>	150 °C

Fonte: Kemmerich *et al.*, 2014

### 4.2 CONDIÇÕES DE IDENTIFICAÇÃO E CONFIRMAÇÃO POR UHPLC-MS/MS

Na Tabela 11 estão listados os agrotóxicos que foram determinados pelo sistema UHPLC-MS/MS, no modo de ionização ESI positivo e negativo com modo de aquisição SRM. Nesta tabela também estão dispostos os tempos de retenção, íons precursores, íons produto e energia de colisão de todas as transições monitoradas neste trabalho. A transição mais intensa de cada analito monitorado foi utilizada para a quantificação do composto. A segunda transição, segunda mais intensa foi utilizada para a identificação.

Tabela 11- Compostos determinados por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos tempos de retenção (t<sub>R</sub>), voltagem do cone (VC), íons precursores e produto, e energias de colisão (EC) utilizados.

(continua)

Nº	Analito	t <sub>R</sub> (min)	VC (V)	Íon Precursor (m/z)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
					Íon produto (m/z)	EC (eV)	Íon produto (m/z)	EC (eV)
1	Acefato	1.72	8	184,1	125,1	18	143	8
2	Acetamiprido	3.69	23	223	56,1	15	126	20
3	Acibenzolar-S-metílico	6.07	41	210,9	69	52	135,9	30
4	Aldicarbe	4.34	7	208	89	7	116	7
5	Ametrina	5.65	32	228,1	68,1	36	186,1	18
6	Atrazina	5.51	30	216,1	96,1	23	174,1	18
7	Azinfós-etílico	6.50	10	346	77,1	36	132	16
8	Azinfós-metílico	5.82	12	318	261	8	160	8
9	Azoxistrobina	5.97	17	404	329	30	372	15
10	Bitertanol	7.10	12	338,1	70,1	8	99,1	16
11	Boscalida	6.18	32	342,9	139,9	20	307	20
12	Bromoconazol	6.40	32	376	70,1	25	158,9	35
13	Buprofezina	7.51	22	306,1	57,4	20	201	12
14	Carbaril	5.14	19	202	117	28	145	22
15	Carbendazim	2.76	24	192,1	132,1	28	160,1	18
16	Carbofurano	4.94	25	222,1	123	16	165,1	16
17	Carbofurano-3-hidroxi	3.67	25	238	181	10	163	16
18	Carboxina	5.08	25	236	87	22	143	16
19	Ciantranilprole	4.65	20	475	444	17	286	13
20	Cianazina	5.25	28	241	96	25	241	17
21	Cimoxanil	3.91	14	199	111	18	128	8
22	Ciprodinil	6.68	46	226	108	25	93	33
23	Cletodim	7.35	25	360	268,1	20	164	10
24	Clomazone	5.90	23	240	89	46	125	18
25	Clorantranilprole	5.82	20	481,6	451,1	22	283,9	14
26	Clorimuron etílico	6.22	25	415,1	213	17	186	15
27	Clorpirifós	7.73	27	349,9	198	20	97	32
28	Clorpirifós-metílico	7.24	23	321,8	125	20	289,9	16
29	Clorprofam	6.35	49	214,1	154	18	172	8
30	Cresoxim-metílico	6.83	15	314,1	116	12	206	7
31	Deltametrina	8.02	16	523	506	11	281	18
32	Diafentiuron	7.91	20	385,2	329,16	16	278,2	22
33	Diazinona	6.96	20	305,1	96,9	35	169	22
34	Difenoconazol	7.21	37	406	111,1	60	251,1	25
35	Dimetoato	3.63	12	230,1	199	10	125	20
36	Dimetomorfe	6.28	30	388,1	300,9	20	165	30
37	Diurum	5.69	27	233	46,3	14	72,1	18
38	Epoxiconazol	6.58	25	330	101	50	121	22
39	Espinetoram	7.28	60	748,5	142,4	35	98	30



Tabela 11 - Compostos determinados por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos tempos de retenção (t<sub>R</sub>), voltagem do cone (VC), íons precursores e produto, e energias de colisão (EC) utilizados.

(continuação)

Nº	Analito	t <sub>R</sub> (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)
40	Espinosade A	7.04	47	732,6	98,1	59	142	31
41	Espinosade D	7.26	42	746,5	98,1	53	142	31
42	Espirodiclofeno	7.93	22	411,1	71,2	13	313	13
43	Espiromesifeno	7.78	35	371,1	273,1	25	255,1	5
44	Etefon	7.27	25	409	186	40	145	16
45	Etofenproxi	8.40	17	394,3	106,9	43	177	15
46	Famoxadona	6.98	12	392,2	238	20	331,1	10
47	Fenpiroximato	7.89	23	422,2	138,1	32	336,1	15
48	Fempropimorfe	6.00	41	304,2	147,1	28	57,2	30
49	Fenamidona	6.15	22	312,1	236,1	14	92	25
50	Fenamifós	6.72	27	304,1	202,1	36	217,1	24
51	Fenarimol	6.56	17	331	81	34	268	22
52	Fentiona	6.90	25	279,1	169,1	16	247,1	13
53	Fipronil	6.77	25	435,3	250,1	26	330,2	16
54	Fluopicolida	6.30	40	383	365	15	172,9	20
55	Flupiradifurona	3.72	30	289	126,1	44	90	30
56	Fluquiconazol	6.46	37	376	348,8	18	306,9	30
57	Flutolanil	6.27	23	324,1	65	40	262,1	18
58	Flutriafol	5.56	23	302,1	123,1	29	70,2	18
59	Fluxaproxade	6.30	44	380	248	21	131	24
60	Formetanato	1.91	21	222	165	15	42	26
61	Fostiazato	5.33	19	284	228	10	104	22
62	Hexitiazoxi	7.72	21	353	168,1	26	228,1	14
63	Imazali	5.45	31	297	69	22	159	22
64	Imidacloprido	3.33	23	256,1	175,1	20	209,1	15
65	Indoxicarbe	7.24	25	528	150	22	203	40
66	Iprovalicarbe	6.46	19	321,1	203,1	10	119,1	16
67	Linuron	6.07	25	249,1	181,1	16	160,1	18
68	Malationa	6.27	12	331	99	24	127	12
69	Mandipropamida	6.20	16	412	328	16	125	34
70	Mecarban	6.54	12	330	97	35	227,1	8
71	Mepronil	6.29	27	270,1	91	44	119	28
72	Metalaxil	5.62	15	280,1	192,1	17	220,1	13
73	Metconazol	7.08	29	320,1	125	36	70	22
74	Metiocarbe	6.15	19	226	121	22	169	10
75	Metomil	2.65	17	163	106	10	88	10
76	Metsulfuron metílico	4.88	22	382	198,9	22	167	16
77	Monocrotofós	2.97	15	224,1	98,1	12	127,1	16
78	Monolinuron	5.24	23	215	99	34	126	22

Tabela 11 - Compostos determinados por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos tempos de retenção (t<sub>R</sub>), voltagem do cone (VC), íons precursores e produto, e energias de colisão (EC) utilizados.

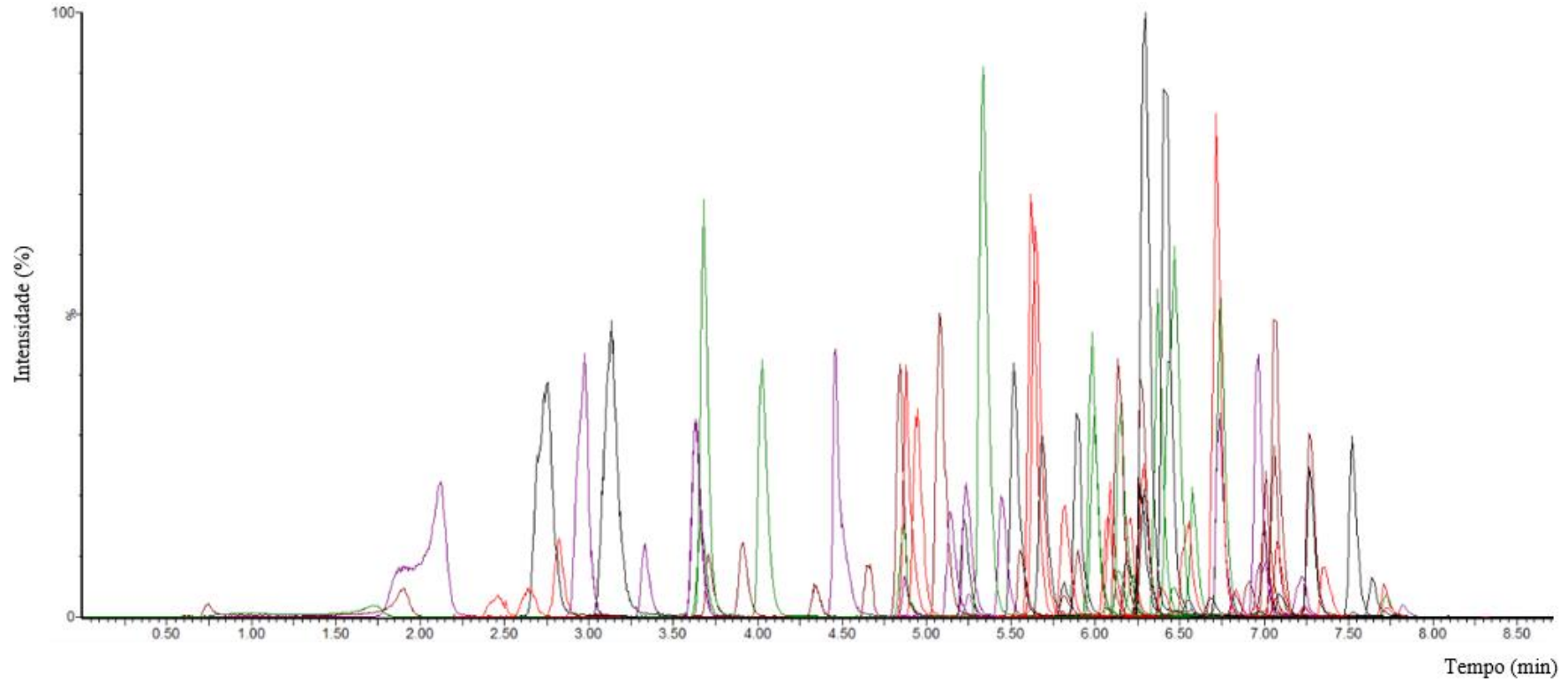
(conclusão)

Nº	Analito	t <sub>R</sub> (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)
79	Novalurom	7.34	27	493	158	19	141	35
80	Oxamil	2.46	12	237	90	10	72	10
81	Picoxistrobina	6.75	10	368	205,1	10	145,1	22
82	Piraclostrobina	7.02	20	388,1	193,9	12	163	25
83	Pirazofós	7.05	33	374	194	32	222,1	22
84	Piridabem	8.08	19	365,1	309,1	12	147,1	24
85	Piridafentona	6.38	31	341	92	34	189	22
86	Pirimetanil	5.83	42	200	107	24	82	24
87	Pirimicarbe	4.49	25	239,1	182,1	15	72	18
88	Pirimifós metílico	7.06	25	306,1	108,1	32	164,1	22
89	Piriproxifeno	7.66	23	322,1	227,1	14	96	14
90	Propamocarbe	2.12	22	189,1	144	12	102	17
91	Propargito	7.82	15	368	231	15	175	15
92	Propiconazol	6.98	37	342	69	22	159	34
93	Propoxur	4.88	12	210	168	10	111	16
94	Quinoxifeno	7.71	52	308	161,9	44	197	32
95	Saflufenacil	5.89	30	501,1	349	30	198	49
96	Simazina	4.87	34	202	96	22	124	16
97	Tebufenozida	6.73	12	353,1	297,1	8	133	20
98	Teflubezurom	7.66	17	380,9	158	20	140,9	40
99	Terbufós	7.54	12	289	57,2	2	103	8
100	Terbutilazina	6.15	28	230	96	28	174	16
101	Tiabendazol	3.14	42	202	131	30	175	25
102	Tiacloprido	4.02	32	253	90,1	40	126	20
103	Tiametoxam	2.81	19	292	132	22	211,2	12
104	Tiodicarbe	5.22	17	355	107,9	16	87,9	16
105	Tiofanato-metílico	4.84	23	343,1	311,1	11	151	21
106	Tolclofós-metílico	7.09	30	301,1	174,9	29	125	17
107	Triadimenol	6.49	12	296,1	99,1	15	70,2	10
108	Triazofós	6.41	22	314,1	118,9	18	161,9	35
109	Trifloxistrobina	7.27	25	409	145	40	186	16
110	Triflumurom	7.07	23	359	139,1	35	156,1	16
111	Vamidotiona	3.64	17	288	148	10	188	28
112	Zoxamida	7.00	30	336	187,1	25	159	40
113	Atrazina-d5 (PC)	5.49	26	221	101	23	179	18
114	Trifenilfosfato (PI)	6.96	40	327,2	315,2	28	152,1	37

Fonte: o autor, (2022).

Na Figura 5 está disposto um cromatograma de íons totais (TIC, do inglês *Total Ion Chromatogram*) obtido por UHPLC-MS/MS a partir de soluções de mistura de compostos preparadas no extrato da matriz de abobrinha na concentração de 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Figura 5 – Cromatograma de íons totais obtido por UHPLC-MS/MS a partir de uma amostra branco de abobrinha fortificada no nível  $25 \mu\text{g kg}^{-1}$

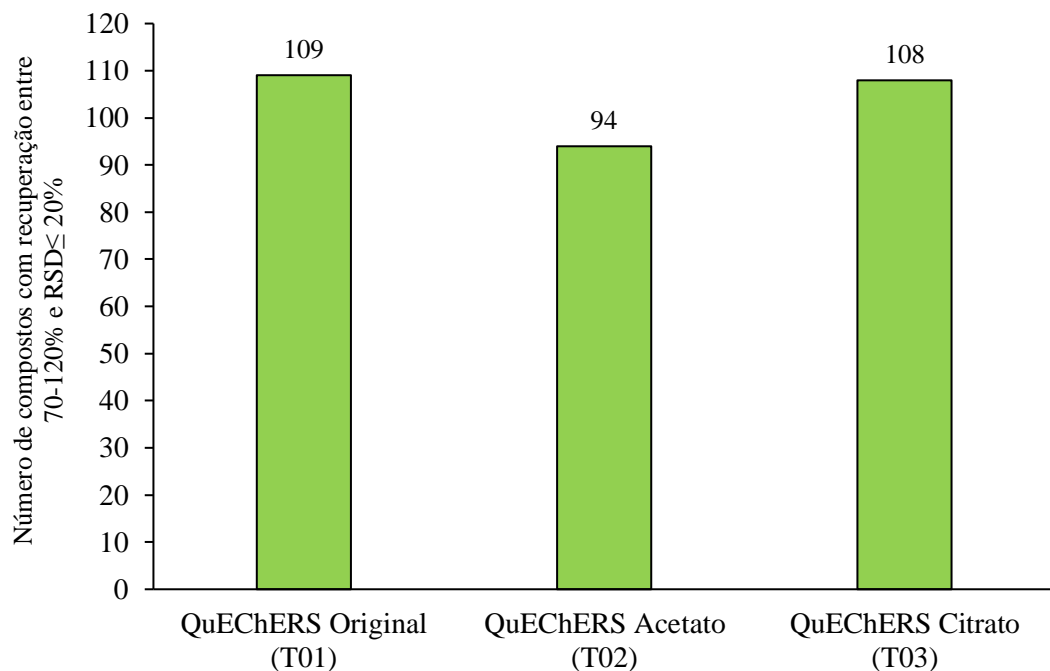


### 4.3 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABOBRINHA

#### 4.3.1 Avaliação da etapa de extração

A fim de avaliar a eficiência na etapa de extração e partição, as três versões do método QuEChERS (original, acetato e citrato) foram inicialmente avaliadas como demonstrado no Quadro 1 no item 3.8. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 6.

