INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Análise multirresíduos de pesticidas em alimentos cítricos via técnicas
cromatográficas: GC/ECD e GC/MS**

KELLY CRISTINA MANHANI

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

Orientador:
Prof. Dr. Jose Oscar William Vega Bustillos

São Paulo
2019

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Análise multirresíduos de pesticidas em alimentos cítricos via técnicas
cromatográficas: GC/ECD e GC/MS**

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

KELLY CRISTINA MANHANI

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

**Orientador:
Prof. Dr. Jose Oscar William Vega
Bustillos**

**São Paulo
2019**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

MANHANI, K. C. **Análise multirresíduos de pesticidas em alimentos cítricos via técnicas cromatográficas**: GC/ECD e GC/MS. 2019. 136 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Manhani, Kelly Cristina

Análise multirresíduos de pesticidas em alimentos cítricos
via técnicas cromatográficas: GC/ECD e GC/MS / Kelly Cristina
Manhani; orientador Jose Oscar William Vega Bustillos. -- São
Paulo, 2019.
136 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2019.

1. suco de laranja. 2. laranja Pêra. 3. GC-ECD. 4. GC-MS.
5. multirresíduos QuEChERS. I. Vega Bustillos, Jose Oscar
William, orient. II. Título.

*Dedico este trabalho aos meus amores,
Renan meu noivo, meus pais Mário e Fátima,
e minha irmã Priscilla*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pela oportunidade de realizar esta conquista pessoal e profissional.

Ao meu orientador Oscar por ter aberto as portas do IPEN, me acolher, apoiar e compartilhar comigo muito mais que ensinamentos sobre a espectrometria de massas, mas sobre suas experiências de vida. Obrigada por sempre me motivar e acreditar na minha capacidade.

Aos meus pais Mário e Fátima, duas pessoas que tenho admiração enorme pelo carácter, educação e amor que me deram e fizeram ser quem sou. Obrigada por sempre acreditarem em mim.

Ao meu noivo Renan pela paciência, parceria, companheirismo, sempre compartilhando as dificuldades e conquistas no decorrer desses quase 3 anos, me apoiando e incentivando com muito amor e cumplicidade.

A minha irmã e grande amiga Priscilla, que sempre esteve comigo, me apoiando, animando e incentivando.

Meu irmão Wesley, tio Edison, tio Antônio, minhas cunhadas Thais e Nathália, minha sogra Dea, meus sobrinhos Manu, Nana, Miguel, Murilo e Valéria, por todo o apoio e incentivo.

Aos meus companheiros de mestrado Maíse, Glaúcia, Marcelo, Priscila, Ellias, Marvin, Mariana, Francine, Gilmar e Henrique que sempre deram uma super força, compartilhando conhecimentos e ajudando no que fosse necessário.

Aos meus amigos de vida e profissão Jorge, Cristiana e Fernando por compartilharem seus conhecimentos e experiências e me ajudarem muito em todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao Pesquisador Daniel Lebre e ao CEMSA por todos os ensinamentos, suporte e apoio no desenvolvimento do meu trabalho.

A professora Elâine e professor Hélio, pelo acolhimento no laboratório, empréstimo de equipamentos e contribuição na parte analítica do trabalho.

Aos meus avós Benedicto, Aparecido e Reginal e meus primos e tios, obrigada por entenderem minha ausência e apoiarem meus estudos.

As minhas amigas Mackenzistas Monique, Cinthia, Gilmara, Josiane, Sabrina, Carlinha e Natali que me acompanham desde a graduação e sempre me incentivaram.

Aos meus amigos queridos Aline Montessanti, Fernando Leão, Silvano, Thiago, Shirley, Luis Mancini e Diego Gomes que mesmo longe sempre estiveram perto.

A pesquisadora Viviane, Lucas e Alan por me acolherem no Instituto Adolfo Lutz, compartilhando experiências e me ajudando em tudo que foi necessário. Sem vocês esse trabalho não seria possível.

As pesquisadoras Rosa e Natália Cerize, os pesquisadores Kléber, Adriano e Silas e aos técnicos Alice, Fernando e Sérgio do LBI e LPP – IPT por toda a colaboração técnica para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus amigos do LAQ Leandro Oliveira (em memória), Jamille, João, Dirceu, Leo, Victor, Thais e Adriano por todo o apoio e ajuda, vocês são demais.

As minhas amigas Bianca, Vanessa, Jocasta, as Alines, Fabi, Marília, Sheila, Leilane, Danae, Arianne e Natália e aos meus amigos do Gabriel, Henrique, Ariel, Vitor e Vanessa por me ajudarem em tudo, desde o preparo de amostras até os bate-papos de incentivo. Com vocês concluir esse trabalho ficou mais leve! Vocês são maravilhosas (os)!

A Monique e Leandro, meus vizinhos queridos que sempre me incentivaram e apoiaram durante todo esse processo.

A minha equipe de trabalho do Bionano no geral, por contribuírem com parte das amostras e obrigada por todo o apoio e incentivo, agradeço o acolhimento e por acreditarem no meu trabalho.

A chefe de laboratório Sandra por apoiar meu trabalho deixando as portas do LAQ abertas nessa parceria. Sem seu suporte esse trabalho não seria possível.

Ao IPT por apoiar a minha capacitação profissional, disponibilizando a estrutura necessária e parceria com o IPEN para que o trabalho fosse desenvolvido.

Ao IPEN e USP pela estrutura e contribuição na minha formação acadêmica.

A vida não é fácil para nenhum de nós.

*Temos que ter persistência e acima
de tudo, confiança em nós mesmos.*

Marie Curie

RESUMO

MANHANI, K. C. **ANÁLISE MULTIRRESÍDUOS DE PESTICIDAS EM ALIMENTOS CÍTRICOS VIA TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS: GC/ECD E GC/MS.** 2019. 136p. Dissertação (Mestrado em tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN – CNEN/SP, São Paulo

Atualmente o Brasil vem ganhando espaço no mercado exportador de suco de laranja, sendo responsável por 61% da produção mundial. Tendo em vista a grande produtividade brasileira de laranja, a utilização de pesticidas acompanha este crescimento produtivo. A segurança alimentar torna-se ponto importante para a saúde dos consumidores. Com o objetivo de avaliar a qualidade dos citros, onze amostras de laranja pera e nove amostras de suco de laranja coletados em feiras, supermercados e sítios locais foram analisadas, sendo determinado a concentração de cinco pesticidas para este meio de cultura: Trifluralina, Clorotalonil, Clorpirifós, Dicofol e Azoxistrobina. Dentre eles, o Dicofol se destaca, sendo acarícida organoclorado utilizado para cultura citros, porém recentemente foi proibido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e adicionado a convenção de Estocolmo devido a sua classificação como POP (Poluente Orgânico Persistente). As técnicas analíticas utilizadas foram a cromatografia a gás acoplada ao detector por captura de elétrons (GC/ECD) e cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas (GC/MS). As amostras de suco de laranja foram compradas em mercados e restaurantes da cidade de São Paulo. As amostras de laranja foram compradas em feiras livres, mercados e sítios com produção local, com a condição de serem produzidas no Brasil. O procedimento de coleta e homogenização das amostras foi executado segundo diretrizes da ANVISA e *Codex Alimentarius*. Três métodos de extração foram utilizados: “QuEChERS ORIGINAL”, “QuEChERS MODIFICADO” (acetato) e extração Líquido-Líquido. O método QuEChERS é um método moderno que está revolucionando o preparo de amostras de matrizes complexas. As três metodologias foram comparadas em relação a eficiência de extração dos pesticidas da matriz e a quantificação e confirmação dos analitos foi realizada por meio dos equipamentos GC/ECD e GC/MS. O método de extração líquido-líquido apresentou problemas com a matriz, com formação de grande quantidade de emulsão, tornando-se inviável a separação do solvente e a matriz. Na extração via QuEChERS ORIGINAL, a separação dos analitos da matriz é feita por meio do uso de acetronitrila, sulfato de magnésio e cloreto de sódio. No QuEChERS MODIFICADO, além de uma alíquota maior de amostra, utiliza-se acetonitrila acidificada (1% ácido acético), sulfato de magnésio e acetato de sódio. Foram avaliados a mudança de pH na extração bem como se a mudança de proporção de amostra e adição de um sal diferente como o acetato de sódio interfere de alguma forma na eficiência de extração dos pesticidas. Parâmetros de qualidade analítica como seletividade/efeito matriz, linearidade, limite de detecção e quantificação foram estabelecidos. O pesticida Clorpirifós foi detectado em quatro das vinte amostras analisadas, na concentração de 0,01 a 0,04 mg kg⁻¹, ou seja, abaixo do limite máximo de resíduo de 2 mg kg⁻¹(LMR) preconizado pela ANVISA.

Palavras chave: suco de laranja, laranja Pêra, GC-ECD, GC-MS, multirresíduos, QuEChERS.

ABSTRACT

MANHANI, K. C. **MULTIRESIDUAL ANALYSIS OF PESTICIDES IN CITRUS FOODS THROUGH CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES: GC / ECD AND GC / MS**. 2019. 136p. Dissertation (Master in Nuclear Technology) - Energy and Nuclear Research Institute – IPEN – CNEN/SP, São Paulo

Currently, Brazil has been gaining market in the orange juice export industry, being accountable for 61% of world production. In view of the great productivity of Brazilian orange, the use of pesticides accompanies this productive growth. Food security becomes an important issue for consumers' health. In order to assess the quality of citrus, eleven samples of pear orange and nine samples of orange juice collected at fairs, supermarkets and local farms were analyzed, and the concentration of five pesticides for this cultivation medium was determined: Trifluralin, Chlorotalonil, Chlorpyrifos, Dicofol and Azoxystrobin. Among them, Dicofol stands out, being an organochlorine acaricide used for citrus growth, however it was recently banned by the National Health Surveillance Agency (ANVISA) and added to the Stockholm Convention due to its classification as POP (Persistent Organic Pollutant). The analytical techniques used was gas chromatography coupled to an electron capture detector (GC / ECD) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC / MS). The samples of orange juice were purchased at markets and restaurants in the city of São Paulo. The orange samples were purchased at open markets, markets and farms with local production, with the proviso that they were produced in Brazil. The sample collection and homogenization procedure were carried out according to ANVISA and Codex Alimentarius guidelines. Three extraction methods were used: "QuEChERS ORIGINAL", "MODIFIED QuEChERS" (acetate) and Liquid-Liquid extraction. The QuEChERS method is a modern method that is revolutionizing the preparation of complex matrix samples. The three methodologies were compared in relation to the extraction efficiency of the pesticides from the matrix and the quantification and confirmation of the analytes were performed using the GC / ECD and GC / MS equipment. The liquid-liquid extraction method presented problems with the matrix regarding to the formation of a large amount of emulsion, making the separation of the solvent and the matrix impracticable. In the extraction via QuEChERS ORIGINAL, the separation of the analytes from the matrix is done by the use of acetonitrile, magnesium sulfate and sodium chloride. In the MODIFIED QuEChERS, in addition to a larger sample rate, acidified acetonitrile (1% acetic acid), magnesium sulfate and sodium acetate were used. The change in pH in the extraction was evaluated, as well as the influence of the change in sample proportion and addition of a different salt such as sodium acetate on the extraction efficiency of the pesticides. Analytical quality parameters such as selectivity / matrix effect, linearity, detection limit and quantification were established. Chlorpyrifos pesticide was detected in four of the twenty samples analyzed, at a concentration of 0.01 to 0.04 mg kg⁻¹, that is, below the maximum residue limit of 2 mg kg⁻¹ (MRL) recommended by ANVISA.

Keywords: orange juice, orange Pêra, GC-ECD, GC-MS, multiresidue, QuEChERS.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo de responsabilidades relacionadas aos agrotóxicos atribuídas a cada órgão Federal do governo brasileiro	37
Tabela 2 - Principais fases estacionárias utilizadas em colunas capilares.....	52
Tabela 3 - Critério de aceitação para recuperação segundo AOAC	68
Tabela 4 - Critérios de aceitação para repetibilidade segundo AOAC	69
Tabela 5 - Identificação das amostras de laranja e características observadas na coleta	75
Tabela 6 - Identificação das amostras de suco de laranja e características da embalagem	77
Tabela 7 - Preparo e concentração das soluções-estoque 1 e 2	82
Tabela 8 - Preparo da curva analítica dos níveis de concentração P1 a P6	82
Tabela 9 - Preparo da curva analítica dos níveis de concentração P7 a P13	83
Tabela 10 - Condições analíticas - GC-ECD – Método Pesticidas_Met 3_V_7.....	84
Tabela 11 - Condições analíticas GC-MS – Método Pesticidas SIM_2 e SCAN_1	86
Tabela 12 - Dados de íon molecular e íon fragmento dos pesticidas em estudo	86
Tabela 13 - Características dos sucos de laranja analisados	87
Tabela 14 - Condições analíticas método experimental 1- GC-ECD	90
Tabela 15 - Resultados – Análise de DICOFOL em amostras de suco de laranja	92
Tabela 16 - Parâmetros utilizados no método analítico 2 – GC-ECD.....	95
Tabela 17 - Concentração da curva de calibração método analítico 2 – GC-ECD.....	96
Tabela 18 - Características dos sucos utilizados no teste de preparo de amostras 2	98
Tabela 19 - Resultados de concentração das amostras de suco analisadas por GC-ECD, utilizando o método analítico 2 e preparo de amostras 2	98
Tabela 20 - Recuperação das amostras de suco fortificadas utilizando método analítico 2 e preparo de amostras 2.....	99
Tabela 21 - Condições cromatográficas GC-MS – método 1	101
Tabela 22 - Nome dos extratos e tipo de <i>clean-up</i> utilizada	108
Tabela 23 - Resultados de recuperação para amostras em teste de clean-up	108
Tabela 24 - Resultados de estudo do efeito matriz.....	111
Tabela 25 - Coeficiente de correlação das curvas preparadas na matriz de laranja	113
Tabela 26 - Faixa linear de trabalho dos pesticidas em curva matriz.....	113
Tabela 27 - Limite de detecção dos pesticidas em curva matriz	114
Tabela 28 - Limite de quantificação dos pesticidas em curva matriz	114
Tabela 29 - Equação da reta e coeficiente de determinação (r^2) das curvas de pesticidas	115
Tabela 30 - Resultados calculados – amostras de laranja.....	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplo de etapas de desenvolvimento da laranja para a produção de frutos	22
Figura 2 - Principais cidades produtoras de laranja no interior de São Paulo	23
Figura 3 - Principais consumidores de suco de laranja Brasileiro	24
Figura 4 - Doença Cancro cítrico.....	26
Figura 5 - Doença CVC – Clorose Variegada dos citros ou amarelinho.....	27
Figura 6 - Doença Greening ou HLB	27
Figura 7 - Doença Leprose.....	28
Figura 8 - Doença MSC.....	29
Figura 9 - Doença da Pinta Preta	30
Figura 10 - Doença Podridão Floral.....	30
Figura 11 - Praga Ácaro da falsa ferrugem e frutas danificadas	31
Figura 12 - Praga Bicho Furão	31
Figura 13 - Praga Cochonilha Ortézia	32
Figura 14 - Praga Escama farinha.....	33
Figura 15 - Indicador de registros anuais de pesticidas no Brasil - MAPA	36
Figura 16 - Estrutura do pesticida Trifluralina	39
Figura 17 - Estrutura do pesticida Clorotalonil	40
Figura 18 - Estrutura do pesticida Clorpirifós.....	41
Figura 19 - Estrutura do pesticida Dicofol.....	41
Figura 20 - Estrutura do pesticida Azoxistrobina	42
Figura 21 - Fluxograma com as etapas do método QuEChERS Original.....	46
Figura 22 - Fluxograma com as etapas de extração do Método QuEChERS Modificado	
Acetato	47
Figura 23 - Sistema de Cromatografia a Gás	49
Figura 24 - Estrutura de colunas capilares para cromatografia a gás	50
Figura 25 - Figura com corte transversal das colunas tipo WCOT e WBOT, SCOT PLOT	
.....	50
Figura 26 - Detector ECD e suas partes constituintes	54
Figura 27 - Esquema de um GC-MS	55
Figura 28 - Esquema de uma fonte de Impacto de Elétrons (EI), os retângulos laterais	
nomeados S e N são os ímãs fixos	57
Figura 29 - Esquema de um quadrupolo	58
Figura 30 - Etapas do preparo de amostras de laranja in natura	76
Figura 31 - Fluxograma preparo QuEChERS modificado acetato - otimizado	78
Figura 32 - QuEChERS modificado acetato otimizado - etapas de extração e partição...	79

Figura 33 - QuEChERS modificado acetato otimizado – clean-up e concentração do extrato	80
Figura 34 - Tubos de ensaio com uma alíquota de suco e o solvente de extração, sendo (a) diclorometano; (b) acetona; (c) Heptano e (d) Hexano	88
Figura 35 – Montagem da extração líquido-líquido de suco de laranja	88
Figura 36 - Etapas do teste de extração de suco – Método A	89
Figura 37 - Padrão na concentração de 0,005 mg kg ⁻¹ com o pico de dicofol no tempo de retenção de 25,3 minutos	91
Figura 38 - Padrão de 0,025 mg kg ⁻¹ com o pico de Dicofol em 25,3 minutos	91
Figura 39 - Curva de calibração Dicofol feita no programa excel.....	92
Figura 40 - Cromatogramas das amostras de suco analisadas na etapa 1 de desenvolvimento.....	94
Figura 41 - Perfil cromatográfico dos padrões de pesticidas por GC-ECD – método analítico 2	96
Figura 42 - Curva de calibração do pesticida Diclorvós, concentração 0,025 a 0,25 mg L ⁻¹	97
Figura 43 - Curva de calibração do pesticida, concentração de 0,025 a 0,50 mg L ⁻¹	97
Figura 44 - Curva de calibração do pesticida Clorpirifós, concentração de 0,025 a 0,50 mg L ⁻¹	97
Figura 45 - Curva de calibração do pesticida Clorpirifós, concentração de 0,025 a 0,50 mg L ⁻¹	97
Figura 46 – Cromatogramas sobrepostos das análises de GC-MS dos sucos A, D e E por QO e QM	101
Figura 47 - Cromatograma do padrão Dicofol 0,5 mg L ⁻¹ detectado em 19,50 minutos	102
Figura 48 - Espectro de massas do padrão Dicofol 0,5 mg L ⁻¹ . O eixo y representa a abundância em % e o eixo x a relação massa/carga (m/z)	102
Figura 49 - Cromatograma da amostra de suco A - QO sobreposta com o padrão de Dicofol - GC-MS - SCAN	103
Figura 50 - Cromatograma da amostra de suco D - QO sobreposta com o padrão de Dicofol - GC-MS – SCAN.....	104
Figura 51 - Cromatograma da amostra de suco E - QO sobreposta com o padrão de Dicofol - GC-MS - SCAN	104
Figura 52 - Perfil cromatográfico GC-MS - padrão mix 10ppm modo SCAN.....	106
Figura 53 – Sobreposição de cromatograma padrão- método GC-MS SIM e SCAN	107
Figura 54 - Cromatogramas sobrepostos dos diferentes testes de clean-up. Em corte os analitos aproximados para melhor visualização.....	109
Figura 55 - Diagramas de dispersão das curvas de calibração com e sem matriz da Trifluralina, Clorotolanil e Clorpirifós	111