Figura 6 – Número de compostos que apresentaram recuperações entre 70-120% e RSD  $\leq$  20% nas versões QuEChERS avaliadas



Fonte: Arquivo pessoal, (2022).

Os testes que obtiveram maior número de compostos recuperados na faixa de 70-120% e RSD  $\leq$  20% foram os testes T01 e T03 com recuperações de 109 e 108 agrotóxicos, respectivamente. No teste T02, o número de compostos recuperados foi de 94 agrotóxicos. Os compostos que não recuperaram no QuEChERS original foram: acibenzolar-S-metílico, diafentiuron e metsulfurom-metílico. Para o QuEChERS citrato, os mesmos compostos não foram recuperados com a adição do clorimurmetílico. Na literatura, os métodos QuEChERS original e acetato destacam-se como aqueles mais empregados na determinação multirresíduo de agrotóxicos em abobrinha e em matrizes de composição semelhante, como observado nos trabalhos

de Jallow e colaboradores (2017) e Al-Nasir e colaboradores (2020). Ambos os trabalhos utilizaram QuEChERS original para a determinação de 34 agrotóxicos e 304 agrotóxicos, respectivamente. Camino-Sanchez e colaboradores (2011) e Oliva e colaboradores (2017) fizeram uso do QuEChERS citrato para determinação de 121 agrotóxicos e 6 agrotóxicos, respectivamente, em matriz abobrinha e matrizes semelhantes. Isso fundamenta os resultados encontrados nos testes T01 e T03, demonstrando alinhamento dos resultados encontrados no estudo e os observados na literatura.

Uma outra avaliação foi realizada nesta etapa, observando o efeito matriz dos testes T01, T02 e T03 para auxiliar na escolha entre as versões do método QuEChERS. A Tabela 12 apresenta a comparação do efeito matriz dos 112 agrotóxicos do estudo nas três versões analisadas do método QuEChERS.

Tabela 12 - Comparação do efeito matriz (%), por faixa percentual e calculado para todos os agrotóxicos avaliados, nas versões do método QuEChERS

<b>Efeito Matriz</b>	<b>QuEChERS original (T01) (nº de agrotóxicos)</b>	<b>QuEChERS acetato (T02) (nº de agrotóxicos)</b>	<b>QuEChERS citrato (T03) (nº de agrotóxicos)</b>
Leve ( $\pm 0-20\%$ )	68	69	70
Médio ( $\pm 20- 50\%$ )	24	23	23
Forte ( $> \pm 50\%$ )	20	20	19

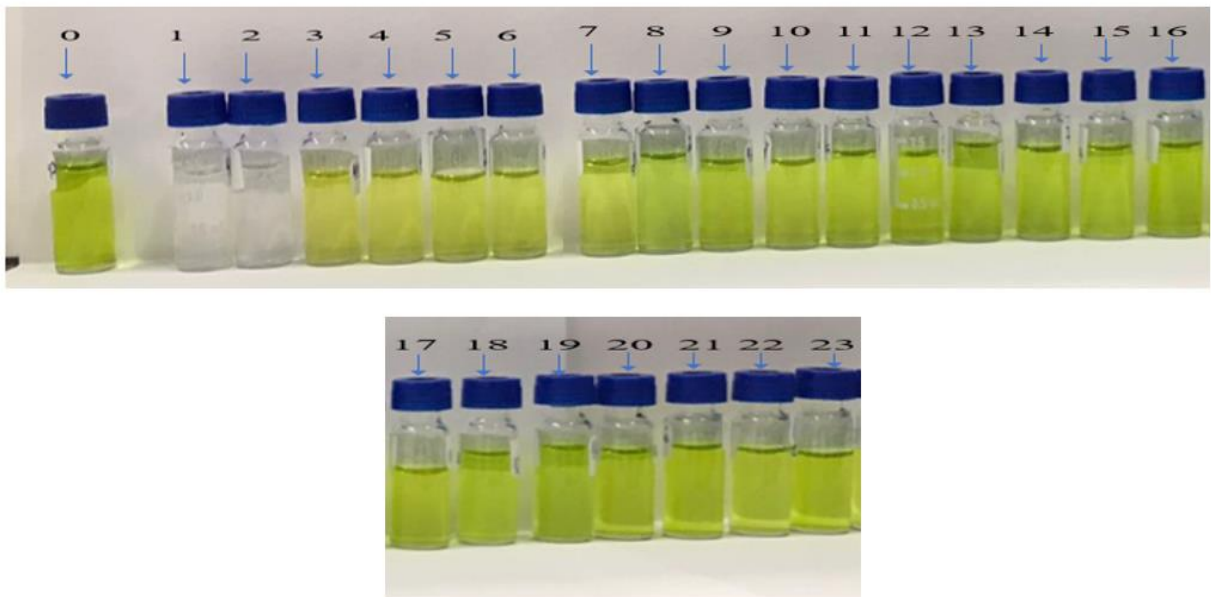
Fonte: Arquivo pessoal, (2022).

Através dos resultados apresentados na Tabela 12, é possível observar que não há muitas diferenças entre as versões do método QuEChERS quando comparados entre si. Tendo em vista que os testes T01 e T03 foram os que melhor obtiveram valores de recuperação dos compostos, e o efeito matriz leve para ambos foi de aproximadamente 60% dos agrotóxicos em estudo, optou-se pela escolha do método QuEChERS original (T01) para ser utilizado nas próximas etapas deste trabalho. Esse método não possui tamponamento quando comparado com os demais (T02 e T03), além de ter apresentado resultados satisfatórios para um número alto de compostos (109 compostos). É um método simples e que utiliza menos quantidade de reagentes quando comparado com as outras duas versões e consequentemente torna-se mais econômico, rápido e gera menos resíduos.

### 4.3.2 Avaliação da etapa de limpeza

Após a avaliação da etapa de extração e a escolha da versão QuEChERS (original), diferentes sorventes na etapa de limpeza por d-SPE foram testadas (T04). Os 23 tipos de sorventes com proporções definidas apresentados na Tabela 9 do item 3.8 foram avaliados visualmente. A Figura 7 demonstra a limpeza dos extratos proporcionada pelos diferentes sorventes testados.

Figura 7 – Representação visual dos extratos após a utilização dos sorventes

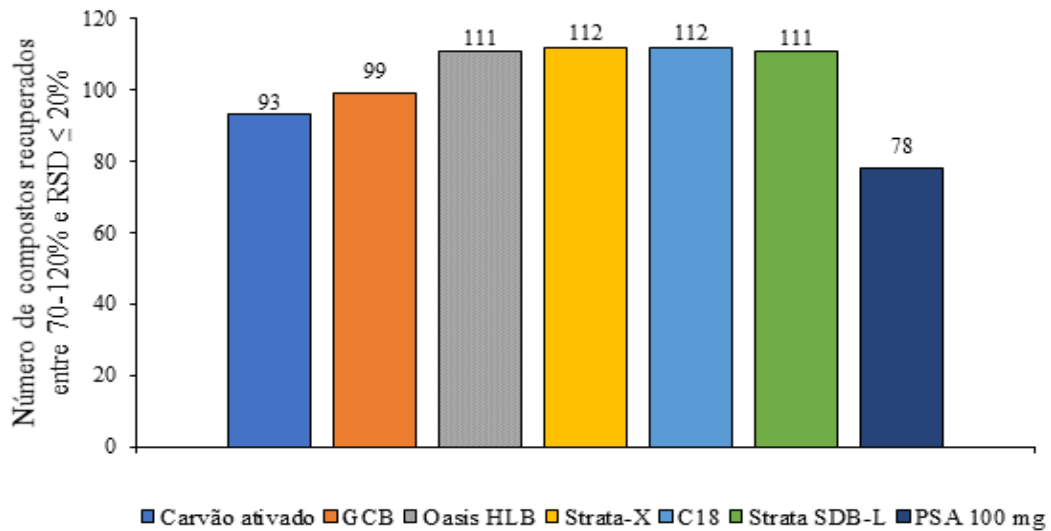


Fonte: Arquivo pessoal, (2022).

Como pode ser visto na Figura 7, é possível verificar que não existem muitas diferenças no aspecto visual entre o extrato sem a etapa de limpeza (vial de nº 0) com os vials contendo extratos após limpeza por d-SPE (1 a 23), exceto para os extratos com limpeza com carvão ativado (vial 1) e GCB (vial 2).

Com isso, escolhidos os sorventes empregados na limpeza dos extratos de 1 a 7 da Figura 7 (carvão ativado, GCB, Oasis HLB, Strata-X, C18, Strata SDB-L e PSA), baseado na análise visual, os ensaios de fortificação ( $n=3$ ) no nível de concentração  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  geraram resultados de recuperação e de efeito matriz para cada sorvente avaliado e estão apresentados na Figura 8 e Tabela 13, respectivamente. A fortificação dos extratos foi realizada diretamente no extrato após a etapa de partição para avaliar-se a eficiência dos sorventes. Os critérios de aceitação para a recuperação dos compostos foram de 70-120% e  $\text{RSD} \leq 20\%$ .

Figura 8 – Número de compostos que apresentaram recuperações entre 70-120% e RSD ≤ 20% nos testes de limpeza do método QuEChERS original



Fonte: Arquivo pessoal, (2022).

Tabela 13 – Efeito matriz dos compostos avaliados para cada sorvente

Efeito matriz dos compostos avaliados no estudo para cada sorvente							
	Carvão ativado	GCB	Oasis HLB	Strata- X	C18	Strata SDB-L	PSA 100 mg
<b>Leve</b>	96	94	91	87	89	86	95
<b>Médio</b>	7	8	8	9	11	11	7
<b>Alto</b>	9	10	3	16	12	15	10

Fonte: Arquivo pessoal, (2022).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 8 e Tabela 13, pode-se observar que não houveram muitas variações na recuperação dos compostos e o efeito matriz quando comparados entre si, com exceção dos testes com PSA, GCB e carvão ativado em termos de recuperação. Segundo Prestes e colaboradores (2009), a utilização do sorvente PSA na etapa de limpeza é muito eficiente na remoção de ácidos graxos e outros ácidos orgânicos, no entanto, é ineficiente na remoção de clorofila e esteróis de extratos vegetais. Além disso, o poder de retenção desse sorvente pode também ter atuado nos compostos de interesse, principalmente os polares, o que explicaria a perda de uma quantidade significativa no número de compostos como demonstrado na Figura 8. O carvão ativado e o GCB são excelentes



sorventes para remoção de clorofila e esteróis vegetais como evidenciado pela Figura 7. Entretanto, esses sorventes possuem características de forte retenção de agrotóxicos com estruturas planares como tiabendazol e terbufós, causando um efeito significativo na recuperação desses compostos (PRESTES *et al.*, 2009). No presente trabalho também observou-se valores de recuperação abaixo dos satisfatórios para esses compostos.

Segundo Cizmic e colaboradores (2017), os sorventes poliméricos como Strata-X, Strata SDB-L e Oasis HLB apresentam semelhanças em suas estruturas. Esses sorventes poliméricos são indicados para aplicação na extração de compostos ácidos, básicos e neutros de média a alta polaridade, logo tais sorventes possuem uma boa retenção de interferentes para uma gama de compostos. Neste trabalho foi observado que a recuperação dos compostos em estudo apresentou ótimos resultados de recuperação, conforme demonstrado na Figura 8.

De acordo com Prestes e colaboradores (2011), o C18 é frequentemente usado em combinação com PSA para matrizes com grande teor de gordura. Ele também é utilizado na determinação de fármacos e agrotóxicos em água, pois compostos com log Kow maior que 1, ou seja, compostos mais apolares, ele tem se mostrado eficaz quanto a recuperação (ČIZMIĆ; BABIĆ; KAŠTELAN-MACAN, 2017; DE OLIVEIRA *et al.*, 2019). Vale ressaltar que aproximadamente 90% dos compostos em estudo neste trabalho possuem log Kow maior que 1, o que pode justificar a boa recuperação dos compostos quando esse sorvente é empregado. Lehotay (2011), afirma que diferentes estudos demonstraram que a inclusão do C18 na etapa de limpeza das três versões do QuEChERS não possui efeito prejudicial na recuperação dos compostos, somente auxilia no desempenho da limpeza por d-SPE.

Embora alguns sorventes tenham apresentado bons resultados, como os sorventes poliméricos e o C18, existem algumas desvantagens da etapa de limpeza do extrato, como o custo elevado de sorventes, maior tempo de preparo de amostra e seletividade por alguns analitos. Dessa forma, a etapa de limpeza deve ser investigada e avaliada a fim de justificar ou não a exclusão desta quando possível, durante o desenvolvimento de um método. A exaustiva limpeza de amostra pode em um primeiro momento ajudar na remoção de interferentes, porém este processo é tedioso e possui risco de perda de analitos (YANG *et al.*, 2015).

Segundo Greer e colaboradores (2021), embora o método QuEChERS ao longo dos anos tenha evoluído muito com diferentes propostas de utilização de

sorventes na etapa de limpeza, verifica-se que há um limite para a aplicação dos sorventes tendo em vista o número de diferentes classes de compostos existentes.

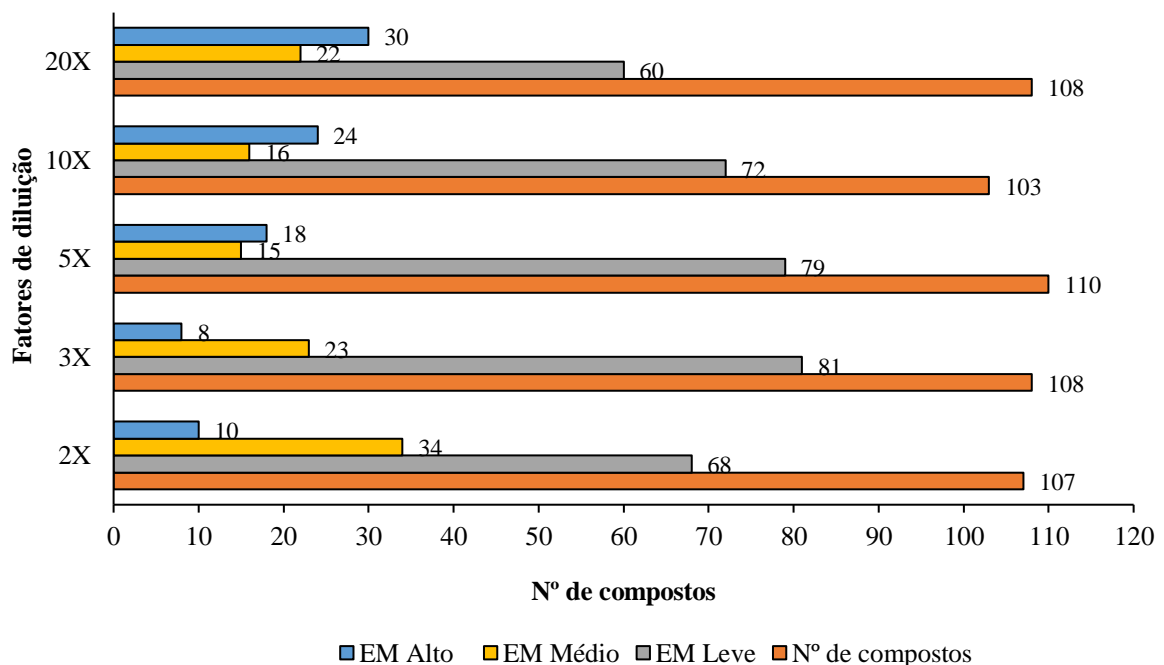
#### 4.3.3 Avaliação das diluições do extrato

Embora os sorventes poliméricos e o C18 tenham proporcionado os melhores resultados em termos de recuperação dos compostos quando comparados com os demais sorventes, visualmente esses sorventes não possibilitaram uma limpeza eficaz do extrato e como anteriormente comentado, as desvantagens da utilização de sorventes devem ser investigadas quando possível.

Algumas técnicas têm sido desenvolvidas nos últimos anos servindo como alternativa para superar o alto custo dos sorventes empregados no d-SPE. A técnica denominada *Dilute and Shoot*, ou seja, diluição seguida de injeção direta foi avaliada verificando a diferença dos diferentes fatores de diluição do extrato em água ultrapura (teste T06) sem o emprego de sorventes.

Os resultados de recuperação dos compostos e o efeito matriz para os diferentes fatores de diluição estão apresentados na Figura 9.

Figura 9 – Teste T06 para avaliação de recuperação e efeito matriz dos compostos em diferentes fatores de diluição.



Fonte: Arquivo pessoal, (2022).

O fator de diluição que obteve resultados satisfatórios quanto ao número de compostos recuperados foi o de 5x, uma vez que nesse fator houve a recuperação de

110 compostos conforme critérios de aceitação estabelecidos. Os resultados de efeito matriz auxiliaram como um segundo fator de análise. Neste fator de diluição (5x), 79 compostos obtiveram efeito matriz leve, perdendo apenas para o teste de diluição de 3x, o qual apresentou 81 compostos com efeito matriz leve.

Dessa forma, o fator de diluição de 5x foi considerado o melhor teste avaliado. Em seguida, comparou-se com o sorvente C18, que dentre os sorventes foi o que melhor obteve resultados de recuperação quando estreitadas as faixas de recuperação para 80-110%. Assim, realizou-se uma avaliação entre os testes T05 e T06, ou seja, verificando os resultados empregando C18 como sorvente de limpeza e os resultados quando a diluição 5x sem a etapa de limpeza foi usada, respectivamente. O Quadro 2 apresenta um comparativo entre os resultados obtidos.

Quadro 2 - Comparativo dos resultados entre a utilização de C18 e sem limpeza

<b>Parâmetros</b>	<b>C18</b>	<b>Sem Limpeza</b>
<b>Número de compostos recuperados 70-120% e RSD ≤ 20%</b>	112	110
<b>Somatório do Efeito Matriz médio e alto (%)</b>	23	33

Fonte: o autor, (2022).

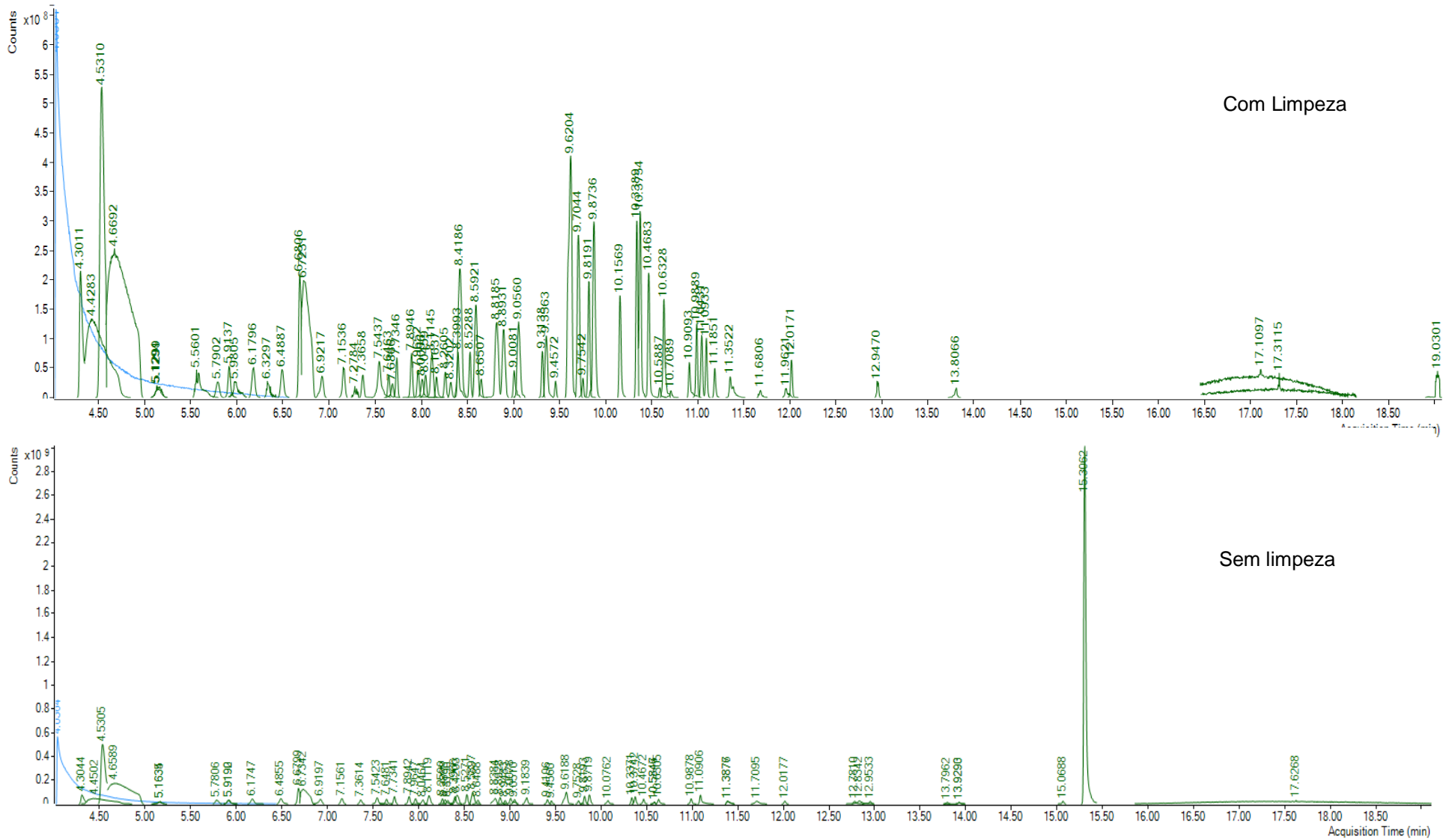
Embora a utilização do C18 como sorvente de limpeza tenha possibilitado a recuperação de todos os 112 compostos em estudo em comparação com os 110 compostos recuperados sem a etapa de limpeza, e os valores de efeito matriz foram moderadamente superiores, optou-se por utilizar o método sem a etapa de limpeza. Os dois compostos não recuperados no teste sem limpeza foram diafentiurum e fipronil, compostos esses que não são autorizados para a cultura de abobrinha no Brasil, não afetando assim o objetivo principal de monitorar os compostos que são permitidos para essa cultura. Em relação ao efeito matriz, embora a limpeza do extrato com emprego de C18 tenha demonstrado valores sucintamente melhores que à não utilização do sorvente, o entendimento dos efeitos de matriz sobre os compostos ainda não é muito conhecido, além de ser inerente à composição de cada matriz. Segundo Yang e colaboradores (2015) os efeitos de matriz são comumente observados como supressão ou aprimoramento do sinal do analito na fonte ESI e têm sido estudados por muitos pesquisadores desde meados da década de 1990. No entanto, a maioria

dos estudos foram focados na supressão do ESI ao invés de seu aprimoramento para minimizar o efeito de matriz.

#### **4.3.4 Avaliação qualitativa da limpeza e filtração dos extratos**

A fim de investigar a presença de coextrativos no extrato, avaliou-se a limpeza por d-SPE utilizando sorvente C18 seguido de diluição 5x em acetonitrila e sem emprego de limpeza, ou seja, diluindo o extrato 5x em acetonitrila após a etapa de partição. Não realizou-se fortificação da amostra para esse teste. O teste de caráter qualitativo foi denominado T07. A Figura 10 mostra a presença de coextrativos da avaliação da utilização do C18 como sorvente de limpeza em comparação com a diluição direta do extrato sem a etapa de limpeza, após injeção em modo de varredura em GC-MS/MS.

Figura 10 – Cromatogramas GC-MS/MS no modo full scan dos extratos de amostra branco de abobrinha dos testes com limpeza e sem limpeza do extrato

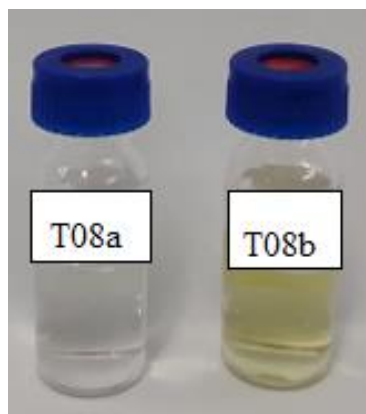


É possível observar que não há muita diferença em relação à intensidade da presença de coextrativos na amostra entre os testes avaliados. Isso pode ser explicado pela questão de que uma vez que a matriz de abobrinha possui em sua composição centesimal mais de 90% de água, os demais constituintes como açúcares, proteínas, lipídios, ácidos entre outros estarão em quantidades muito baixas, ou seja, a concentração deles não provocam alto efeito matriz. Sendo assim, pode-se dizer que a abobrinha possui baixa complexidade em relação à presença de coextrativos. Embora a presença de pigmentos como a clorofila seja algo característico para essa matriz, a presença desse pigmento não interfere diretamente na análise cromatográfica, mas é um problema pela sujidade causada ao insersor do equipamento (PRESTES *et al.*, 2009).

Dessa maneira, a diluição do extrato em água ultrapura utilizando o fator de 5x após a etapa de partição sem o emprego de uma etapa de limpeza apresentou resultados satisfatórios e possui alguns benefícios em comparação ao emprego de solventes na etapa de limpeza, como a eliminação de uma etapa no preparo de amostra, rapidez, baixo custo e menos resíduos gerados.

A diluição seguida de injeção elimina demorados e caros procedimentos de extração e, portanto, pode ser considerado como uma metodologia independente, na qual a diluição é a única etapa de limpeza usada antes da análise da amostra. Para amostras, como a abobrinha, que necessitam de uma etapa prévia de particionamento, o efeito *salting-out* dos sais propicia a etapa de precipitação dos analitos para a fase orgânica e é considerado um processo de limpeza (GREER *et al.*, 2021). Além disso, realizou-se um teste de filtração do extrato após a diluição para investigar se os pigmentos ficariam retidos no filtro e assim, melhorar a limpeza do extrato. Esse teste foi denominado T08a para a filtração do extrato após a diluição de 5x (1:4, v/v) em água ultrapura e T08b para a filtração do extrato antes da diluição de 5x em água ultrapura. A Figura 11 apresenta os extratos finais.

Figura 11 – Representação visual do extrato filtrado após a diluição (T08a) e o extrato filtrado antes da diluição (T08b)



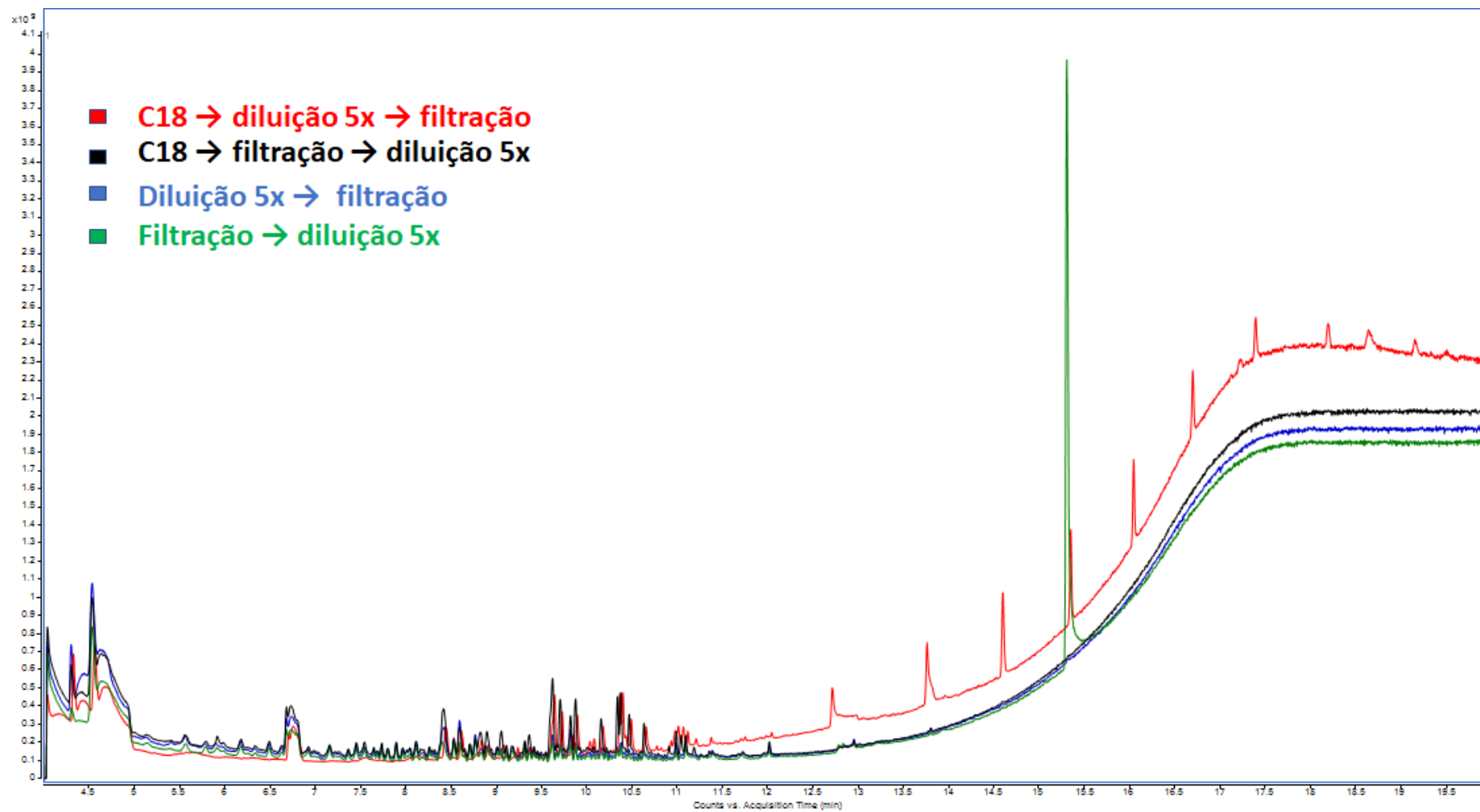
Fonte: Arquivo pessoal, (2022).

É perceptível que o teste T08a (filtração do extrato após a diluição) fez com que o extrato perdesse toda sua coloração característica, ou seja, ficou transparente, minimizando a presença de coextrativos. O filtro de membrana de nylon hidrofílico utilizado na filtração pode explicar a absorção/retenção dos pigmentos de clorofila presentes no extrato da amostra. Os pigmentos são degradados por enzimas clorofilases presentes nos vegetais, formando a clorofilida, verde, solúvel em água. Assim, o poder hidrofílico do filtro possivelmente atuou na retenção desse pigmento, uma vez que a proporção de água:extrato é 4 vezes maior. Já no teste T08b, onde a filtração é realizada com o mesmo tipo de filtro, porém antes da diluição em água, o filtro não foi capaz de reter toda a coloração dos pigmentos presentes no extrato puro da amostra. A filtração do extrato após a diluição (T08a), assim como antes da diluição (T08b), não alterou os resultados de recuperação e efeito matriz.

Em conjunto, na Figura 12 pode-se observar o comparativo entre os extratos com limpeza e sem limpeza com a filtração realizada antes e depois da diluição, extratos contendo etapa de limpeza com C18 antes e após a filtração.