Figura 56 – Diagramas de dispersão das curvas de calibração com e sem matriz da Dicofol e Azoxistrobina	112
Figura 57 - Sobreposição amostra LAR-2 com padrão – GC-ECD	115
Figura 58 - Sobreposição amostra LAR-5 com padrão – GC-ECD	116
Figura 59 - Sobreposição amostra LAR-6 com padrão – GC-ECD	116
Figura 60 - Sobreposição amostra LAR-9 com padrão – GC-ECD	116
Figura 61 - Cromatogramas das amostras de suco de laranja sobrepostas com padrão de Clorpirifós – GC-MS – SIM.	117

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVO	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1 Características dos alimentos Cítricos	20
3.2 Importância econômica da Laranja.....	22
3.3 Principais doenças e pragas em cultura citrus.....	25
3.3.1 Doenças em citros	26
3.3.1.1 Cancro cítrico.....	26
3.3.1.2 Clorose Variegada dos citros (CVC) ou amarelinho	26
3.3.1.3 Doença Greening ou HLB	27
3.3.1.4 Leprose.....	28
3.3.1.5 Doença morte súbita dos citros (MSC).....	28
3.3.1.6 Pinta preta.....	29
3.3.1.7 Podridão floral.....	30
3.3.2 Pragas em citros	30
3.3.2.1 Ácaro da falsa ferrugem	30
3.3.2.2 Bicho Furão.....	31
3.3.2.3 Ortézia	32
3.3.2.4 Escama farinha	32
3.4 Histórico do uso de agrotóxicos no Brasil	33
3.5 Órgãos de regulamentação e fiscalização	36
3.6 ANVISA e controle toxicológico	38
3.6.1 Programa de Análise de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (PARA).....	38
3.7 Características dos pesticidas em estudo.....	39

3.7.1	Trifluralina	39
3.7.2	Clorotalonil	40
3.7.3	Clorpirifós.....	40
3.7.4	Dicofol	41
3.7.5	Azoxistrobina	41
3.8	Técnicas Analíticas	42
3.8.1	Coleta e preparo de amostras	42
3.8.1.1	Laranja Pêra	42
3.8.1.2	Suco de laranja	43
3.8.2	Preparo analítico das amostras	43
3.8.2.1	Breve histórico sobre métodos de preparo para análise de pesticidas	43
3.8.2.2	QuEChERS Original.....	45
3.8.2.3	QuEChERS modificado - Acetato.....	46
3.8.2.4	Clean-up	47
3.8.3	Cromatografia a gás – GC	48
3.8.3.1	Colunas cromatográficas.....	49
3.8.3.2	Detector de Captura de Elétrons - ECD	52
3.8.4	Cromatografia a gás acoplada a Espectrometria de Massas - GC-MS.....	54
3.8.4.1	Espectrometria de Massas – MS.....	54
3.8.4.1.1	Fontes de Ionização.....	55
3.8.4.1.2	Ionização por Impacto de Elétrons (EI)	55
3.8.4.1.3	Analisadores de massas (Filtro de Massas)	57
3.9	Validação Analítica	58
3.9.1	Parâmetros de desempenho	60
3.9.1.1	Seletividade/Efeito matriz.....	60
3.9.1.2	Linearidade/Faixa de trabalho/Faixa linear de trabalho/Sensibilidade	61
3.9.1.3	Limite de Detecção (LD).....	64
3.9.1.4	Limite de quantificação (LQ)	65
3.9.1.5	Tendência/Recuperação	66

3.9.1.6	Ensaio de recuperação	67
3.9.1.7	Precisão	68
3.9.1.7.1	Repetibilidade	69
3.9.1.7.2	Precisão intermediária	70
3.9.1.7.3	Reprodutibilidade	70
3.9.1.7.4	Robustez.....	70
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
4.1	Materiais e reagentes.....	72
4.2	Equipamentos	73
4.3	Procedimento Experimental.....	74
4.3.1	Amostras.....	74
4.3.1.1	Coleta e preparo de amostras.....	74
4.3.1.2	Extração QuEChERS modificado acetato – otimizado	77
4.4	Metodologia analítica	80
4.4.1	Parâmetros de desempenho analítico	80
4.4.1.1	Seletividade/Efeito matriz.....	80
4.4.1.2	Linearidade	81
4.4.1.3	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	83
4.4.2	Curva Analítica.....	83
4.4.3	Análise de pesticidas por GC-ECD.....	84
4.4.4	Análise de pesticidas por GC-MS.....	85
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
5.1	Desenvolvimento – Etapa 1	87
5.1.1	Teste de preparo de amostras 1	87
5.1.1.1	Método A - Extração Líquido-Líquido	87
5.1.1.2	Método B - Extração QuEChERS Original.....	89
5.1.1.3	Método analítico experimental 1 – GC-ECD.....	90
5.2	Desenvolvimento – Etapa 2	95
5.2.1	Método analítico experimental 2 – GC-ECD.....	95

5.2.2	Teste de preparo de amostras 2	98
5.2.3	Método analítico experimental 1 – GC-MS.....	101
5.3	Desenvolvimento Etapa 3.....	105
5.3.1	Método analítico Experimental 3	105
5.3.1.1	GC-ECD.....	105
5.3.1.2	GC-MS.....	106
5.3.2	Preparo de amostras 3.....	107
5.3.2.1	Testes para avaliação da <i>Clean up</i>	107
5.4	Parâmetros de desempenho analítico	110
5.4.1	Seletividade	110
5.4.2	Linearidade	112
5.4.3	Limite de detecção (LD)	113
5.4.4	Limite de quantificação (LQ)	114
5.5	Amostras de laranja e suco de laranja analisadas por GC/ECD e GC/MS	114
6	CONCLUSÃO	119
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
	ANEXO 1 - Perfil cromatográfico da Trifluralina SCAN com confirmação do espectro de massas na biblioteca NIST.	132
	ANEXO 2 - Perfil cromatográfico da Clorotalonil SCAN com confirmação do espectro de massas na biblioteca NIST.	133
	ANEXO 3 - Perfil cromatográfico da Clorpirifós SCAN com confirmação do espectro de massas na biblioteca NIST	134
	ANEXO 4 - Perfil cromatográfico da Dicofol SCAN com confirmação do espectro de massas na biblioteca NIST	135
	ANEXO 5 - Perfil cromatográfico da Clorpirifós SCAN com confirmação do espectro de massas na biblioteca NIST	136

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos cítricos como frutas e sucos são amplamente consumidos no mundo. Além do sabor e aroma agradável, eles possuem grandes quantidades de vitaminas, minerais, carotenoides e flavonoides, substâncias estas que veem sendo relacionadas a benefícios à saúde humana (SILVEIRA, 2014).

O Brasil é o maior exportador de laranja e frutas cítricas do mundo, em especial do suco concentrado de laranja congelado (*Frozen Concentrated Orange Juice - FCOJ*) que é um significativo *commodity* mundial. Segundo o levantamento sistemático de produção agrícola do IBGE até junho de 2020 o Brasil produziu 18.342.154 toneladas de laranja. O Estado de São Paulo é responsável por aproximadamente 73% da produção nacional. (OECD/FAO, 2015; IBGE, 2020; ERPEN et. al, 2018; SOMBRA et.al, 2018).

Com o crescimento da agropecuária o Brasil tornou-se um dos maiores consumidores de defensivos agrícolas do mundo (GURGEL et. al.,2017). Os defensivos agrícolas também conhecidos como agrotóxicos ou pesticidas tem a função de controlar as pragas e doenças que acometem as plantações. O uso dessas substâncias em excesso e a falta de boas práticas agrícolas traz consigo riscos à saúde do trabalhador rural como intoxicações e contaminação do meio ambiente. Os alimentos também podem estar contaminados com resíduos de pesticidas, que serão ingeridos pelo consumidor final (CARNEIRO et. al, 2015).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2018) e DUTRA et. al (2017) os agrotóxicos podem causar efeitos como: irritação dos olhos e da pele, coceira, cólicas, vômito, diarreias, espasmos, dificuldade respiratórias, convulsões e morte. Estudos indicam que a exposição crônica a essas substâncias pode estar relacionada a infertilidade, impotência, abortos, malformações, neurotoxicidade, desregulação hormonal, danos ao sistema imunológico e até mesmo câncer.

Tendo em vista a importância do controle dos agrotóxicos, são necessárias técnicas analíticas cada vez mais sensíveis e confiáveis para

determinação da concentração desses contaminantes em amostras de alimentos (ANVISA, 2006).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho foi propor uma técnica analítica para determinação multirresíduos de pesticidas tais como a Trifluralina, Clorotalonil, Clorpirifós, Dicofol e Azoxistrobina em alimentos cítricos com preparo de amostras por QuEChERS e análise por GC-ECD e GC-MS, fazendo uma avaliação qualitativa de amostras de laranjas e sucos de laranjas consumidos em diferentes regiões de São Paulo.

2.2 Objetivos específicos

- Otimização do método analítico por cromatografia a gás com detector de captura de elétrons (GC-ECD) e Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS);
- Aplicação e comparação de diferentes métodos de preparo de amostras por extração líquido-líquido, QuEChERS original e modificado na matriz de estudo, otimização do método de extração mais eficiente;
- Analisar diferentes amostras de laranja e suco de laranja utilizando o preparo de amostras e análise por GC-ECD e GC-MS otimizados;
- Apresentar parâmetros analíticos de qualidade, demonstrando confiabilidade nos resultados obtidos e na metodologia desenvolvida.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Características dos alimentos Cítricos

De origem subtropical e tropical do sul e sudeste da Ásia mais precisamente da China, os alimentos cítricos chegaram ao Brasil por meio dos portugueses no século XVI (MATTOS et. al, 2005).

Os alimentos cítricos ou gênero *Citrus* provém da família *Rutaceae*, que por sua vez é composta por várias espécies como: Laranjas doces (*Citrus Sinensis*), Limões (*Citrus Limon*), Tangerinas (*Citrus Reticulata*), Limas (*Citrus Aurantifolia*), Pomelos (*Citrus Paradisi*) e Cidras (*Citrus Medica*) (GOMES, 1973).

As laranjas representam aproximadamente 80% da produção brasileira de frutos cítricos e as mais cultivadas são as qualidades: Pêra, Valência, Seleta, Natal, Baía e Baianinha da classe doce e ácida, e da qualidade sem acidez a laranja Lima e Piralima (BRASIL, 2015).

E por que os alimentos cítricos são tão consumidos no mundo? Seus frutos são fontes de fibras, ricos em substâncias como compostos fenólicos, limonoídes e flavonoides que são importantes na nutrição humana e vitaminas como o ácido ascórbico (vitamina C), uma substância antioxidante que reduz a incidência e previne doenças como câncer, doenças degenerativas, cardiovasculares entre outras (COUTO et. al, 2010).

A excelente adaptação a área do interior de São Paulo e cidades vizinhas do triângulo mineiro deve-se ao clima. Os citros se desenvolvem melhor na temperatura de 23 a 32 °C com alta umidade relativa no ar. Quando expostos abaixo de 13 °C ou acima de 40 °C a produtividade diminui devido à queda da taxa de fotossíntese. Em climas mais frios os frutos produzidos têm sabor mais azedo com a coloração da casca e sumo mais intenso. Climas mais quentes favorecem a maturação conferindo um sabor mais doce (MATTOS et. al, 2005).

Nesse trabalho foi estudado a variedade de laranja *Citrus Sinensis* chamada laranja Pêra, sua produção se destaca no Brasil pois além de produzir

quase o ano todo, o suco produzido tem um alto rendimento e qualidade (COELHO et. al, 2019).

Cada 100 g laranja Pêra *in natura* é composta por 89,6 % água, 8,9 g carboidratos, 0,8 g de fibra alimentar, 0,1 g de lipídios, 22 mg de cálcio e 9 mg e magnésio. Já o suco de laranja Pêra a cada 100 g contém 91,3 % água, 7,6 g de carboidratos, 0,7 g de proteínas, 7 mg cálcio e 8 mg de magnésio (LIMA et. al, 2006).

O cultivo da laranja pode ser resumido em três etapas principais: 1ª-vegetação, 2ª floração e 3ª frutificação. Na figura 1 é apresentado desenvolvimento da laranja:

- B - Brotamento -1ª etapa – Vegetação: Início da brotação vegetativa até desenvolvimento do ramo vegetativo na forma madura para o aparecimento dos botões florais.
- D - Aparecimento da Corola – 2ª etapa – *Florescimento*: Com o ramo maduro inicia-se o processo de brotação reprodutiva com o aparecimento de botões florais que crescem e se desenvolvem tornando-se a Corola.
- E - Estames visíveis: Corola no ápice do seu desenvolvimento, na iminência da abertura do botão.
- G - Plena floração: No estágio de plena floração todas as flores se abrem. Esse fenômeno se chama “Antese”.
- H - Queda das pétalas – Etapa 3 – frutificação: Na fase final da floração inicia-se a queda das pétalas, chamada de etapa de transição para a frutificação, no qual dois terços das pétalas já caíram e o ovário do fruto já está em desenvolvimento.
- I - Vingamento: Com o início da frutificação os frutos jovens possuem o diâmetro de 3 a 5 mm.
- J - Crescimento do fruto: Nesta etapa os frutos chegam à etapa final de crescimento com um diâmetro de 60 a 80mm e com a coloração verde-claro com tons amarelados.
- Mudança de cor: após a etapa crescimento o fruto sofre a maturação, etapa essa observada pelo desenvolvimento da cor verde-amarelada para amarelo-alaranjada. O fruto está pronto para a colheita.

Figura 1 - Exemplo de etapas de desenvolvimento da laranja para a produção de frutos

Fonte: AGROZAPP modificado, 2019.

3.2 Importância econômica da Laranja

Apesar do seu cultivo desde a colonização do Brasil, a produção de laranja teve grande expansão na década de 60 para que fosse possível atender a produção para o mercado internacional com o foco nas vendas de sucos concentrados de laranja, sendo o principal produtor o estado de São Paulo. Nesse período foi instaurado o maior parque citrícola do Brasil – Cinturão Citrícola de São Paulo e Triângulo Mineiro. Com a recuperação dos pomares da Flórida nos Estados Unidos na década de 90, o mercado Brasileiro mudou sua rota expandindo a exportação para a Europa (BOTEON, 2012).

Hoje o Brasil é o maior produtor e exportador de laranja e suco de laranja concentrado. Segundo o IBGE a safra brasileira de junho de 2019 obteve a produção de 17.614.270 de toneladas de laranja, no mesmo período de 2020 chegamos à marca de 18.342.154 toneladas (IBGE, 2020).

Segundo o Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) o cinturão Citrícola de São Paulo e Minas Gerais possuem 175.269 milhões de árvores produtivas na safra 2018/2019, responsáveis por 61% da produção mundial de suco de laranja, gerando 200 mil empregos diretos e indiretos. A estimativa de produção

da safra de 2019/2020 foi de 386,79 milhões de caixas de laranja (FUNDECITRUS, 2020, CITRUS BR, 2017).

Na figura 2 demonstra-se as principais cidades produtoras do Estado de São Paulo, nas quais estão instaladas grande parte das indústrias que abastecem o mercado de consumo e exportação de laranjas e derivados.

Figura 2 - Principais cidades produtoras de laranja no interior de São Paulo

Município	Qtde de extratoras	Indústria	Município	Qtde de extratoras	Indústria
1 Matão	180	Citrosuco	12 Catanduva	66	Citrovita
2 Limeira	60		13 Araras	66	
3 Bebedouro	72		14 Matão	56	
4 Colina	96	Cutrale	15 Mirassol	24	Bascitros
5 Araraquara	84		16 Dobrada	12	KB
6 Conchal	44		17 Rio Claro	7	Selial Citros
7 Uchoa	42		18 Itajobi	6	Agromex
8 Itápolis	24	Dreyfus	19 São Carlos	6	Hildebrand
9 Bebedouro	84		20 Santa Cruz do Rio Pardo	5	Guacho
10 Matão	70				
11 Eng. Coelho	60				

Fonte: NEVES et. al, 2010 modificado

O suco de laranja é o suco mais consumido no mundo. Pode-se dizer que a cada cinco copos de suco, três são de laranjas brasileiras (NEVES et. al, 2010).

Nos últimos 12 anos com a aparição do *Greening*, uma doença transmitida por um inseto chamado *psílídeo* que dizima as laranjeiras, a Flórida nos Estados Unidos que é o 2º maior produtor de laranja no mundo reduziu sua produção de citros em mais de 54%, causando prejuízos de mais de 9 bilhões de dólares e 7500 empregos a menos. Plantações no mundo inteiro foram afetadas e está sendo feito uma campanha fitossanitária mundial, pois ainda não há cura, somente a prevenção da proliferação do inseto. Com esse impacto na produção de laranja nos Estados Unidos (EU), o mercado de exportação do suco brasileiro tem se mantido aquecido. Além dos EU, a Europa é grande consumidora das laranjas brasileiras (consome aproximadamente 71% do suco exportado pelo Brasil), conforme a figura 3 (FUNDECITRUS, 2019).

Figura 3 - Principais consumidores de suco de laranja Brasileiro

Fonte: CNA modificado, 2019.

A oferta de suco de laranja no mercado interno brasileiro é grande e ao chegar nos supermercados nos deparamos com prateleiras cheias de qualidades diferentes. A definição de suco segundo o decreto nº 6871 de 4 de junho de 2009, seção II, Art. 18:

Suco ou sumo é a bebida não fermentada, não concentrada, ressaltados os casos a seguir especificados, e não diluída, destinada

ao consumo, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo.

Portanto, com referência da definição de suco temos três principais tipos de classificação: *Integral*: suco da fruta na sua concentração natural sem adição de açúcares; *Concentrado*: suco parcialmente desidratado, sendo removido parte da água natural e *Reconstituído*: suco reconstituído a partir do suco concentrado de forma que atenda os parâmetros de qualidade do suco integral (CITRUS BR, 2019).

O néctar de laranja também é um produto bem consumido no Brasil e tem o valor agregado menor devido a quantidade de suco contido ser reduzida. Além disso pode ser adicionado açúcar e aditivos no seu preparo (CITRUS BR, 2019). Segundo a Instrução normativa nº 42 de 11 de setembro de 2013 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA:

Art. 3º O néctar de laranja e o néctar de uva deverão conter uma quantidade mínima de suco da respectiva fruta, conforme a seguir:
I - 30% (m/m) (trinta por cento massa massa) a partir da publicação desta Instrução Normativa;
II - 40% (m/m) (quarenta por cento massa massa) a partir de 31 de janeiro de 2015; e
III - 50% (m/m) (cinquenta por cento massa massa) a partir de 31 de janeiro de 2016.