Dessa maneira, a diluição (1:4, v/v) em água ultrapura do extrato de abobrinha sem a etapa de limpeza seguido por filtração pode ser considerada eficiente, simples, rápida e de baixo custo quando comparada com métodos que exijam etapa de limpeza do extrato com sorventes por d-SPE. Logo, a partir dos resultados dos testes realizados, validou-se o método de extração para a determinação de agrotóxicos em abobrinha, o qual consistiu na extração empregando QuEChERS original, onde o extrato após a etapa de partição foi diretamente diluído 5 vezes em água ultrapura e filtrado em filtro de seringa e submetido à injeção no sistema UHPLC-MS/MS.

Figura 12 - Cromatogramas no modo full scan injetados no sistema GC-MS/MS Intuvo 9000 para os testes com limpeza e sem limpeza do extrato com filtração realizada antes e depois da diluição

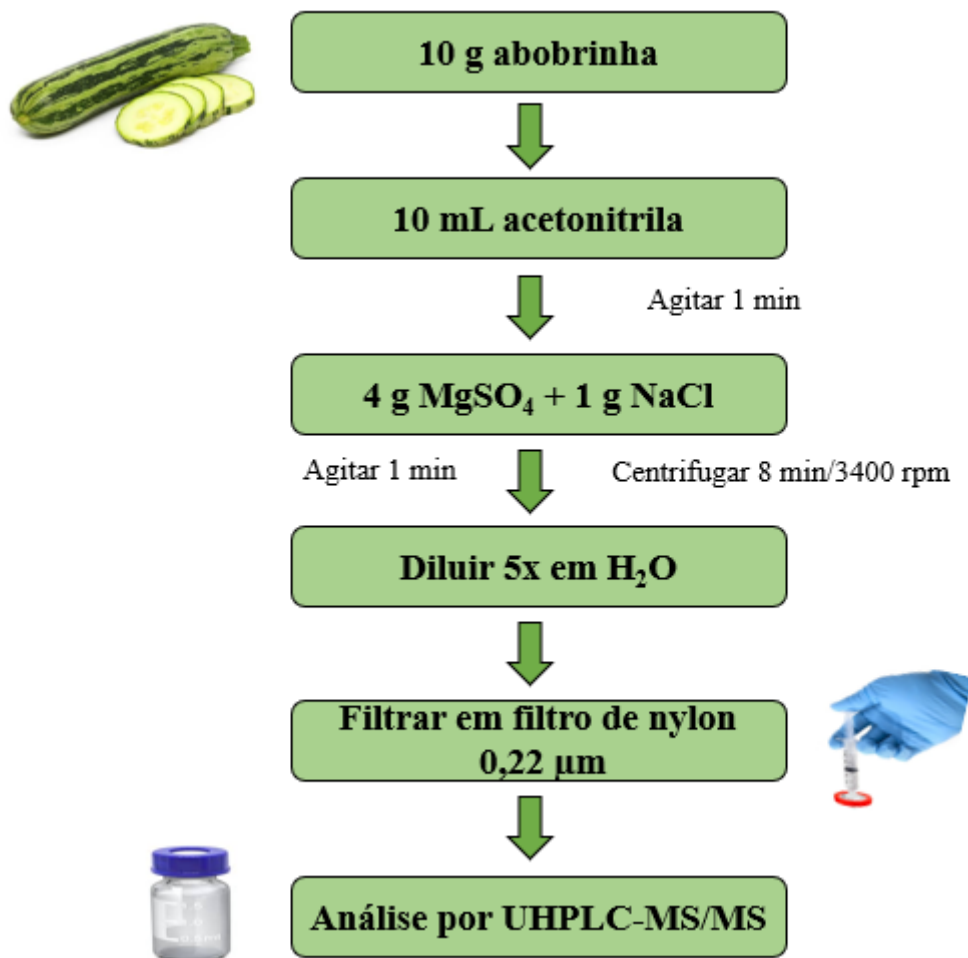




#### 4.3.5 Método de extração para a determinação de resíduos de agrotóxicos em abobrinha

A Figura 13 apresenta o fluxograma do método QuEChERS aplicado na extração de agrotóxicos nas amostras de abobrinha.

Figura 13 - Representação do método QuEChERS modificado proposto para extração de agrotóxicos em abobrinha



Fonte: o autor (2022).

#### 4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS

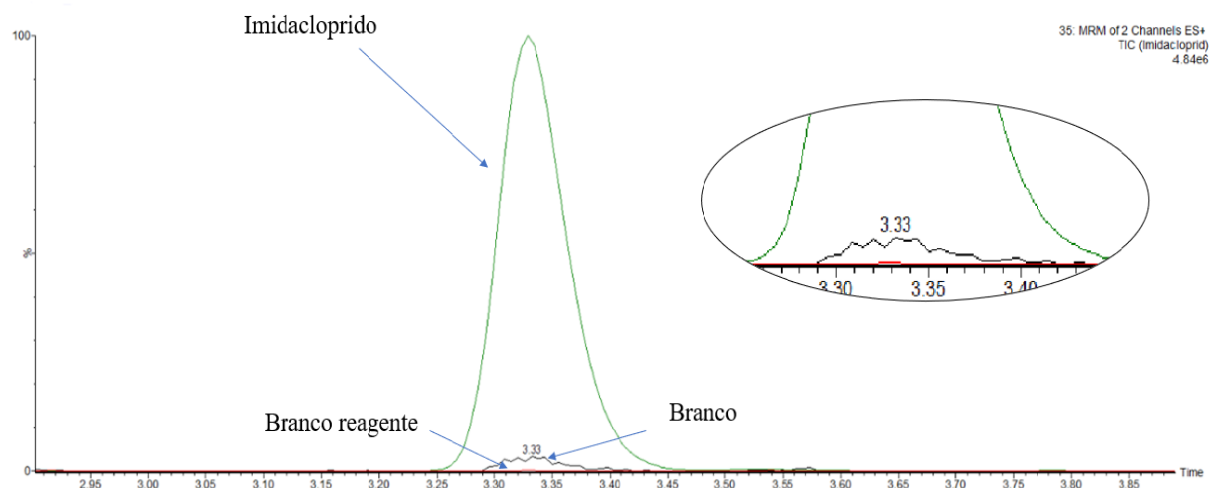
O método QuEChERS modificado proposto por este trabalho para determinação de agrotóxicos em abobrinha foi validado conforme parâmetros do INMETRO e SANTE. São eles: seletividade, curva analítica e linearidade, efeito matriz, exatidão (recuperação), precisão (repetibilidade), limite de detecção e limite de quantificação.

#### 4.4.1 Seletividade

A seletividade do método foi assegurada por meio da comparação dos cromatogramas adquiridos pela injeção no sistema UHPLC-MS/MS do extrato branco da matriz abobrinha e o extrato branco da matriz abobrinha fortificada na concentração  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Por meio desta avaliação é possível inferir que não há presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos. A amostra branco de abobrinha aplicada ao estudo, portanto, se apresentou isenta de contaminação de agrotóxicos.

Na Figura 14, tem-se os cromatogramas adquiridos pelo sistema UHPLC-MS/MS, do extrato branco de abobrinha, branco reagente e do branco fortificado na concentração de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  do analito imidacloprido.

Figura 14 - Cromatograma representativo obtido no modo SRM por UHPLC-MS/MS para o branco, branco reagente e o composto imidacloprido ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ )



Fonte: o autor (2022).

#### 4.4.2 Curva analítica e linearidade

A linearidade de cada analito foi determinada através das injeções em triplicata das soluções analíticas preparadas em solvente acetonitrila e nos extratos branco da matriz abobrinha nas concentrações 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 e  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ .

A Tabela 14 apresenta o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) para as curvas analíticas em solvente acetonitrila e na matriz branco de abobrinha, bem como a faixa linear de trabalho para cada analito no extrato branco da matriz abobrinha.

A partir dos resultados dos coeficientes de determinação ( $r^2$ ) para cada analito, tem-se por conclusão que os compostos estudados apresentam linearidade satisfatória e adequada, sendo maior ou igual que 0,99.

Tabela 14 – Curvas analíticas no solvente e na matriz branco de abobrinha e coeficientes de determinação e valores de faixa linear

(continua)

Analitos	Faixa linear de trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Curva analítica	
		Solvente $r^2$	Matriz $r^2$
1 Acefato	0,5-50	0,9997	0,9999
2 Acetamiprido	0,5-20	0,9992	0,9986
3 Acibenzolar-S-metílico	0,5-50	0,9999	0,9998
4 Aldicarbe	0,5-50	0,9997	0,9999
5 Ametrina	0,5-50	0,9997	0,9987
6 Atrazina	0,5-50	0,9995	0,9998
7 Azinfós-metílico	0,5-50	0,9987	0,9996
8 Azoxistrobina	0,5-50	0,9999	0,9999
9 Bitertanol	0,5-20	0,9963	0,9982
10 Boscalida	0,5-50	0,9964	0,9990
11 Bromoconazol	0,5-20	0,9915	0,9985
12 Buprofezina	0,5-20	0,9995	0,9991
13 Carbaril	0,5-50	0,9998	0,9999
14 Carbendazim	0,5-50	0,9994	0,9999
15 Carbofurano	0,5-20	0,9995	0,9998
16 Carbofurano-3-hidroxi	0,5-20	0,9991	0,9993
17 Carboxina	0,5-20	0,9990	0,9994
18 Ciantranilprole	0,5-50	0,9999	0,9998
19 Cinazina	0,5-50	0,9999	0,9998
20 Cimoxanil	0,5-50	0,9999	0,9999
21 Ciprodinil	0,5-10	0,9964	0,9999
22 Cletodim	0,5-50	0,9997	0,9999
23 Clomazone	0,5-50	0,9998	0,9998
24 Clorantraniprole	0,5-20	0,9982	0,9991
25 Clorimuron etílico	0,5-20	0,9944	0,9983
26 Clorpirifós	0,5-20	0,9999	0,9990
27 Cresoxim-metílico	0,5-20	0,9998	0,9996
28 Diazinona	0,5-20	0,9999	0,9998
29 Difenconazol	0,5-50	0,9996	0,9991
30 Dimetoato	0,5-10	0,9959	0,9990
31 Dimetomorfe	0,5-20	0,9994	0,9997
32 Diurom	0,5-20	0,9983	0,9997
33 Epoxiconazol	0,5-50	0,9999	0,9999
34 Espinetoram	0,5-20	0,9976	0,9996
35 Espinosade A	0,5-20	0,9957	0,9996
36 Espinosade D	0,5-10	0,9959	0,9932
37 Espiromesifeno	0,5-20	0,9942	0,9991
38 Etefon	0,5-50	0,9996	0,9999
39 Fempropimorfe	0,5-10	0,9998	0,9999
40 Fenamidona	0,5-50	0,9929	0,9991
41 Fenamifós	0,5-20	0,9963	0,9996

Tabela 14 - Curvas analíticas no solvente e na matriz branco de abobrinha e coeficientes de determinação e valores de faixa linear

(continuação)

Analitos	Faixa linear de trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Curva analítica	
		Solvente $r^2$	Matriz $r^2$
42 Fenarimol	0,5-50	0,9998	0,9988
43 Fentiona	0,5-50	0,9991	0,9999
44 Fipronil	0,5-20	0,9999	0,9950
45 Fluopicolida	0,5-20	0,9930	0,9994
46 Flupiradifurona	0,5-20	0,9976	0,9984
47 Fluquiconazol	0,5-20	0,9950	0,9982
48 Flutolanil	0,5-20	0,9987	0,9995
49 Flutriafol	0,5-20	0,9986	0,9997
50 Formetanato	0,5-50	0,9997	0,9999
51 Fostiazato	0,5-20	0,9999	0,9999
52 Hexitiazoxi	0,5-20	0,9993	0,9981
53 Imazali	0,5-50	0,9985	0,9999
54 Imidacloprido	0,5-50	0,9999	0,9999
55 Indoxicarbe	0,5-20	0,9989	0,9968
56 Iprovalicarbe	0,5-20	0,9945	0,9999
57 Linuron	0,5-50	0,9999	0,9999
58 Malationa	0,5-50	0,9997	0,9997
59 Mandipropamida	0,5-50	0,9971	0,9996
60 Mecarban	0,5-50	0,9993	0,9993
61 Mepronil	0,5-20	0,9999	0,9997
62 Metalaxil	0,5-20	0,9992	0,9993
63 Metconazol	0,5-20	0,9974	0,9998
64 Metiocarbe	0,5-50	0,9994	0,9952
65 Metomil	0,5-50	0,9999	0,9997
66 Metsulfuron metílico	0,5-20	0,9996	0,9998
67 Monocrotófos	0,5-50	0,9999	0,9999
68 Monolinuron	0,5-50	0,9999	0,9999
69 Oxamil	0,5-50	0,9997	0,9998
70 Picoxistrobina	0,5-50	0,9986	0,9998
71 Piraclostrobina	0,5-50	0,9989	0,9988
72 Pirazofós	0,5-50	0,9991	0,9995
73 Piridafentiona	0,5-50	0,9999	0,9994
74 Pirimetanil	0,5-50	0,9991	0,9999
75 Pirimicarbe	0,5-20	0,9963	0,9999
76 Pirimifós metílico	0,5-50	0,9999	0,9998
77 Piriproxifeno	0,5-10	0,9997	0,9981
78 Propamocarbe	0,5-50	0,9990	0,9999
79 Propargito	0,5-10	0,9999	0,9995
80 Propiconazol	0,5-50	0,9931	0,9997
81 Propoxur	0,5-50	0,9999	0,9996
82 Quinoxifeno	0,5-10	0,9998	0,9956
83 Saflufenacil	0,5-50	0,9998	0,9999
84 Simazina	0,5-20	0,9997	0,9995
85 Tebufenozida	0,5-20	0,9948	0,9983
86 Terbufós	0,5-20	0,9985	0,9991
87 Terbutilazina	0,5-50	0,9991	0,9998
88 Tiabendazol	0,5-50	0,9998	0,9999
89 Tiacloprido	0,5-50	0,9999	0,9999

Tabela 14 - Curvas analíticas no solvente e na matriz branco de abobrinha e coeficientes de determinação e valores de faixa linear

Analitos	Faixa linear de trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Curva analítica	
		Solvente $r^2$	Matriz $r^2$
90 Tiametoxam	0,5-20	0,9989	0,9997
91 Tiodicarbe	0,5-50	0,9996	0,9999
92 Tiofanato-metilico	0,5-50	0,9990	0,9994
93 Tolclofós-metilico	0,5-50	0,9999	0,9999
94 Triadimenol	0,5-10	0,9979	0,9994
95 Triazofós	0,5-20	0,9916	0,9999
96 Trifloxistrobina	0,5-20	0,9994	0,9995
97 Triflumurom	0,5-20	0,9920	0,9972
98 Vamidotiona	0,5-20	0,9987	0,9997
99 Zoxamida	0,5-20	0,9955	0,9989
Atrazina-d5 (PC)	0,5-50	0,9992	0,9997

Fonte: o autor (2022).