Tendo em vista a extensão da produção brasileira de laranja e sua importância econômica e social, o controle de pragas e doenças torna-se essencial. Para que isso ocorra a aplicação de pesticidas faz-se necessária. A determinação de resíduos de pesticidas tem grande importância para estimar a exposição humana e do meio ambiente a estes compostos, sendo possível avaliar se a produção agrícola do país possui boas práticas agrícolas, possibilitando decisões regulatórias comerciais que visam garantir a segurança alimentar (ANVISA, 2012).

3.3 Principais doenças e pragas em cultura citrus

O Fundecitrus é uma associação privada que é mantida por produtores e indústrias para a investigação de doenças e pragas em citros. Há mais de 20 anos vem estudando as doenças e pragas para cultivo citros. As informações sobre as

principais doenças e pragas descritas nesse capítulo foram consultadas da plataforma de pesquisa da Fundecitrus (FUNDECITRUS, 2019).

3.3.1 Doenças em citros

3.3.1.1 Cancro cítrico

O Cancro cítrico foi relatado pela primeira vez em 1957 nos Estados de São Paulo e Paraná. É uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* e os principais efeitos são: desfolha de plantas, lesões nos frutos e galhos e redução na produção devido queda prematura dos frutos. Na figura 4 é demonstrado as características de frutos e galhos contaminados. Há restrição de comercialização nas regiões onde a doença se propaga devido ao perigo de contaminação. O Cancro Cítrico não provoca a morte das árvores.

Figura 4 - Doença Cancro cítrico

Fonte: FUNDECITRUS, 2019a colocar a nos outros

3.3.1.2 Clorose Variegada dos citros (CVC) ou amarelinho

A bactéria *Xylella Fastidiosa* que é a causadora da doença “amarelinho” atinge o xilema que são os tecidos condutores, obstruindo a passagem de água e nutriente da raiz para a copa. Os frutos contaminados ficam duros, pequenos e podem cair precocemente conforme demonstra a figura 5 (da esquerda para a direita a comparação de um fruto normal e um fruto pequeno com a doença, seguido das folhagens com manchas amarelas características). O manejo da doença é feito com a substituição por mudas sadias, poda de ramos que estão com os sintomas da doença e controle das cigarrinhas que são insetos vetores da bactéria.

Figura 5 - Doença CVC – Clorose Variegada dos citros ou amarelinho

Fonte: FUNDECITRUS, 2019a

3.3.1.3 Doença Greening ou HLB

O *Greening* é conhecido como HLB ou *Huanglongbing*. A principal bactéria causadora da doença é a *Candidatus Liberibacter Asiaticus* e sua disseminação ocorre por meio de um inseto da espécie psíldeo *Diaphorina Citri*, característicos das árvores Dama da noite. Conforme demonstrado na figura 6 da esquerda para a direita: o inseto psíldeo, seguido dos sintomas da doença que são o amarelamento das folhas de forma irregular (amarelada em plantas jovens e marrom-amareladas em plantas maduras) e os frutos não amadurecem, adquirem coloração verde clara manchada e caem precocemente. Outro sintoma pode ser a queda precoce das folhas e as que nascem em seu lugar ficam com aparência de orelhas de coelho. A doença foi identificada em toda a região da América do Sul e América do Norte. O interior do fruto não se desenvolve e o sabor dessas frutas fica mais ácido e amargo. A bactéria fica alojada nas “veias” da planta e contamina da raiz ao tronco e ramos. A planta contaminada pode demorar até quatro meses para demonstrar sintomas, e isso pode acarretar a contaminação de outras plantas saudáveis. O controle do psíldeo é fundamental para a prevenção da doença.

Figura 6 - Doença *Greening* ou HLB

Fonte: FUNDECITRUS, 2019a, modificado

3.3.1.4 Leprose

A Leprose foi identificada em 1933 no Estado de São Paulo, ocorre de forma endêmica em todas as áreas do planalto paulista, em especial nas regiões do norte e nordeste. É uma doença característica das regiões subtropicais e tropicais, restritas nas américas e acomete espécies doces.

A leprose é provocada por um vírus chamado *Citrus Leprosis vírus* e é transmitido pelo ácaro *Brevipalpus Phoenixis*, causando perdas de produção e redução de vida útil das árvores contaminadas. Conforme apresentado na figura 7, da esquerda para direita, os frutos apresentam lesões necróticas rasas, as folhagens são acometidas de lesões lisas e arredondadas que atingem as duas faces com coloração verde claro e amarela e possíveis necroses marrons no centro das lesões, nos ramos e galhos provocam a necrose marrom avermelhada.

Quando as lesões atingem grande parte da planta, causam queda precoce do fruto e folhas.

Figura 7 - Doença Leprose

Fonte: FUNDECITRUS, 2019a, modificado

3.3.1.5 Doença morte súbita dos citros (MSC)

A doença conhecida como morte súbita dos citros age de forma destrutiva, sendo uma ameaça a citricultura nacional por afetar tanto laranjeiras doces e tangerinas que são enxertadas em porta-enxertos intolerantes como limoeiro cravo volkameriano e rugoso. Esse tipo de porta-enxerto é muito utilizado pois não precisa de irrigação e garante o rápido desenvolvimento da plantação. A doença ainda não tem causa definida, suspeita-se que o organismo responsável possa ser uma variação do vírus Tristeza do Citros (CTV) e/ou pelo CSDAV (*Citrus Sudden Death associated virus*), transmitido por um vetor aéreo. Na figura 8 pode ser observado alguns sintomas da doença como, da esquerda para a direita as

folhas com perda de brilho e coloração amarelo-alaranjado. Essa característica se estende por toda a planta, o que indica que o sistema radicular está afetado e ocasionando a não entrega de nutrientes. Ao retirar a casca na parte interna que fica próximo ao enxerto, nota-se a coloração amarelo-alaranjada ao fazer uma raspagem.

Figura 8 - Doença MSC

Fonte: FUNDECITRUS, 2019a modificado

Esses sintomas são observados pelo citricultor, sendo que em um estágio mais inicial há pouca brotação e desfolha parcial, e no estágio mais avançado há desfolha total da planta.

3.3.1.6 Pinta preta

Essa doença é causada pelo fungo *Phyllosticta Citricarpa* (*Guignardia Citricarpa*) que se multiplica por esporos assexuais em frutos, folhas e ramos secos da planta e por esporos sexuais em folhas que caem no solo.

Acomete todas as variedades de laranjas doces, limões verdadeiros e tangerinas híbridas. As plantas com maturação tardia são mais afetadas. Os frutos sofrem queda prematura impactando na produtividade da lavoura. Plantas mal nutridas são mais prejudicadas devido a uma maior queda dos frutos. Na figura 9 é demonstrado da esquerda para direita o meio de cultura contendo o fungo *Phyllosticta Citricarpa*, seguido por dois frutos acometidos da doença que deixa manchas superficiais na casca sem comprometer a qualidade do suco e não causa danos à saúde, porém a aparência manchada diminui seu valor de comercialização “in natura”.

Figura 9 - Doença da Pinta Preta

Fonte: FUNDECITRUS, 2019a, modificado

3.3.1.7 Podridão floral

A podridão floral também conhecida como “estrelinha” é causada por fungos de diferentes espécies do complexo *Colletotrichum acutatum* e *C. Gloeosporioides* que afetam o desenvolvimento das flores de citros. Essa doença afeta todas as variedades de citros, mas tem demonstrado danos mais severos em laranjas doces como a Natal, Pêra, Bahia e Baianinha. O período de chuva agrava a proliferação da doença. Conforme a figura 10, vista da esquerda para direita as flores ficam lesionadas e os frutos recém-formados caem prematuramente, os cálices que ficam após a queda do fruto são conhecidos popularmente como “estrelinhas” devido a seu formato. No tratamento é recomendado a aplicação de fungicidas como estrobilurinas e triazóis.

Figura 10 - Doença Podridão Floral

Fonte: FUNDECITRUS, 2019a modificado

3.3.2 Pragas em citros

3.3.2.1 Ácaro da falsa ferrugem

Ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta Oleivora*), da família *Eriophyidae* infesta as folhas dos citros, causando manchas de forma irregular e de coloração escura na superfície e borda, destruindo a epiderme, injetando toxinas por meio da

saliva reduzem a capacidade da fotossíntese da planta. Na figura 11 da esquerda para direita é apresentado o ácaro em imagem aumentada, seguida de imagem do ácaro sobre o fruto. A laranja acometida por esse ácaro fica com manchas amareladas e necroses centralizadas.

Figura 11 - Praga Ácaro da falsa ferrugem e frutas danificadas

Fonte: FUNDECITRUS, 2019a modificado

3.3.2.2 Bicho Furão

A mariposa *Gymnandrosoma aurantianum*, mais conhecida como bicho furão compromete os frutos citros causando o apodrecimento e queda, inutilizando-o tanto para fabricação de sucos como consumo “in natura”. Na década de 90 foi uma das principais pragas disseminada na cultura citros. O tratamento pode ser feito por meio da aplicação de inseticidas químicos, biológicos e reguladores de crescimento de insetos, que devem ser aplicados após as 17h, horário o qual a mariposa acasala e coloca os ovos nos frutos. Na figura 12 é apresentado da esquerda para a direita a mariposa, seguido por fruto doente que contém a larva da mariposa e fruto com características de ovo-deposição na sua superfície.

Figura 12 - Praga Bicho Furão

Fonte: FUNDECITRUS, 2019a modificado

3.3.2.3 Ortézia

A cochonilha Ortézia (*Orthezia Praelonga*) foi registrada a primeira vez no Brasil em 1938 em Pernambuco. Acomete não somente variedade citros, mas também o café e cerca de trinta espécies ornamentais. A Ortézia possui o ovissaco, local de depósito dos ovos no qual inseticidas nem inimigos naturais podem alcançar, dificultando o controle químico e biológico. Ao sugar a seiva da planta o inseto injeta toxinas que enfraquecem a árvore causando queda de frutos e desfolha. Na figura 13 pode ser observado a praga cochonilha na folha e ramos de laranjeiras.

Figura 13 - Praga Cochonilha Ortézia

Fonte: FUNDECITRUS, 2019a modificado

3.3.2.4 Escama farinha

Escama farinha (*Unaspis Citri*) também é uma cochonilha, porém de carapaça, que em grandes populações causa perda de vigor e rachaduras na planta. Se transporta pelo vento e pelo manejo do ser humano, utilizando ferramentas de cultivo e até mesmo o próprio traje. Essa praga favorece a infecção por fungos e outras doenças na planta infestada. Na figura 14 pode ser observado da esquerda para a direita a imagem aproximada da infestação do tronco de uma laranjeira, seguido por galhos e ramas com a presença do mesmo inseto. A aplicação de piretroides e neonicotinoídes deve ser utilizada com cautela para evitar o surto de proliferação.

Figura 14 - Praga Escama farinha

Fonte: FUNDECITRUS, 2019a modificado

3.4 Histórico do uso de agrotóxicos no Brasil

O decreto de lei nº 4074 de 04 de janeiro de 2002 define agrotóxicos e afins no Artigo 1, parágrafo IV:

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

A FAO -Food and Agriculture Organization (2003), agência da ONU responsável pela segurança alimentar define agrotóxicos como:

Qualquer substância, ou mistura de substâncias, usadas para prevenir, destruir ou controlar qualquer praga – incluindo vetores de doenças humanas e animais, espécies indesejadas de plantas ou animais, causadoras de danos durante (ou interferindo na) a produção, processamento, estocagem, transporte ou distribuição de alimentos, produtos agrícolas, madeira e derivados, ou que – ou que deva ser administrada para o controle de insetos, arcnídeos e outras pestes que acometem os corpos de animais de criação.

As denominações para agrotóxicos são muitas tais como: pesticidas, defensivos agrícolas, praguicidas entre outros e todas estão relacionadas com substâncias químicas que são utilizadas para controle de doenças e pragas na agricultura (PAVANI, 2016).

Históricamente, a segunda guerra mundial foi um marco para o avanço técnico-científico na formulação de substâncias organossintéticas com características pesticidas (VELASCO, 2006).

Na década dos anos 40 é notável o desenvolvimento da primeira linha de produtos sintéticos, os organoclorados. Neste grupo encontra-se o diclorodifeniltricloreto (DDT), desenvolvido inicialmente para aplicação bélica, porém com a descoberta do químico suíço Paul Müller sobre sua forte ação pesticida, este foi rapidamente adotado no setor agrícola no controle de pragas, apresentando alta eficiência em curto prazo de aplicação. Com o sucesso dessas substâncias ocorreu grande disseminação do uso de agroquímicos, ocasionando mudanças significativas nos métodos de controle fitossanitários aplicados a agricultura (RODRIGUES, L. 2012).

No Brasil o uso de agrotóxicos começou em programas de saúde pública, no controle de parasitas. Em 1975, por meio do Plano Nacional de Desenvolvimento foi iniciada uma política de abertura ao comércio de agrotóxicos, facilitando a aquisição de agroquímicos por parte dos agricultores. Essa política de incentivo e a eficiência da ação dos agrotóxicos no combate às pragas resultaram na expansão do uso dessas substâncias no Brasil (PAS/OMS, 1996).

A composição dos agrotóxicos tem o propósito de exterminar, repelir ou controlar pragas. Sua formulação básica é: Ingrediente ativo, diluente e aditivo. O ingrediente ativo é o próprio pesticida que se encontra na forma sólida ou líquida. O diluente é o composto que ajuda na dispersão de forma mais homogênea e suspensão do pesticida de forma mais segura. Os aditivos são substâncias surfactantes que tornam os agrotóxicos mais eficientes pela melhora de suas propriedades químicas, físicas e biológicas (SANTOS et. al, 2007).

A ANVISA permite a aplicação de formulações contendo diferentes tipos de pesticidas, para que tenha uma ação mais abrangente sobre os cultivos às quais é aplicada. A soja é um exemplo. No seu cultivo é permitido o uso de mais de 300 formulações contendo 130 tipos de pesticidas diferentes. Mesmo seguindo as Boas Práticas Agrícolas (GAP) e a aplicação de concentrações dentro dos limites máximos de resíduos (LMR), ainda são identificados e quantificados seus resíduos

nos alimentos, podendo levar a intoxicação crônica dos consumidores, colocando em risco a segurança alimentar (PIZZUTTI, 2006).

O consumo de pesticidas no Brasil vem aumentando consideravelmente desde 1991, quando o consumo brasileiro era sete vezes menor que os Estados Unidos. Em 2015 a quantidade consumida pelo Brasil e Estados Unidos ficou semelhante, chegando a quase 10% do consumo mundial. Em 2015 o Brasil consumiu cerca de 643 mil toneladas de pesticidas. É notável que o crescimento da produção agrícola brasileira tenha sido expandida na década de 90, o que torna o consumo de agrotóxicos maior, com o aumento da produção e uso de agrotóxicos a influencia no setor também é crescente assim como o risco de captura regulatória (MORAES, 2019).

Segundo dados do MAPA (2020), de 2015 a 2019 a quantidade de pesticidas registrados do Brasil tem sido crescente, conforme é mostrado na figura 15. Observando os dados de 2015 com 139 registros para 2019 com 474 registros, ocorreu um aumento anual de aproximadamente 341%.

Figura 15 - Indicador de registros anuais de pesticidas no Brasil - MAPA

Fonte: MAPA, 2020

3.5 Órgãos de regulamentação e fiscalização

No Brasil o registro de agrotóxicos é executado com base na lei 7802 de 11 de julho de 1989 e decreto 4.074 de 2002. Os órgãos Federais responsáveis pelo processo de registro, avaliação da eficácia, riscos toxicológicos entre outras funções relacionadas aos pesticidas são o MAPA (ministério da Agricultura e Abastecimento), ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis). As atribuições de cada órgão foram apresentadas de forma resumida na tabela 1.

Tabela 1 - Resumo de responsabilidades relacionadas aos agrotóxicos atribuídas a cada órgão Federal do governo brasileiro

Ministério da Agricultura	Ministério da Saúde	Ministério do Meio Ambiente
Avaliação da Eficiência Agronômica	Monitoramento toxicológico (Toxicovigilância)	Monitoramento Ambiental
Fiscalização da produção importação e exportação	Avaliação e classificação toxicológica aos seres humanos	Avaliação da periculosidade Ambiental e toxicológica ao meio ambiente
Coordena as ações nacionais de fiscalização	Definição dos limites máximos de resíduos (LMR)	Relatórios de comercialização, exportação e importação
Representado pelo MAPA	Representado pela ANVISA	Representado pelo IBAMA

Fonte: BRASIL, 2002 modificado.

Cada um dos órgãos MAPA, ANVISA e IBAMA tem autorização para executar os registro de agrotóxicos e até mesmo o RET (registro especial temporário) utilizado somente para fins especiais estudos e pesquisa, porém esta aprovação se dá somente se todo o processo estiver aprovado pelos demais integrantes nas suas áreas de especialidade. Portanto, quando uma indústria pede o registro de um agrotóxico, deve aplicar a cada um dos três órgãos federais documentações específicas e individuais (BRASIL, 2002).

O projeto de Lei 6299/2002 tramita na Câmara dos deputados desde 2002, sendo sua proposta a mudança de alguns artigos da lei nº 7802/1989. As principais mudanças seriam a nomenclatura de “agrotóxico” passaria a “produto fitossanitário” e o registro de agrotóxicos passa a ser de responsabilidade do MAPA. O prazo para tramitação do registro passa a doze meses, e quando ultrapassa esse período o agrotóxico recebe o registro especial temporário desde que já tenha sido aprovado em três países que façam parte da Organização para cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE). Em junho de 2018 foi apresentado pelo relator deputado Luiz Nishimori um substitutivo com 29 apensados ao projeto de lei PL 6299/2002. A Comissão Especial que avalia assuntos relacionados a legislação de agrotóxicos aprovou o substitutivo do deputado que seguiu para tramitação na Câmara dos Deputados. A principal medida do relator é o poder de registro e reavaliação ao MAPA conforme já previsto na PL 6299 (AGÊNCIA CÂMARA DE NOTÍCIAS, 2018; BRASIL, 2019a).

Em reação a estas propostas de lei e substituvos em tramitação na Câmara, a ANVISA, IBAMA, FIOCRUZ e INCA, além de empresas privadas se manifestaram contrárias a esses projetos de lei, tendo em vista que põem em risco

a segurança alimentar com o afrouxamento das normas atuais, bem como o risco do interesse econômico sobressair aos interesses de segurança toxicológica e ambiental do país (ANVISA, 2018a; IBAMA, 2018; FIOCRUZ, 2018; INCA, 2018; BRITO, 2020).