#### 4.4.3 Efeito matriz

Para avaliação do efeito de matriz foi aplicado o teste F (Fisher-Snedecor) e o teste t de Student (95% de confiança) para comparação das inclinações das curvas em solvente e em matriz, de acordo com as equações descritas no subitem 3.9.3. Calculou-se também, o valor absoluto de efeito matriz para cada analito conforme a Equação 1. Os resultados para a avaliação estatística do efeito matriz encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15 - Resultados dos testes F e t Student e valor do efeito matriz para os compostos validados

	Analito	F <sub>calc.</sub>	F <sub>crit.</sub>	t <sub>calc.</sub>	t <sub>crit.</sub>	EM
1	<b>Acefato</b>	1,2733	19,00	<b>0,4237</b>	2,7764	0
2	Acetamiprido	4,4192	19,00	67,3852	2,7764	-18
3	Acibenzolar-S-metilico	3,8378	19,00	11,4092	2,7764	-16
4	Aldicarbe	2,3605	19,00	9,5894	2,7764	29
5	<b>Ametrina</b>	4,6756	19,00	<b>1,8934</b>	2,7764	1
6	<b>Atrazina</b>	1,5446	19,00	<b>0,8918</b>	2,7764	-1
7	<b>Azinfós-metilico</b>	1,7729	19,00	<b>2,1776</b>	2,7764	16
8	Azoxistrobina	6,0354	19,00	4,7741	2,7764	-4
9	Bitertanol	2,5567	19,00	3,8967	2,7764	-10
10	Boscalida	8,9460	19,00	25,2815	2,7764	-31
11	<b>Bromoconazol</b>	36,5335	19,00	<b>3,4671</b>	4,3027	-18
12	Buprofezina	72,1014	19,00	16,3699	4,3027	-32
13	<b>Carbaril</b>	3,8751	19,00	<b>2,7689</b>	2,7764	5
14	Carbendazim	3,0108	19,00	3,3092	2,7764	-2
15	Carbofurano	1,9195	19,00	53,5008	2,7764	-38
16	Carbofurano-3-hidroxi	3,2803	19,00	12,7385	2,7764	-6
17	Carboxina	13,2134	19,00	5,3153	2,7764	-5
18	Ciantraniliprole	4,1172	19,00	25,6820	2,7764	15

(continua)

Tabela 15 - Resultados dos testes F e t Student e valor do efeito matriz para os compostos validados

(continuação)

	<b>Analito</b>	<b>F<sub>calc.</sub></b>	<b>F<sub>crit.</sub></b>	<b>t<sub>calc.</sub></b>	<b>t<sub>crit.</sub></b>	<b>EM</b>
19	Cinazina	2,1724	19,00	2,8887	2,7764	-2
20	Cimoxanil	4,2964	19,00	6,7570	2,7764	7
21	Ciprodinil	3,4175	19,00	25,5743	2,7764	-54
22	Cletodim	1,2474	19,00	15,2799	2,7764	-33
23	<b>Clomazone</b>	58,0634	19,00	<b>3,7922</b>	4,3027	-19
24	Clorantraniprole	13,5807	19,00	3,1008	2,7764	-6
25	Clorimuron etílico	251,9450	19,00	7,3679	4,3027	80
26	Clorpirifós	9,5839	19,00	51,8650	2,7764	-81
27	<b>Cresoxim-metílico</b>	3,0024	19,00	<b>1,3316</b>	2,7764	-5
28	Diazinona	2,7618	19,00	16,6083	2,7764	-27
29	Difenoconazol	5,5214	19,00	20,7358	2,7764	-27
30	Dimetoato	70,2033	19,00	17,0909	4,3027	-8
31	Dimetomorfe	2,7293	19,00	16,8870	2,7764	20
32	Diurom	2,1631	19,00	7,2835	2,7764	-7
33	Epoconazol	1,1608	19,00	4,3540	2,7764	-5
34	Espinetoram	1,7988	19,00	2,8158	2,7764	17
35	Espinosade A	3,0247	19,00	8,7796	2,7764	39
36	Espinosade D	1,6751	19,00	4,5348	2,7764	26
37	Espiromesifeno	3,4533	19,00	39,5421	2,7764	-80
38	Etefon	3,2022	19,00	24,0167	2,7764	-42
39	Fempropimorfe	2,5631	19,00	36,5106	2,7764	-47
40	Fenamidona	2,4081	19,00	4,4716	2,7764	-5
41	<b>Fenamifós</b>	38,0647	19,00	<b>0,8087</b>	4,3027	1
42	<b>Fenarimol</b>	6,2619	19,00	<b>0,1655</b>	2,7764	-1
43	Fentiona	6,0372	19,00	12,9758	2,7764	-26
44	<b>Fipronil</b>	5,3182	19,00	<b>1,3546</b>	2,7764	4
45	Fluopicolida	14,4394	19,00	18,9541	2,7764	-11
46	Flupiradifurona	1,5671	19,00	60,6793	2,7764	-28
47	Fluquiconazol	6,1525	19,00	6,2170	2,7764	-10
48	Flutolanil	11,7630	19,00	19,5825	2,7764	-15
49	Flutriafol	2,4023	19,00	9,7241	2,7764	16
50	Formetanato	7,9531	19,00	21,5251	2,7764	-31
51	Fostiazato	4,0164	19,00	10,3139	2,7764	-6
52	Hexitiazoxi	14,4179	19,00	73,8094	2,7764	-78
53	Imazali	1,0002	19,00	20,5814	2,7764	-26
54	Imidacloprido	1,9360	19,00	16,0333	2,7764	20
55	Indoxicarbe	1,6968	19,00	17,2932	2,7764	-40
56	Iprovalicarbe	12,3200	19,00	5,5479	2,7764	-6
57	Linuron	7,8954	19,00	53,5833	2,7764	-32
58	<b>Malationa</b>	16,7802	19,00	<b>0,5944</b>	2,7764	-4
59	Mandipropamida	1,3434	19,00	12,1332	2,7764	-22
60	Mecarban	1,0031	19,00	<b>0,3298</b>	2,7764	-3
61	Mepronil	2,9339	19,00	17,7721	2,7764	-10
62	Metalaxil	3,0964	19,00	12,9771	2,7764	10
63	Metconazol	1,4803	19,00	14,7783	2,7764	-20
64	<b>Metiocarbe</b>	43,3002	19,00	<b>2,4940</b>	4,3027	-14
65	<b>Metomil</b>	17,5154	19,00	<b>1,7590</b>	2,7764	3
66	Metsulfuron metílico	1,6907	19,00	22,3708	2,7764	-32
67	<b>Monocrotófos</b>	9,4288	19,00	<b>0,1820</b>	2,7764	0
68	<b>Monolinuron</b>	2,4171	19,00	<b>0,7365</b>	2,7764	1
69	Oxamil	16,9436	19,00	6,1111	2,7764	9
70	Picoxistrobina	2,1467	19,00	23,6378	2,7764	-14
71	Piraclostrobina	1,7377	19,00	45,0237	2,7764	-51
72	<b>Pirazofós</b>	2,4934	19,00	<b>2,5481</b>	2,7764	-5

Tabela 15 - Resultados dos testes F e t Student e valor do efeito matriz para os compostos validados

(conclusão)						
Analito	F <sub>calc.</sub>	F <sub>crit.</sub>	t <sub>calc.</sub>	t <sub>crit.</sub>	EM	
73	Piridafentona	10,6204	19,00	4,1066	2,7764	7
74	Pirimetaniil	10,6613	19,00	27,4571	2,7764	-19
75	Pirimicarbe	1,8109	19,00	87,6229	2,7764	-53
76	Pirimifós metílico	8,0040	19,00	16,1720	2,7764	-25
77	Piriproxifeno	9,5073	19,00	60,9105	2,7764	-82
78	<b>Propamocarbe</b>	28,0526	19,00	<b>2,4494</b>	4,3027	16
79	Propargito	7,1040	19,00	76,6125	2,7764	-88
80	Propiconazol	1,4931	19,00	14,5502	2,7764	-15
81	Propoxur	1,5600	19,00	8,4809	2,7764	5
82	Quinoxifeno	1,9184	19,00	63,5663	2,7764	-84
83	Saflufenacil	8,3013	19,00	18,3491	2,7764	44
84	Simazina	1,6048	19,00	9,3599	2,7764	-14
85	Tebufenozida	10,1852	19,00	14,4824	2,7764	-22
86	Terbufós	1,6212	19,00	20,8109	2,7764	-53
87	Terbutilazina	1,3556	19,00	32,4058	2,7764	-30
88	Tiabendazol	2,5789	19,00	27,9673	2,7764	-15
89	Tiacloprido	1,7923	19,00	16,2113	2,7764	6
90	Tiametoxam	2,2143	19,00	9,7293	2,7764	4
91	Tiodicarbe	1,8387	19,00	9,8528	2,7764	9
92	Tiofanato-metílico	1,7415	19,00	10,3778	2,7764	-10
93	Tolclofós-metílico	2,8093	19,00	18,5834	2,7764	-44
94	Triadimenol	1,0341	19,00	6,7532	2,7764	20
95	Triazofós	4,7243	19,00	5,0877	2,7764	-5
96	Trifloxistrobina	2,7526	19,00	17,7801	2,7764	-40
97	Triflumurom	1,8135	19,00	27,9417	2,7764	-45
98	Vamidotiona	3,2363	19,00	4,8726	2,7764	-4
99	Zoxamida	2,7149	19,00	42,8144	2,7764	-31

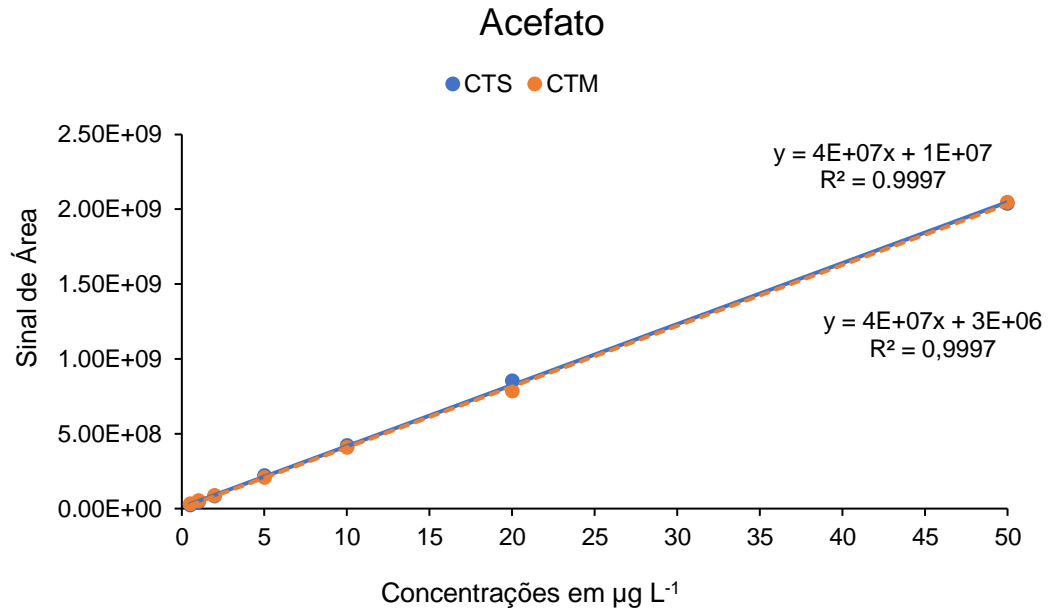
Fonte: o autor (2022).

O valor de t de Student calculado para a maioria dos analitos, com a exceção de 19 analitos que estão destacados na Tabela 15, foi maior que o valor de t crítico (tabelado). Portanto, como as curvas em solvente e em matriz não possuem as mesmas inclinações, não podem ser consideradas equivalentes, ou seja, há diferença significativa entre elas, confirmando a existência do efeito de matriz. As Figuras 15 e 16 mostram as curvas analíticas em solvente e em matriz para os compostos acefato e quinoxifeno, respectivamente. Pode-se observar para acefato que as curvas estão sobrepostas, e assim nota-se que não há diferença entre as inclinações das mesmas, evidenciando que não há efeito matriz significativo para esse composto. Para quinoxifeno, é possível observar a grande diferença entre as inclinações das curvas, demonstrando a presença de efeito matriz para esse composto.

Desse modo, como foi evidenciado efeito matriz para boa parte dos compostos, empregou-se curvas analíticas preparadas no extrato da matriz, inclusive para os

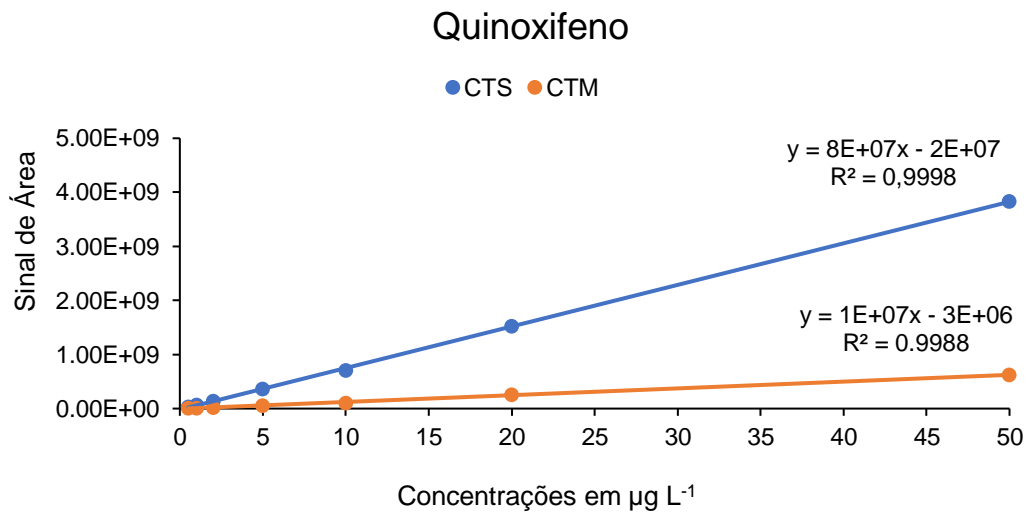
analitos onde não foi observado efeito de matriz significativo, por se tratar de um método multirresíduo.

Figura 15 - Curvas em solvente e em matriz do acefato



Fonte: Arquivo pessoal (2022)

Figura 16 - Curva em solvente e em matriz do quinoxifeno



Fonte: Arquivo pessoal (2022)



#### 4.4.4 Exatidão e precisão

A exatidão e precisão dos analitos foram avaliados por meio de ensaios de fortificação de quatro níveis de concentração (5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) em sete replicatas. A Tabela 16 apresenta os resultados das recuperações e RSD% para os compostos que obtiveram resultados satisfatórios na faixa de 70-120% de recuperação e RSD  $\leq$  20% conforme descrito pelo INMETRO e SANTE.

A precisão intermediária para os agrotóxicos estudados foi avaliada nos mesmos níveis de fortificação com sete replicadas cada em diferentes dias. Os resultados estão descritos na Tabela 16.

#### 4.4.5 Limite de detecção e quantificação

A variação do LOQ foi de 5 a 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , para todos os compostos. O limite de detecção (LOD) foi calculado a partir da divisão do valor de LOQ por 3,33. Os valores de LOD variou de 1,5 a 3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Os valores de LOD e LOQ estão apresentados na Tabela 16. Para os compostos que possuem valores de LMRs estabelecidos pela ANVISA para a cultura de abobrinha, os valores de LOQ obtidos na validação do método proposto estão todos abaixo dos LMRs estabelecidos pela ANVISA e UE.

Tabela 16 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS: LOQ, LOD, exatidão e precisão em termos de repetitividade e precisão intermediária

(continua)

Nº	Compostos	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Exatidão e Precisão ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), n=7				Precisão Intermediária ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), n=7			
				Recuperação % (RSD%)				Recuperação % (RSD%)			
				5	10	25	50	5	10	25	50
1	Acefato	5	1,5	102 (4)	88 (2)	83 (3)	81 (1)	100 (9)	92 (3)	87 (4)	85 (2)
2	Acetamiprido	5	1,5	71 (2)	88 (3)	98 (4)	99 (4)	90 (3)	102 (5)	103 (4)	104 (3)
3	Acibenzolar-S-metílico	5	1,5	84 (17)	71 (20)	85 (13)	70 (19)	107 (17)	100 (10)	72 (5)	74 (12)
4	Aldicarbe	5	1,5	71 (9)	83 (5)	98 (5)	101 (8)	119 (8)	103 (7)	97 (7)	97 (7)
5	Ametrina	5	1,5	96 (4)	94 (3)	97 (6)	100 (2)	72 (5)	88 (3)	92 (4)	98 (4)
6	Atrazina	5	1,5	70 (6)	84 (4)	97 (6)	97 (5)	89 (2)	95 (3)	95 (3)	99 (3)
7	Azinfós-metílico	5	1,5	108 (19)	103 (17)	100 (9)	97 (8)	105 (15)	94 (13)	98 (9)	94 (9)
8	Azoxistrobina	5	1,5	112 (6)	99 (5)	95 (4)	95 (5)	117 (8)	105 (7)	93 (6)	93 (3)
9	Bitertanol	5	1,5	96 (19)	93 (13)	89 (18)	93 (13)	103 (20)	95 (18)	90 (9)	86 (11)
10	Boscalida	5	1,5	74 (10)	82 (17)	92 (7)	95 (9)	89 (17)	95 (12)	84 (5)	90 (4)
11	Bromoconazol	5	1,5	81 (11)	86 (15)	99 (3)	98 (6)	115 (13)	113 (15)	104 (5)	97 (9)
12	Buprofezina	5	1,5	110 (7)	92 (8)	82 (19)	92 (9)	90 (11)	90 (15)	83 (19)	102 (8)
13	Carbaril	5	1,5	86 (7)	90 (4)	97 (5)	97 (4)	101 (8)	99 (5)	95 (2)	97 (2)
14	Carbendazim	5	1,5	83 (3)	87 (3)	91 (3)	92 (2)	103 (3)	99 (5)	96 (3)	96 (3)
15	Carbofurano	5	1,5	85 (5)	87 (5)	86 (9)	87 (4)	85 (6)	97 (5)	100 (6)	105 (4)
16	Carbofurano-3-hidroxi	5	1,5	88 (6)	89 (4)	94 (3)	94 (2)	75 (7)	89 (6)	97 (3)	101 (3)
17	Carboxina	5	1,5	91 (4)	95 (3)	101 (4)	101 (3)	82 (4)	97 (4)	103 (4)	107 (2)
18	Ciantranilprole	5	1,5	78 (7)	85 (4)	91 (8)	98 (3)	84 (5)	96 (3)	97 (5)	99 (3)
19	Cinazina	5	1,5	86 (9)	84 (8)	96 (6)	99 (4)	86 (11)	91 (7)	96 (6)	95 (4)
20	Cimoxanil	5	1,5	73 (5)	86 (3)	97 (4)	100 (2)	96 (4)	98 (5)	98 (5)	100 (4)
21	Ciprodinil	5	1,5	118 (9)	114 (15)	110 (16)	116 (13)	82 (16)	95 (12)	84 (19)	89 (12)
22	Cletodim	5	1,5	114 (4)	101 (6)	98 (11)	96 (12)	98 (11)	98 (7)	93 (11)	97 (8)
23	Clomazone	5	1,5	91 (11)	93 (2)	93 (7)	96 (8)	114 (10)	96 (12)	88 (9)	92 (9)
24	Clorantraniprole	5	1,5	92 (10)	90 (8)	92 (7)	93 (5)	95 (13)	98 (6)	96 (3)	96 (4)

Tabela 16 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS: LOQ, LOD, exatidão e precisão em termos de repetitividade e precisão intermediária

(continuação)

Nº	Compostos	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Exatidão e Precisão ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), n=7				Precisão Intermediária ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), n=7			
				Recuperação % (RSD%)				Recuperação % (RSD%)			
				5	10	25	50	5	10	25	50
25	Clorimuron etílico	5	1,5	112 (11)	94 (11)	87 (17)	90 (12)	72 (12)	74 (13)	100 (15)	95 (13)
26	Clorpirifós	10	3,0	129 (16)	82 (20)	94 (19)	101 (20)	24 (23)	73 (14)	76 (11)	73 (9)
27	Cresoxim-metílico	5	1,5	92 (11)	91 (12)	94 (11)	99 (7)	116 (9)	116 (12)	92 (18)	96 (5)
28	Diazinona	5	1,5	115 (9)	99 (13)	101 (10)	101 (9)	108 (14)	102 (7)	90 (11)	93 (5)
29	Difenoconazol	5	1,5	105 (14)	90 (10)	86 (12)	86 (10)	84 (13)	83 (15)	87 (18)	81 (12)
30	Dimetoato	5	1,5	89 (3)	94 (2)	97 (2)	92 (5)	89 (4)	98 (4)	102 (3)	103 (4)
31	Dimetomorfe	5	1,5	90 (9)	91 (5)	96 (4)	94 (3)	97 (9)	99 (6)	95 (4)	96 (3)
32	Diuram	5	1,5	84 (5)	88 (3)	95 (4)	95 (2)	92 (7)	94 (5)	95 (2)	96 (3)
33	Epoconazol	5	1,5	112 (13)	97 (8)	96 (5)	97 (2)	101 (6)	99 (7)	99 (4)	98 (5)
34	Espinetoram	5	1,5	82 (15)	70 (15)	79 (19)	85 (10)	112 (18)	74 (13)	81 (10)	76 (11)
35	Espinosade A	5	1,5	90 (12)	75 (10)	81 (14)	88 (9)	100 (18)	71 (13)	78 (12)	79 (10)
36	Espinosade D	5	1,5	81 (16)	71 (14)	76 (19)	85 (13)	117 (10)	73 (16)	77 (14)	75 (12)
37	Espiromesifeno	10	3,0	116 (42)	72 (12)	87 (14)	79 (19)	69 (87)	117 (19)	85 (11)	78 (18)
38	Etefon	5	1,5	119 (10)	91 (9)	89 (14)	88 (12)	71 (10)	77 (14)	77 (19)	83 (10)
39	Fempropimorfe	5	1,5	107 (19)	114 (12)	89 (12)	97 (12)	120 (16)	108 (10)	85 (8)	84 (10)
40	Fenamidona	5	1,5	81 (12)	96 (5)	90 (11)	96 (12)	111 (17)	112 (9)	98 (14)	102 (9)
41	Fenamifós	5	1,5	87 (12)	92 (9)	100 (5)	102 (2)	89 (6)	100 (4)	100 (5)	100 (6)
42	Fenarimol	5	1,5	117 (17)	97 (17)	96 (15)	99 (5)	107 (20)	112 (17)	103 (7)	101 (6)
43	Fentiona	5	1,5	109 (12)	94 (11)	91 (14)	90 (9)	75 (13)	86 (18)	82 (16)	86 (12)
44	Fipronil	10	3,0	78 (17)	71 (18)	70 (15)	79 (20)	116 (29)	74 (19)	75 (21)	70 (13)
45	Fluopicolida	5	1,5	93 (8)	95 (9)	101 (6)	98 (8)	94 (5)	101 (5)	97 (3)	98 (4)
46	Flupiradifurona	5	1,5	84 (4)	93 (4)	95 (8)	101 (3)	91 (4)	105 (3)	107 (6)	106 (5)
47	Fluquiconazol	5	1,5	77 (20)	95 (11)	106 (9)	102 (3)	84 (17)	105 (15)	102 (6)	104 (7)
48	Flutolanil	5	1,5	85 (4)	89 (5)	96 (6)	95 (6)	91 (6)	96 (6)	96 (5)	95 (3)
49	Flutriafol	5	1,5	83 (9)	92 (4)	97 (4)	101 (3)	97 (6)	98 (3)	99 (5)	100 (4)

Tabela 16 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS: LOQ, LOD, exatidão e precisão em termos de repetitividade e precisão intermediária

(continuação)

Nº	Compostos	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Exatidão e Precisão ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), n=7				Precisão Intermediária ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), n=7			
				Recuperação % (RSD%)				Recuperação % (RSD%)			
				5	10	25	50	5	10	25	50
50	Formetanato	5	1,5	90 (15)	76 (20)	87 (6)	89 (7)	119 (19)	116 (15)	85 (19)	106 (20)
51	Fostiazato	5	1,5	85 (2)	89 (2)	96 (3)	95 (4)	99 (4)	97 (4)	95 (3)	96 (3)
52	Hexitiazoxi	5	1,5	120 (20)	87 (18)	89 (17)	75 (18)	76 (19)	84 (20)	79 (4)	71 (13)
53	Imazali	5	1,5	81 (6)	85 (6)	93 (6)	93 (4)	85 (4)	90 (7)	90 (5)	94 (5)
54	Imidacloprido	5	1,5	84 (7)	90 (4)	97 (9)	106 (6)	95 (5)	97 (3)	99 (4)	99 (4)
55	Indoxicarbe	5	1,5	81 (14)	78 (15)	78 (18)	80 (14)	70 (3)	76 (13)	77 (11)	72 (14)
56	Iprovalicarbe	5	1,5	85 (7)	92 (4)	99 (5)	98 (5)	93 (6)	97 (7)	97 (5)	99 (4)
57	Linuron	5	1,5	103 (14)	98 (20)	103 (9)	98 (11)	109 (15)	93 (8)	88 (5)	90 (4)
58	Malationa	5	1,5	74 (13)	84 (4)	96 (4)	94 (6)	76 (7)	88 (14)	95 (6)	94 (9)
59	Mandipropamida	5	1,5	92 (15)	89 (10)	92 (5)	95 (10)	81 (15)	88 (10)	90 (6)	93 (4)
60	Mecarban	5	1,5	111 (16)	98 (14)	96 (10)	95 (11)	119 (15)	115 (8)	105 (5)	93 (11)
61	Mepronil	5	1,5	89 (7)	89 (6)	96 (6)	96 (5)	87 (3)	98 (5)	96 (5)	97 (4)
62	Metalaxil	5	1,5	85 (2)	92 (4)	97 (5)	99 (1)	73 (6)	88 (5)	96 (3)	100 (2)
63	Metconazol	5	1,5	94 (7)	89 (5)	92 (5)	96 (4)	95 (6)	94 (7)	94 (4)	94 (5)
64	Metiocarbe	5	1,5	115 (10)	104 (12)	96 (12)	99 (10)	80 (11)	98 (9)	94 (11)	107 (10)
65	Metomil	5	1,5	106 (8)	100 (6)	98 (7)	98 (5)	114 (9)	110 (3)	105 (4)	99 (4)
66	Metsulfuron metílico	5	1,5	85 (6)	90 (6)	88 (12)	93 (5)	76 (5)	100 (5)	109 (7)	110 (4)
67	Monocrotofós	5	1,5	90 (4)	89 (3)	91 (4)	92 (2)	100 (5)	97 (3)	95 (3)	95 (2)
68	Monolinuron	5	1,5	80 (4)	86 (4)	97 (5)	100 (3)	91 (6)	99 (4)	100 (3)	101 (2)
69	Oxamil	5	1,5	94 (6)	91 (6)	90 (6)	95 (3)	109 (9)	104 (3)	97 (6)	98 (5)
70	Picoxistrobina	5	1,5	84 (7)	86 (6)	94 (7)	96 (4)	98 (8)	97 (8)	91 (5)	92 (5)
71	Piraclostrobina	5	1,5	81 (15)	72 (9)	88 (16)	90 (17)	71 (9)	71 (16)	82 (18)	74 (14)
72	Pirazofós	5	1,5	76 (7)	79 (6)	88 (9)	92 (4)	81 (12)	88 (11)	86 (13)	91 (9)
73	Piridafentiona	5	1,5	90 (5)	84 (12)	95 (10)	92 (10)	93 (15)	100 (6)	99 (8)	91 (10)

Tabela 16 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS: LOQ, LOD, exatidão e precisão em termos de repetitividade e precisão intermediária

(continuação)

Nº	Compostos	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Exatidão e Precisão ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), n=7				Precisão Intermediária ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), n=7			
				Recuperação % (RSD%)				Recuperação % (RSD%)			
				5	10	25	50	5	10	25	50
74	Pirimetanil	5	1,5	108 (13)	101 (11)	97 (6)	95 (3)	117 (8)	103 (4)	94 (7)	97 (4)
75	Pirimicarbe	5	1,5	89 (4)	87 (3)	87 (12)	88 (6)	98 (5)	101 (5)	99 (5)	100 (6)
76	Pirimifós metílico	5	1,5	110 (4)	93 (10)	88 (10)	90 (7)	94 (12)	94 (8)	88 (14)	95 (6)
77	Piriproxifeno	10	3,0	110 (16)	77 (17)	106 (19)	76 (15)	59 (18)	76 (12)	75 (7)	71 (6)
78	Propamocarbe	5	1,5	90 (5)	83 (3)	82 (3)	82 (2)	98 (4)	91 (3)	86 (5)	84 (3)
79	Propargito	10	3,0	114 (16)	95 (11)	113 (14)	72 (19)	24 (24)	70 (18)	83 (11)	72 (8)
80	Propiconazol	5	1,5	102 (11)	95 (16)	105 (10)	104 (10)	84 (9)	92 (7)	93 (6)	95 (6)
81	Propoxur	5	1,5	88 (5)	88 (2)	90 (6)	91 (4)	79 (4)	95 (3)	99 (5)	105 (3)
82	Quinoxifeno	5	1,5	103 (19)	86 (17)	101 (17)	74 (16)	70 (13)	82 (14)	79 (12)	71 (2)
83	Saflufenacil	5	1,5	81 (5)	88 (3)	89 (5)	95 (3)	90 (4)	97 (4)	95 (5)	98 (3)
84	Simazina	5	1,5	81 (6)	87 (5)	90 (6)	90 (6)	71 (4)	91 (5)	96 (4)	102 (4)
85	Tebufenozida	5	1,5	90 (7)	93 (3)	99 (6)	98 (4)	76 (15)	85 (11)	96 (7)	95 (7)
86	Terbufós	10	3,0	109 (31)	102 (17)	94 (15)	78 (19)	110 (20)	113 (11)	83 (20)	84 (15)
87	Terbutilazina	5	1,5	113 (15)	95 (15)	97 (11)	92 (11)	116 (6)	104 (9)	92 (6)	94 (4)
88	Tiabendazol	5	1,5	88 (3)	89 (3)	90 (3)	94 (4)	105 (3)	99 (8)	95 (4)	97 (4)
89	Tiacloprido	5	1,5	87 (4)	90 (3)	96 (5)	98 (2)	98 (4)	98 (3)	97 (4)	99 (3)
90	Tiametoxam	5	1,5	92 (12)	94 (4)	96 (4)	97 (3)	102 (7)	101 (1)	98 (2)	97 (3)
91	Tiodicarbe	5	1,5	85 (8)	82 (7)	86 (5)	85 (6)	94 (5)	93 (7)	80 (3)	87 (3)
92	Tiofanato-metílico	5	1,5	72 (5)	87 (3)	93 (9)	96 (1)	91 (4)	99 (4)	102 (4)	103 (3)
93	Tolclofós-metílico	5	1,5	119 (15)	84 (18)	82 (12)	87 (10)	84 (11)	80 (14)	80 (17)	85 (11)
94	Triadimenol	10	3,0	73 (21)	84 (14)	93 (13)	91 (12)	101 (25)	105 (14)	97 (17)	102 (9)
95	Triazofós	5	1,5	84 (9)	91 (1)	94 (5)	97 (1)	93 (5)	94 (10)	96 (4)	98 (4)
96	Trifloxistrobina	5	1,5	98 (9)	82 (6)	86 (14)	88 (12)	103 (16)	90 (18)	80 (20)	81 (11)
97	Triflumurom	5	1,5	114 (13)	74 (16)	88 (20)	89 (16)	78 (9)	84 (10)	79 (12)	72 (13)
98	Vamidotiona	5	1,5	86 (3)	90 (3)	94 (3)	94 (3)	82 (3)	94 (4)	98 (3)	100 (3)

Tabela 16 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS: LOQ, LOD, exatidão e precisão em termos de repetitividade e precisão intermediária

		<b>Exatidão e Precisão (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>), n=7</b>				<b>Precisão Intermediária (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>), n=7</b>					
		<b>Recuperação % (RSD%)</b>				<b>Recuperação % (RSD%)</b>					
<b>Nº</b>	<b>Compostos</b>	<b>LOQ (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>LOD (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>25</b>	<b>50</b>
99	Zoxamida	5	1,5	118 (11)	101 (14)	103 (12)	100 (14)	84 (14)	86 (12)	85 (10)	88 (5)
PC	Atrazina-d5	5	1,5	73 (5)	83 (4)	98 (4)	99 (3)	75 (4)	87 (5)	92 (5)	95 (2)

Fonte: o autor, (2022).