3.6 ANVISA e controle toxicológico

A ANVISA é uma autarquia sob regime especial, criada pela lei 9.782 de 26 de janeiro de 1999, sendo responsável por regulamentar, controlar e fiscalizar produtos e serviços que envolvam riscos a saúde pública, respeitando a legislação brasileira vigente (BRASIL, 1999).

A ANVISA autoriza, monitora, revalida, e exclui as monografias de pesticidas de acordo com os estudos de toxicidade e segurança alimentar, sendo responsável por estabelecer o Limite Máximo de Resíduo de pesticidas (LMR) em alimentos e o uso correto do agroquímico na fase correta de desenvolvimento da plantação, evitando contaminações do alimento por mau uso da substância. O valor de LMR pode ser expresso em ppm ou mg kg^{-1} (ANVISA, 2012).

O Orgão internacional que regulamenta as normas e diretrizes para alimentos é o *Codex Alimentarius*, vinculado a *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO-ONU)*. Na falta de parâmetros ou referências na legislação brasileira, podem ser utilizadas as diretrizes do *Codex Alimentarius*. Como não há LMR específico para suco de laranja nos parâmetros da ANVISA, segundo o *Codex Alimentarius* os valores de referência adotados podem ser os mesmos que para o fruto *in natura* (ANVISA, 2012; CODEX ALIMENTARIUS, 2018).

3.6.1 Programa de Análise de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (PARA)

O PARA é o Programa de Análise de Resíduos de Pesticidas em Alimentos realizado pela ANVISA, no qual é disponibilizado o Procedimento Operacional Padrão (POP) de todas as atividades como coleta, registro e armazenamento de amostras para análise multirresíduos de pesticidas. O monitoramento é feito pela agência em todos os Estados Brasileiros através de uma rede de laboratórios oficiais e equipes de fiscalização. No estado de São Paulo o laboratório responsável é o Instituto Adolfo Lutz.

Com base nos resultados do relatório de atividades do PARA de 2013 a 2015 foram escolhidos três dos cinco pesticidas em estudo. Segundo o relatório 744 amostras de laranja foram analisadas no período de 2013 a 2015. Das 744 amostras, 684 apresentaram resultados satisfatórios (141 amostras sem resíduos de pesticidas e 543 amostras com concentração de resíduos de pesticidas $\leq$ ao LMR.). Dentro de uma lista de 209 pesticidas pesquisados, foram encontrados 64 agrotóxicos sendo os ativos Piraclostrobina (226 amostras), Clorpirifós (219 amostras) e Carbedazim (208 amostras) os que foram detectados em uma quantidade maior de amostras. Os três pesticidas escolhidos com base neste estudo foram: Azoxistrobina (71 amostras contaminadas), Clorpirifós (217 amostras contaminadas) e Dicofol (30 amostras contaminadas). Os outros dois pesticidas escolhidos foram a Trifluralina e o Clorotalonil, que são pesticidas utilizados para cultura citros (AGROFIT, 2019; ANVISA, 2016).

3.7 Características dos pesticidas em estudo

3.7.1 Trifluralina

O pesticida Trifluralina tem função herbicida e possui a nomenclatura α,α,α - trifluoro-2,6-dinitro-*N,N*-dipropyl-*p*-toluidine. É uma substância do grupo químico Dinitroanilina e tem ação herbicida. A figura 16 representa sua estrutura, massa molecular 335,283 g mol⁻¹, fórmula molecular C₁₃H₁₆F₃N₃O₄ e nº CAS 1582-09-8. O LMR permitido pela ANVISA é de 0,05 mg kg⁻¹ para cultura citros (EURL, 2019; ANVISA, 2018).

Figura 16 - Estrutura do pesticida Trifluralina

Fonte: Autor, 2019

3.7.2 Clorotalonil

O pesticida Clorotalonil de nomenclatura *tetrachloroisophthalonitrile*, é uma substância pertencente ao grupo químico isoftalonitrila. Possui a característica fungicida, massa molecular $265,91 \text{ g mol}^{-1}$, fórmula molecular $\text{C}_8\text{Cl}_4\text{N}_2$ e nº CAS 1897-45-6. O LMR permitido pela ANVISA é de $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ para cultura citros. A figura 17 representa sua estrutura (EURL, 2019; ANVISA, 2018).

Figura 17 - Estrutura do pesticida Clorotalonil

Fonte: Autor, 2019

3.7.3 Clorpirifós

O Clorpirifós possui a nomenclatura *O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate*, é uma substância que pertence ao grupo químico organofosforados. Tem a característica inseticida, formicida e acaricida, massa molecular $350,57 \text{ g mol}^{-1}$, fórmula molecular $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{NO}_3\text{PS}$ e nº CAS 2921-88-2. Segundo a base de dados do MAPA chamada Agrofit, o Clorpirifós é utilizado no tratamento da doença Orthezia e *Greening* em citros. O LMR permitido para cultura citros é de $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$. A figura 18 representa sua estrutura (EURL, 2019; ANVISA, 2018; AGROFIT, 2019).

Figura 18 - Estrutura do pesticida Clorpirifós

Fonte: Autor, 2019

3.7.4 Dicofol

O pesticida Dicofol de nomenclatura *2,2,2-trichloro-1,1-bis(4-chlorophenyl) Ethan-1-ol* é uma substância com característica acaricida, pertencente ao grupo químico dos organoclorados. Possui massa molecular $370,475 \text{ g mol}^{-1}$, estrutura molecular $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{Cl}_5\text{O}$ e nº CAS 115-32-2. Ele era utilizado para controle do ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta Oleivora*) (AZEVEDO, 2006), porém em janeiro de 2017 esse ativo foi banido das monografias da ANVISA, sendo proibido seu uso em qualquer cultivo no Brasil. A figura 19 representa sua estrutura (EURL, 2019; ANVISA, 2018).

Figura 19 - Estrutura do pesticida Dicofol

Fonte: Autor, 2019

3.7.5 Azoxistrobina

A Azoxistrobina de nomenclatura *methyl (2E)-2-{2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy]phenyl}-3-methoxyacrylate* é uma substância com características fungicidas e pertence ao grupo químico da Estrobilurina. Segundo a base de dados do MAPA o Agrofít, a Azoxistrobina é utilizada no tratamento da

doença pinta preta. Possui massa molecular 403,4 g mol⁻¹, estrutura molecular C₂₂H₁₇N₃O₅ e CAS 131860-33-8. O LMR permitido pela ANVISA para cultura citros é de 0,5 mg kg⁻¹. A figura 20 representa sua estrutura (EURL, 2019; ANVISA, 2018).

Figura 20 - Estrutura do pesticida Azoxistrobina

Fonte: Autor, 2019

Dentre os pesticidas em estudos, o Clorotalonil e o Clorpirifós estão na lista de reavaliação da ANVISA. Há indícios o Clorpirifós cause neurotoxicidade para o desenvolvimento (estudo internacional) e que o Clorotalonil seja carcinogênico (ANVISA, 2019a).

3.8 Técnicas Analíticas

As técnicas analíticas são divididas em várias etapas que compreendem desde a coleta de amostras até a determinação dos analitos de interesse utilizando instrumentos analíticos como GC-ECD e GC-MS, sendo cada etapa importante para obtenção de resultados representativos e confiáveis.

3.8.1 Coleta e preparo de amostras

3.8.1.1 Laranja Pêra

Afim de garantir que coleta e preparo de laranjas para que estejam aptas a preparo analítico aconteçam de forma padronizada e com rigor científico, devem ser utilizadas diretrizes de órgãos como a ANVISA e *Codex Alimentarius*.

A coleta baseada no Procedimento Operacional Padrão (POP) do PARA, estabelece que para laranja (classe citrus) é necessária a quantidade mínima de

dez unidades que juntas possuam massa de ≥ 1 kg. As amostras coletadas devem ser encaminhadas para o acondicionamento e preparo de forma rápida a fim de garantir a integridade do alimento (ANVISA, 2012a, ANVISA, 2019).

O preparo das amostras de laranja para a etapa analítica, com base nas recomendações do *Codex Alimentarius* “*RECOMMENDED METHODS OF SAMPLING FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES FOR COMPLIANCE WITH MRLS CAC/GL 33-1999*” recomenda que cada unidade de laranja seja quarteada, ou seja, cortada em quatro partes, sendo coletadas duas partes opostas. As partes coletadas devem ser trituradas em um liquidificador ou similar, com a formação uma massa homogênea, evitando-se o aumento de temperatura à garantir a integridade dos pesticidas. Com a homogeneidade da amostra, a etapa seguinte é o preparo analítico e o material sobressalente pode ser armazenado no freezer caso seja necessário análises confirmatórias futuras.

3.8.1.2 Suco de laranja

Amostras de suco de laranja industrializado são considerados *commodities* e não há legislação ou metodologia de coleta e preparo específicos no POP do PARA.

O *Codex Alimentarius* recomenda que os *commodities* sejam analisados como a sua fruta matriz e sejam aplicados os mesmos LMR (*CODEX ALIMENTARIUS*, 1999; ANVISA, 2012; ANVISA, 2019).

3.8.2 Preparo analítico das amostras

O preparo analítico das amostras de laranja e suco de laranja é a etapa na qual um procedimento de extração dos analitos de interesse pode ser aplicado a amostras previamente homogeneizadas conforme descrito no item 3.8.1. para que seja possível a posterior determinação dos pesticidas no GC-ECD e GC-MS.

3.8.2.1 Breve histórico sobre métodos de preparo para análise de pesticidas

Os métodos convencionais para preparo analítico de amostras orgânicas são processos vigorosos que consomem tempo e grandes volumes de solvente orgânico. A procura por métodos de preparo mais limpos, eficientes com menor impacto ambiental têm sido desenvolvidos (RISSATO et. al, 2005).