Após o processo de validação, dos 112 compostos inicialmente estudados, 99 compostos foram validados, apresentando resultados considerados adequados nos ensaios de recuperação e de desvio padrão relativo, representando aproximadamente 88% dos compostos em estudo. Em relação aos 99 compostos validados no método, em termos de níveis de recuperação, 92 dos agrotóxicos apresentaram valores de recuperações adequados ao critério estabelecido no nível de fortificação mais baixo, de  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Apenas 7 dos 99 agrotóxicos apresentaram recuperações adequadas a partir do segundo nível de fortificação. Já os valores de RSD estão dentro do critério estabelecido, em pelo menos três níveis, para os 99 agrotóxicos validados. Nos demais níveis (25 e  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), todos os compostos apresentaram resultados dentro dos critérios de aceitação.

Os compostos azinfós-metílico, clorprofam, clorpirifós-metílico, deltametrina, diafentiuron, espiroclorfenol, etofenpróxi, famoxadona, fenpiroximato, fluxaproxade, novaluron, piridaben e teflubenzuron não apresentaram recuperações satisfatórias (entre 70 e 120%) em nenhum nível, ou em pelo menos três níveis, com isso, estes compostos não puderam ser validados.

Alguns desses compostos, como clorprofam, deltametrina, famoxadona, fluxaproxade e teflubenzuron possuem  $pK_a$  relativamente alto em comparação aos demais compostos em estudo (Tabela 6), sendo sensíveis ao pH. Isso pode ser uma explicação para que esses compostos não tenham obtido recuperações na faixa aceitável (70-120%), o que sugere que esses compostos necessitem de um ajuste de pH para serem estáveis. O azinfós-metílico e clorpirifós-metílico são inseticidas organofosforados, possuindo características polares, a utilização de  $\text{MgSO}_4$  favorece a extração principalmente de compostos apolares (PRESTES *et al.*, 2009), o que também pode se revelar como uma suspeita para os valores de recuperação inadequados para esses compostos.

#### **4.4.6 Aplicação do método**

O método validado proposto neste estudo foi aplicado à 20 amostras (A1 a A20) de abobrinha, comercializadas em mercados e feiras em diferentes cidades do estado Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Tabela 7). Conforme a Tabela 17, das 20 amostras analisadas, 12 amostras apresentaram presença de resíduos de agrotóxicos, correspondendo a 60% do total de amostras analisadas. Dos 99 agrotóxicos validados no presente trabalho, 15 foram quantificados e/ou detectados

nas amostras analisadas, são eles: acefato, acetamiprido, azoxistrobina, boscalida, carbendazim, carbofurano, carbofurano-3-hidroxi, cresoxim-metílico, difenoconazol, fipronil, flupiradifurona, imidacloprido, metalaxil, propamocarbe e tiametoxam. O agrotóxico que apareceu com maior frequência, em 4 de 20 amostras, foi o inseticida imidacloprido, em concentrações entre 0,027 a 0,068 mg kg<sup>-1</sup>.



Tabela 17 – Resultados das análises das amostras de abobrinha em empregando o método desenvolvido e validado neste trabalho

Compostos	Concentração (mg kg <sup>-1</sup> )											LMR (mg kg <sup>-1</sup> )			
	A1	A4	A5	A9	A11	A12	A13	A14	A16	A17	A18	A19	ANVISA	USDA	EU
Acefato	n.d	n.d	n.d	n.d	0,084	0,058	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	NA	NA	P
Acetamiprido*	0,052	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,039	n.d	n.d	0,2	0,50	NA
Azoxistrobina*	0,011	n.d	< LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,5	0,3	1
Boscalida	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,017	n.d	0,082	NA	3	4
Carbendazim	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	< LOQ	n.d	n.d	n.d	P	P	P
Carbofurano	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,01	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	P	NA	0,002
Carbofurano-3-hidroxi	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,011	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	P	NA	0,002
Cresoxim-metílico	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	< LOQ	NA	0,4	0,5
Difenoconazol*	0,014	n.d	0,005	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,046	n.d	n.d	0,07	0,7	0,3
Fipronil	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	< LOQ	n.d	n.d	n.d	NA	NA	0,005
Flupiradifurona*	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,009	n.d	n.d	n.d	n.d	0,6	0,4	0,6
Imidacloprido*	0,033	0,032	n.d	0,068	n.d	0,027	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,05	0,5	P
Metalaxil*	n.d	n.d	0,011	n.d	n.d	n.d	0,015	n.d	n.d	n.d	n.d	0,006	0,1	1	NA
Propamocarbe*	n.d	n.d	n.d	0,010	n.d	n.d	n.d	0,013	n.d	n.d	0,071	n.d	2	1,5	5
Tiametoxam*	n.d	n.d	0,012	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,014	n.d	n.d	0,02	0,02	0,2	P

Fonte: o autor, (2022).

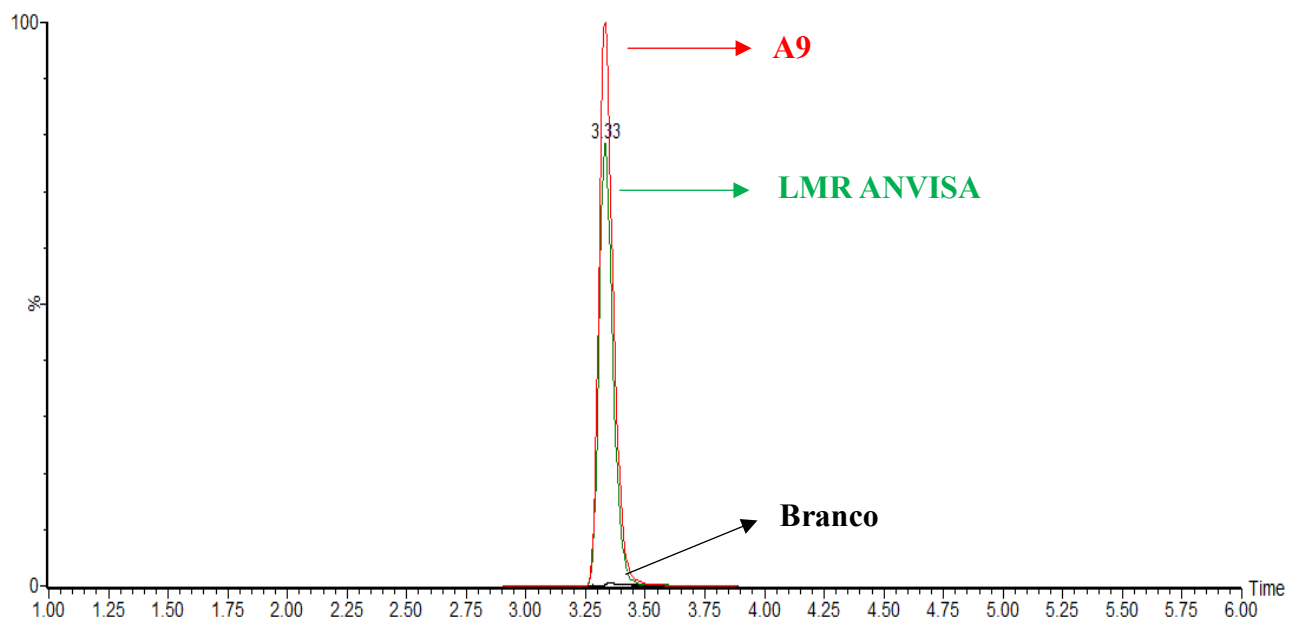
Legenda: n.d: não detectado. < LOQ: menor que o limite de quantificação. NA: não autorizado para a cultura de abobrinha. P: proibido. \*: compostos com o uso autorizado pela ANVISA para abobrinha.

Os compostos acetamiprido, azoxistrobina, difenoconazol, flupiradifurona, metalaxil, propamocarbe e tiametoxam são compostos autorizados pela ANVISA para o uso na cultura de abobrinha e foram quantificados em concentrações abaixo do LMR estabelecido para cada um deles como pode ser visto na Tabela 17.

Os compostos acefato, boscalida, carbendazim, carbofurano, carbofurano-3-hidroxi, cresoxim-metílico e fipronil não possuem autorização de uso para a cultura de abobrinha no Brasil, evidenciando uma discordância com o que a ANVISA preconiza nas monografias autorizadas para a cultura de abobrinha. Realizando-se uma análise mais ampla desses compostos pelos limites estabelecidos por agências internacionais, com exceção do acefato, carbofurano e carbofurano-3-hidroxi, os demais estariam em concentrações abaixo dos seus respectivos LMRs, caso fossem adotados os mesmos limites para a legislação brasileira, e também caso fossem autorizados para uso no Brasil para a cultura de abobrinha.

O imidacloprido foi o composto que obteve maior frequência nas amostras analisadas, com incidência em 4 das 20 amostras analisadas. Esse agrotóxico é autorizado para uso na cultura de abobrinha, no entanto, na amostra A9, foi encontrado na concentração de  $0,068 \text{ mg kg}^{-1}$ , concentração superior ao LMR ( $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ ) estabelecido pela ANVISA. A Figura 17 apresenta o cromatograma do imidacloprido na amostra A9 sobreposto ao seu LMR ( $50 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e amostra branco.

Figura 17 - Cromatograma positivo para o inseticida imidacloprido da amostra A9, sobreposto ao seu LMR e amostra branco de abobrinha



Fonte: Arquivo pessoal, (2022).

O imidacloprido é um inseticida que apresenta atividade principalmente no bloqueio da condução normal do sistema nervoso central em insetos. Ele é utilizado principalmente para o combate das pragas que atacam as cucurbitáceas, como mariposas, mosca branca e pulgão. A mariposa coloca ovos nas folhas, ramos, flores e frutos. As lagartas agem atacando as folhas, ocasionando desfolha. A mosca branca é um pequeno sugador que geralmente fica na parte inferior das folhas e ao sugar a seiva das plantas, enfraquece-as, injetando toxinas e transmitindo viroses, o que reduz significativamente a produção dessas espécies. O pulgão ataca os brotos e folhas novas sugando-as. Ele pode transmitir viroses às plantas, o que reduz bastante a produtividade das plantas (Amaro *et al.*, 2021).

Nos últimos anos, o imidacloprido tem sido relatado como um contaminante emergente em todas as partes do mundo, tendo diferentes efeitos toxicológicos em uma variedade de organismos não-alvo, incluindo seres humanos, devido ao seu uso em larga escala (PANG *et al.*, 2020).

Desai e Parikh (2013), demonstraram que a exposição aguda ao imidacloprido à carpa rohu induziu ao aumento da mortalidade, rápido movimento opercular e da nadadeira, perda de equilíbrio e letargia nessa espécie. Os agrotóxicos podem causar intoxicação aguda e/ou crônica em peixes e danificar seus órgãos dinâmicos, causando várias alterações bioquímicas, deficiência reprodutiva e deformidades morfológicas (WU *et al.*, 2018). Muazzam e colaboradores (2019) realizaram um estudo em peixe-zebra, que é um importante organismo bioindicador para monitorar a contaminação de recursos hídricos, uma vez que tem uma semelhança genética com humanos. No estudo, os peixes foram submetidos à diferentes concentrações de imidacloprido e endossulfam. Foi observado um aumento substancial de danos ao DNA após 21 dias de exposição aos dois compostos.

Logo, a importância de se monitorar e evidenciar os efeitos toxicológicos do imidacloprido e demais agrotóxicos é fundamental para que as medidas de prevenção e minimização dos impactos nocivos causados pelos agrotóxicos sejam tomadas pelas agências e órgãos responsáveis.

## 5 CONCLUSÃO

Com o desenvolvimento do presente trabalho foi possível o estabelecimento de um método baseado em QuEChERS sem necessidade de execução de uma etapa de limpeza do extrato para a determinação de 99 agrotóxicos em abobrinha utilizando UHPLC-MS/MS. A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que as modificações realizadas durante o desenvolvimento do método foram extremamente positivas, tornando a análise mais rápida, garantindo resultados confiáveis e atingindo os objetivos propostos neste estudo, além de reduzir o custo financeiro e minimizar o impacto ambiental. O método QuEChERS modificado não emprega uma etapa de limpeza com uso de sorventes, demonstrando ser vantajoso, simples e rápido, tornando o método ainda mais barato e diminuindo possíveis fontes de erro.

O método desenvolvido foi validado de acordo com o INMETRO (2020) e o guia de validação SANTE (2021). Foram obtidos resultados satisfatórios para todos parâmetros em 99 de 112 compostos estudados. Os valores de LOQ e LOD do método validado foram menores do que os LMRs estabelecidos pelos órgãos de controle.

O método proposto foi eficiente para analisar amostras comerciais de abobrinha, sendo encontrados resíduos de agrotóxicos em 12 amostras das 20 amostras analisadas. Para os compostos que possuem LMR estabelecido, os resultados estão de acordo com a legislação. O agrotóxico que se destacou foi o imidacloprido, sendo encontrado em 4 das 20 amostras avaliadas, onde em uma delas estava em concentrações acima do permitido pela legislação brasileira, evidenciando a necessidade de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em amostras de abobrinha. Desta forma, conclui-se que o método QuEChERS original modificado empregando UHPLC-MS/MS, é eficaz para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em abobrinha, podendo ser utilizado em análises de rotina.

## **6 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS**

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

## **7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- ✓ Ampliar o escopo de agrotóxicos a serem analisados na matriz abobrinha por UHPLC-MS/MS;
- ✓ Desenvolver um método de análise cromatográfica por GC-MS/MS para expandir o escopo de analitos não passíveis de análise por cromatografia líquida;
- ✓ Avaliar a aplicabilidade do método de extração QuEChERS modificado para outras matrizes com composição centesimal semelhante a abobrinha (ex.: melancia, pepino, abóbora).
- ✓ Avaliar outros solventes na etapa de extração.

## REFERÊNCIAS

- ALGHARIBEH, G. R.; ALFARARJEH, M. S. Pesticide residues in fruits and vegetables in Jordan using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 1, p. 65–73, 2018.
- AL-NASIR, F. M.; JIRIES, A. G.; AL-RABADI, G. J.; ALU'DATT, M. H.; TRANCHANT, C. C.; AL-DALAIN, S. A.; ALRABADI, N.; MADANAT, O. Y.; AL-DMOUR, R.S. Determination of pesticide residues in selected citrus fruits and vegetables cultivated in the Jordan Valley. **LWT – Food Science and Technology**, v. 123, n. 1, p. 1-9, 2020.
- AMARO, G. B.; HANASHIRO, M. M.; PINHEIRO, J. B.; MADEIRA, N. R.; FAUSTINO, R. M. E. B. **Recomendações técnicas para o cultivo de abóboras e morangas**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2021. (Embrapa Hortaliças, CT 175).
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; ŠTAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412–431, 2003.
- ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM, E.; TASDELEN, B.; STAJNBAHER, D. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. In: OHKAWA, H.; MIYAGAWA, H.; LEE, P. W. **Crop Protection, Public Health, Environmental Safety**, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2007.
- ANVISA. **Monografias de agrotóxicos**. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/dadosabertos/informacoes-analiticas/monografias-de-agrotoxicos>. Acesso em 10 ago 2022.
- ANVISA. **Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxico em Alimentos (PARA)**. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>. Acesso em 15 ago 2022.
- ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 296, de 29 de julho de 2019**. “Dispõe sobre as informações toxicológicas para rótulos e bulas de agrotóxicos, afins e preservativos de madeira”; publicada no Diário Oficial da União em 31 jul. 2019, Brasília, DF.
- ARIAS, J. L. O.; ROMBALDI, C.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Alternative sorbents for the dispersive solid-phase extraction step in quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction of pesticides from rice paddy soils with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1360, n. 1, p. 66-75, 2014.
- ARMOND, C.; OLIVEIRA, V. C.; GONZALEZ, S. D. P.; OLIVEIRA, F. E. R.; SILVA, R. M.; LEAL, T. T. B.; REIS, A. S.; SILVA, F. Desenvolvimento inicial de plantas de abobrinha italiana cultivada com húmus de minhoca. **Horticultura brasileira**, v. 34, n. 3, p. 439–442, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **NBR ISO/IEC 17025:2017: Requisitos Gerais para a Competência dos Laboratórios de Ensaio e Calibração**. Rio de Janeiro, 2017.

BARBOSA, K.; BIOTECH, G. B.; THEO, K. G. Cultivation of zucchini (*Cucurbita pepo* L.) Submitted to npk mineral fertilization and soil conditioning bacteria. **Journal of Interdisciplinary Debates**, v. 2, n. 4, 2021.

BELARBI, S.; VIVIER, M.; ZAGHOUBANI, W.; DE SLOOVERE, A.; AGASSE, V.; CARDINAEL, P. Comparison of different d-SPE sorbent performances based on quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) methodology for multiresidue pesticide analyses in rapeseeds. **Molecules**, v. 26, n. 21, p. 1-12, 2021.

BISOGNIN, D. A. Origem e evolução de cucurbitáceas cultivadas. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 715–723, 2002.

BRASIL. **Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002**. “Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.”; publicado no Diário Oficial da União em 8 jan. 2002, Brasília, DF.

CAMINO-SÁNCHEZ, F. J. ; ZAFRA-GÓMEZ, A. ; RUIZ-GÁRCIA, J.; BERMÚDEZ-PEINADO, R.; BALLESTEROS, O.; NAVALON, A.; VÍLCHEZ, J. L. UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 accredited method for the determination of 121 pesticide residues in fruits and vegetables by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 3, p. 427–440, 2011.

CARPES, R. H.; LÚCIO, A. D.; STORCK, L.; LOPES, S. J.; ZANARDO, B.; PALUDO, A. L. Ausência de frutos colhidos e suas interferências na variabilidade da fitomassa de frutos de abobrinha italiana cultivada em diferentes sistemas de irrigação. **Revista Ceres**, v. 5, n. 6, p. 590–595, 2008.

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.

CHIARADIA, M. C. Desenvolvimento, validação e aplicação de métodos para análise multirresidual de agrotóxicos em suco de laranja e tangerina utilizando CLAE-DAD, CL-EM-EM E CLUE-DAD. **Tese de doutorado**, UNICAMP, Campinas, 2009.

ČIZMIĆ, M.; BABIĆ, S.; KAŠTELAN-MACAN, M. Multi-class determination of pharmaceuticals in wastewaters by solid-phase extraction and liquid

chromatography tandem mass spectrometry with matrix effect study. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 25, p. 20521–20539, 2017.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006.

DESAI, B.; PARIKH, P. Biochemical alterations on exposure of imidacloprid and curzate on fresh water fish *Oreochromis mossambicus* and *Labeo rohita*. **Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology**, v. 7, n. 2, p. 87-91, 2013.

DE OLIVEIRA, J. A.; IZEPI, L. J. P.; LOSSE, R. F.; MUENCHEN, D. K.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R. Multiclass method for the determination of pharmaceuticals in drinking water by solid phase extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 11, n. 17, p. 2333-2340, 2019.

EFSA, 2022. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/pesticides#maximum-residue-levels>. Acesso em: 15 ago 2022.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). **Codex Alimentarius: International food standards**. 2022. Disponível em : <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/thematic-areas/pesticides/en/>. Acesso em 03 ago 2022.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). **FAOSTAT: Crops and livestock products**. 2018. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Acesso em 03 ago 2022.

FERRACANE, A.; ZOCCALI, M.; CACCIOLA, F.; SALERNO, T. M. G.; TRANCHIDA, P. Q.; MONDELLO, L. Determination of multi-pesticide residues in vegetable products using a “reduced-scale” Quechers method and flow-modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1645, n. 24, p. 1-11, 2021.

FERRER, C.; LOZANO, A.; AGUERA, A.; GIRÓN, A. J.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7634-7639, 2011.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008.

GARCÍA-REYES, J. F.; FERRER, C.; GÓMEZ-RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; MOLINA-DÍAZ, A. Determination of pesticide residues in olive oil and olives. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 239–251, 2007.



GOLGE, O.; KABAK, B. Evaluation of QuEChERS sample preparation and liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry method for the determination of 109 pesticide residues in tomatoes. **Food Chemistry**, v. 176, n. 1, p. 319–332, 2015.

GREER, B.; CHEVALLIER, O.; QUINN, B.; BOTANA, L. M.; ELLIOTT, C. T. Redefining dilute and shoot: The evolution of the technique and its application in the analysis of foods and biological matrices by liquid chromatography mass spectrometry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 1-15, 2021.

GRIMALT, S.; DEHOUCK, P. Review of analytical methods for the determination of pesticide residues in grapes. **Journal of Chromatography A**, v. 1433, n. 1, p. 1–23, 12, 2016.

HAN, L.; MATARRITA, J.; SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix co-extractives in the analysis of pesticide residues and environmental contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1449, n. 1, p. 17–29, 2016.

HEJJI, L.; AZZOUZ, A.; COLÓN, L. P.; SOUHAIL, B.; BALLESTEROS, E. A multi-residue method for determining twenty-four endocrine disrupting chemicals in vegetables and fruits using ultrasound-assisted solid–liquid extraction and continuous solid-phase extraction. **Chemosphere**, v. 263, n. 1, 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Censo agro 2017**: Resultados definitivos. Disponível em: [https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo\\_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=0&tema=76409](https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=0&tema=76409). Acesso em: 05 ago 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA – INMETRO. DOQ-CQCRE-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos: documento de caráter orientativo – revisão 08. Duque de Caxias: INMETRO – Coordenação Geral de Acreditação, 2020.

JALLOW, M. F. A.; AWADH, D. G.; ALBAHO, M. S.; DEVI, V. Y.; AHMAD, N. Monitoring of pesticide residues in commonly used fruits and vegetables in Kuwait. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 8, p. 1-12, 2017.

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

JIA, W.; SHI, L.; CHU, X. Untargeted screening of sulfonamides and their metabolites in salmon using liquid chromatography coupled to quadrupole Orbitrap mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 239, n. 1, p. 427–433, 2018.

JUAN, C.; MAÑES, J.; FONT, G.; GARCÍA, A. J. Determination of mycotoxins in fruit berry by-products using QuEChERS extraction method. **LWT**, v. 86, n. 1, p. 344–351, 2017.

KARDANI, F.; JELYANI, A. Z.; DAHANZADEH, M. Determination of 250 pesticide residues in the Iranian vegetables assessed during 2019–2020 using the modified QuEChERS method along with gas chromatography - mass spectrometry. **Applied Food Research**, v. 2, n. 1, p. 1-15, 2022.

KEMMERICH, M.; RIZZETTI, T. M.; MARTINS, M. L.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Optimization by Central Composite Design of a Modified QuEChERS Method for Extraction of Pesticide Multiresidue in Sweet Pepper and Analysis by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Food Anal. Methods**, v. 8, n. 1, p. 728–739, 2014.

KIM, L.; LEE, D.; CHO, H. K.; CHOI, S.D. Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, 2019.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LEHOTAY, S. J. QuEChERS sample preparation approach for mass spectrometric analysis of pesticide residues in foods. In: ZWEIGENBAUM, J. **Mass spectrometry in food safety: methods and protocols**, New Jersey: Humana Press, 2011. (Methods in Molecular Biology, v. 747)

LEHOTAY, S. J.; MAÒTOVSKÁ, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 615-629, 2005.

LIMA, M. F. **Viroses de curcubitáceas**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2011. (Embrapa Hortaliças, Circular Técnica, 95)

LIMA, D. M.; PADOVANI, R. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; FARFÁN, J. A.; NONATO, C. T.; LIMA, M. T.; SALAY, E.; COLUGNATI, F. A. B.; GALEAZZI, M. A. M. **Tabela brasileira de composição dos alimentos - TACO**. 4. ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011.

LOFTY, H. M.; ABD EL-ALEEM, A. E.-A. A.; MONIR, H. H. Determination of insecticides malathion and lambda-cyhalothrin residues in zucchini by gas chromatography. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 51, n. 2, p. 255–260, 2013.

MAC LOUGHLIN, T. M.; PELUSO, L.; ETCHEGOYEN, A.; ALONSO, L. L.; CASTRO, C.; PERCUDANI, C.; MARINO, D. J. G. Pesticide residues in fruits and vegetables of the argentine domestic market: occurrence and quality. **Food Control**, v. 93, n. 1, p. 129–138, 2018.

MALATO, O.; LOZANO, A.; MEZCUA, M.; AGUERA, A.; ALBA, A. R. F. Benefits and pitfalls of the application of screening methods for the analysis of pesticide

residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7615–7626, 2011.

MARTINS, M. L.; KEMMERICH, M.; PRESTES, O. D.; MALDANER, L.; JARDIM, I. C.S.F.; ZANELLA, R. Evaluation of an alternative fluorinated sorbent for dispersive solid-phase extraction clean-up of the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method for pesticide residues analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1514, n. 1, p. 36-43, 2017.

MEIRA, A. P. G. Técnicas de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal: uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 22, n. 2, p. 766–777, 2015.

MENEZES FILHO, A.; DOS SANTOS, F. N.; DE PAULA PEREIRA, P. A. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. **Talanta**, v. 81, n. 1–2, p. 346–354, 2010.

MILANO, F.; DONNARUMMA, L. Determination of essential oils residues on zucchini fruits by GC-MS. **Natural Product Research**, v. 31, n. 8, p. 976–979, 2017.

MORAES, R. F. **Agrotóxicos no Brasil**: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2019. (Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, Texto para Discussão, 2506)

MUHAMMAD, N.; SUBHANIA, Q.; WANG, F.; LOU, C.; LIU, J.; ZHU, Y. Simultaneous determination of two plant growth regulators in ten food samples using ion chromatography combined with QuEChERS extraction method (IC-QuEChERS) and coupled with fluorescence detector. **Food Chemistry**, v. 241, n. 1, p. 308–316, 2018.

MUAZZAM, B.; MUNAWAR, K.; KHAN, I. A.; JAHAN, S.; IQBAL, M.; ASI, M. R.; FAROOQI, A.; NAZLI, A.; HUSSAIN, I.; ZAFAR, M. I. Stress response and toxicity studies on zebrafish exposed to endosulfan and imidacloprid present in water. **Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua**, v. 8, n. 1, p. 718–730, 2019.

OLIVA, J.; CERMEÑO, S.; CÁMARA, M. A.; MARTÍNEZ, G.; BARBA, A. Disappearance of six pesticides in fresh and processed zucchini, bioavailability and health risk assessment. **Food Chemistry**, v. 229, n.1, p. 172–177, 2017.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Comparison of Different Sorbents in the QuEChERS Method for the Determination of Pesticide Residues in Strawberries by LC-MS/MS. **Chromatographia**, v. 77, n. 1, p. 1291–1298, 2014.

PANG, S.; LIN, Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, W.; ALANSARY, N.; MISHRA, S.; BHATT, P.; CHEN, S. Insights into the Toxicity and Degradation Mechanisms of

Imidacloprid Via Physicochemical and Microbial Approaches. **Toxics**, v. 8, n. 3, p. 1-31, 2020.

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

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

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.

PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R.; KURZ, M. H. S.; GONÇALVES, F. F.; MACHADO, S. O.; MARCHEZAN, E. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 605–609, 2005.

QUEIROZ, M. E. COSTA. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2015.

RAJSKI, L.; LOZANO, A.; UCLÉS, A.; FERRER, C.; ALBA, A. R. F. Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1304, n. 1, p. 109–120, 2013.

RAMBLA-ALEGRE, M.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **Journal of Chromatography A**, v. 1232, n. 1, p. 101–109, 2012.

ROTTA, E.M.; RODRIGUES, C.A.; JARDIM, I. C. S. F.; MALDANER, L.; VISENTAINER, J. V. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in passion fruit pulp (*Passiflora* spp.) using a modified QuEChERS method and UHPLC-MS/MS. **LWT**, v. 100, n. 1, p. 397–403, 2019.

SANTE 11312/2021. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed**. European Commission, p. 1-57, 2021.

SANTOS, F. F.; MELO, M. F.; TAVARES, S. A.; MATOS, M. J. L. F.; LANA, M. M. **Hortaliça: como comprar, conservar e consumir: abobrinha**. 2. ed. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2016. 2 p.

SILVA, R. A. G.; FARIA, A. M. Determinação de multirresíduos de agrotóxicos em méis produzidos na região do triângulo mineiro por UHPLC-MS/MS. **Química Nova**, v. 43, n. 3, p. 307–313, 2020.

- SOUSA, J. S.; CASTRO, R. C.; ANDRADE, G. A.; LIMA, C. G.; LIMA, L. C.; MILHOME, M. A. L.; NASCIMENTO, R. F. Evaluation of an analytical methodology using QuEChERS and GC-SQ/MS for the investigation of the level of pesticide residues in Brazilian melons. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2675–2681, 2013.
- STACHNIUK, A.; FORNAL, E. Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of pesticide residues in food. **Food Analytical Methods**, v. 9, p. 1654–1665, 2016.
- TANKIEWICZ, M.; BERG, A. Improvement of the QuEChERS method coupled with GC–MS/MS for the determination of pesticide residues in fresh fruit and vegetables. **Microchemical Journal**, v. 181, n. 1, p. 1-12, 2022.
- UCLÉS, A.; LÓPEZ, S. H.; HERNANDO, M.D.; ROSAL, R.; FERRER, C.; ALBA, A. R. F. Application of zirconium dioxide nanoparticle sorbent for the clean-up step in post-harvest pesticide residue analysis. **Talanta**, v. 144, n. 1, p. 51–61, 2015.
- VALVERDE, A.; AGUILERA, A.; FERRER, C.; CAMACHO, F.; CAMMARANO, A. Analysis of forchlorfenuron in vegetables by LC/TOF-MS after extraction with the buffered QuEChERS method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 2818–2823, 2010.
- WESKA, R.F.; MOURA, J.M.; BATISTA, L.M.; RIZZI, J.; PINTO, L.A.A. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 749–753, 2007.
- WONG, J. W.; WANG, J.; CHOW, W.; CARLSON, R.; JIA, Z.; ZHANG, K.; HAYWARD, D. G.; CHANG, J. S. Perspectives on liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry for pesticide screening in foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 37, p. 9573–9581, 2018.
- WU, S.; LI, X.; LIU, X.; YANG, G.; AN, X.; WANG, Q.; WANG, Y. Joint toxic effects of triazophos and imidacloprid on zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Pollution**, v. 235, n. 1, p. 470–481, 2018.
- YANG, P.; CHANG, J.S.; WONG, J. W.; ZHANG, K.; KRYNITSKY, A. J.; BROMIRSKI, M.; WANG, J. Effect of sample dilution on matrix effects in pesticide analysis of several matrices by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 21, p. 5169–5177, 2015.
- ZHAN, J.; ZHONG, Y. Y.; YU, X. J.; PENG, J. F.; CHEN, S.; YIN, J. Y.; ZHANG J. J.; ZHU, Y. Multi-class method for determination of veterinary drug residues and other contaminants in infant formula by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 827–834, 2013.