Na década de 60 o método multirresíduos pioneiro desenvolvido por Mills et al. visava a determinação de pesticidas organoclorados apolares em alimentos não gordurosos. O procedimento era baseado na extração com acetonitrila e partição com uma solução de acetonitrila e água. Pesquisadores na década de 70 incluíram cloreto de sódio no denominado “método de Mills” como melhoria do processo de partição.

Com a necessidade da análise de agrotóxicos mais polares, em 1975 o pesquisador Milton A. Luke e sua equipe criaram o método Luke, no qual 100g de amostra eram extraídas com 200mL de acetona, com partição líquido-líquido com solventes apolares (100ml de éter de petróleo e 100mL de diclorometano). Para melhoria da recuperação de compostos polares, foi adicionado o cloreto de sódio na fase aquosa, favorecendo a transferência dos compostos orgânicos para a fase orgânica. A retirada de água co-extraída era retirada com adição de sulfato de sódio anidro. Uma última etapa era a limpeza da amostra com uma coluna contendo Florisil, que é um adsorvente constituído de silicato de magnésio. Em 1981 o pesquisador Milton A. Luke e sua equipe fizeram uma melhoria no método Luke, retirando a etapa de limpeza com Florisil, em decorrência do surgimento da espectrometria de massas.

Nas décadas de 80 a 90 ocorreram melhorias no método Luke, sendo que em 1987 o ministério da agricultura da Holanda criou um método de extração mini-Luke, no qual utilizava uma quantidade reduzida de amostra e solventes e retirava o particionamento com cloreto de sódio do método Luke original.

Com a necessidade da redução de solventes tóxicos como diclorometano, o pesquisador Lozano e sua equipe desenvolveram a miniaturização do método mini-Luke, nomeado como *New Dutch mini-Luke* ou método NL que foi validado e implementado nos laboratórios da *Netherlands food and consumer product safety authority* (VARELI, 2018).

NAKANO et al utilizaram o método Mini Luke para avaliar pesticidas em laranja Pêra utilizando um GC-micro ECD. Dentre os pesticidas analisados, Clorpirifós e Dicofol foram encontrados nas amostras, indicando o uso sistêmico,

que pode desenvolver a resistência das pragas as quais são submetidas a esse tratamento agroquímico (NAKANO et al, 2016).

Em 2003 ANASTASSIADES et. al desenvolveram um método de preparo de amostras chamado QuEChERS, sigla em inglês que significa *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* (Rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro). Este método moderno tem sido bastante divulgado, sendo empregado no preparo de amostras complexas como as amostras de alimentos. PRESTES et. al (2011) apresenta uma comparação das principais técnicas modernas de extração indicando que o método QuEChERS representa o estado da arte na determinação multirresíduos de pesticidas em alimentos.

3.8.2.2 QuEChERS Original

O processo de extração por QuEChERS consiste em três etapas: 1ª extração com solvente; 2ª adição de sais para partição da amostra e 3ª limpeza com fase sódida dispersiva (*Clean-up*). Inicialmente é adicionado uma alíquota de solvente acetonitrila a uma porção de amostra. Após agitação uma mistura de sais é acrescentada e a mistura agitada novamente. Os sais adicionados tem efeito "Salting-out", ou seja, os sais ficam dissolvidos na fase mais polar (no caso a água) e o solvente fica menos solúvel na fase aquosa, ocorrendo a formação de duas fases (água + sais e solvente acetonitrila + analitos). O método utiliza como solvente a acetonitrila pois ela é menos lipofílica, evitando a co-extração de substâncias interferentes de matriz. Após a extração é feita uma etapa de *clean-up* utilizando-se $MgSO_4$ e PSA (do inglês *primary secondary amine* - amina primária secundária). O $MgSO_4$ é adicionado para remoção de resíduos de água como agente secante. O sorvente PSA tem a função de remover interferentes de matriz, através da sua estrutura bidentada que tem efeito quelante. Esta estrutura retém ácidos graxos livres, açúcares e pigmentos (PRESTES et. al, 2009, ANASTASSIADES et. al; 2003). A figura 21 apresenta o fluxograma do método QuEChERS Original.

Figura 21 - Fluxograma com as etapas do método QuEChERS Original

Fonte: Autor, 2019

3.8.2.3 QuEChERS modificado - Acetato

O método QuEChERS Modificado foi aprimorado por LEHOTAY et. al (2005). Foram modificadas algumas proporções e adicionado o efeito de tamponamento para pH 4,8. No método modificado o solvente acetonitrila é acidificado a 1% de ácido acético e usa-se MgSO₄ com Acetato de sódio Anidro (ao invés de cloreto de sódio). Na etapa de *clean-up* utiliza-se 150 mg de MgSO₄ e 50 mg sorvente PSA. Os autores indicam que este método modificado resolve problemas de recuperação na extração de pesticidas que geralmente apresentam perdas durante a extração (como por exemplo o dicofol). Em 2007 este método tornou-se o método oficial da *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)* (LEHOTAY et. al, 2005; AOAC, 2007). A figura 22 demonstra as etapas da extração por QuEChERS Modificado Acetato.

Figura 22 - Fluxograma com as etapas de extração do Método QuEChERS Modificado Acetato

Fonte: Autor, 2019

3.8.2.4 Clean-up

A etapa de *Clean-up* é muito importante para reduzir interferentes que possam co-eluir com os analitos de interesse, melhorando a sensibilidade analítica. No método QuEChERS original é utilizada a resina primária secundária (PSA) para remoção de lipídios, açúcares, vitaminas e minerais. Além do PSA, outros tipos de sorventes podem ser utilizados de acordo com a natureza da matriz. O sorvente carbono grafitizado (GCB) é recomendado em pequenas quantidades para redução de clorofila que confere coloração verde ao extrato. A associação de sorventes C18 com PSA tem sido eficiente para remover gorduras, como no caso da laranja. A aplicação de terras diatomáceas e quitina como novos sorventes vem sendo estudadas. Os sorventes conferem a remoção de impurezas e interferentes, no entanto deve ser observada a recuperação dos pesticidas durante sua aplicação, visto que podem sofrer a redução indesejada (KIM et. al, 2019; BERNARDI, 2017; PRESTES et. al, 2009).

3.8.3 Cromatografia a gás – GC

A cromatografia a gás (GC) ocupa um lugar de destaque devido a uma série de vantagens como facilidade de separar espécies químicas, identificá-las e quantificá-las, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas de análise como espectrofotometria ou espectrometria de massas.

A cromatografia a gás é definida como um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, que são distribuídas em duas fases intimamente ligadas: fase estacionária (coluna cromatográfica) e fase móvel que a percorre (gás de arraste). Durante a passagem da fase móvel sobre a estacionária, os componentes da mistura são distribuídos por ambas, sendo eluidos (arrastados) sendo cada um deles retidos pela fase estacionária de forma seletiva, resultando em migrações diferenciais para cada analito.

A amostra é injetada no cromatógrafo a gás, sendo inserida na coluna cromatográfica. O uso de temperatura no sistema de injeção favorece a vaporização da amostra que segue para a coluna, e por sua vez a coluna fica condicionada a um forno. Neste forno pode ser usada somente uma temperatura (cromatografia a gás isotérmica) ou uma programação de temperatura (cromatografia a gás com temperatura programada) que auxilia a separação das espécies químicas através de características como volatilidade, ponto de ebulição e peso molecular. Cada espécie separada apresentará diferente tempo de retenção, que ao chegar ao fim da coluna, segue para o detector, gerando um sinal que é registrado em software adequado, sendo feito a análise de dados posteriormente. A figura 23 ilustra o sistema de cromatografia a gás (COLLINS et. al.; 2006).

Figura 23 - Sistema de Cromatografia a Gás

Fonte: DCTech Laboratory Technologies modificado, 2019

3.8.3.1 Colunas cromatográficas

As colunas cromatográficas para cromatografia a gás podem ser classificadas como: empacotadas e capilares. As colunas capilares são mais usuais devido à sua maior eficiência de separação e sensibilidade e menor tempo de análise, além de uma diversidade de revestimentos internos (fase estacionária) com diferentes polaridades, por isso será abordado essa classe de colunas.

A coluna capilar é composta por três partes (conforme figura 24):

- Revestimento de poliimida: camada protetora que resiste até 350°C;
- Sílica fundida: estrutura que dá suporte para a fase estacionária;
- Fase estacionária: revestimento interno responsável pela separação dos compostos de acordo com a afinidade química. Deve ser térmica e quimicamente estável na temperatura de uso da coluna. A separação ocorre por meio das forças de interação molecular entre substância e fase estacionária, que podem ser força de Van der Waals e interações coulômbicas (força de interação, dipolo induzido, dispersão e força de interação específica).

Figura 24 - Estrutura de colunas capilares para cromatografia a gás

Fonte: PHENOMENEX 2019, modificado

Os tipos de colunas podem ser classificados em: a) parede recoberta com fase estacionária líquida (*WCOT*) e fase estacionária líquida ligada a parede (*WBOT*), b) suporte recoberto (*SCOT*) e c) camada porosa (*PLOT*) conforme a figura 25.

Figura 25 - Figura com corte transversal das colunas tipo *WCOT* e *WBOT*, *SCOT* *PLOT*

Fonte: DELLOYD'S, 2000 modificado

A cromatografia a gás nomeada como troca gás-sólido se refere as colunas de camada porosa e suporte recoberto.

A cromatografia a gás nomeada como troca gás-líquido se refere as colunas de fase estacionária líquida e ligada a parede capilar, sendo chamada “líquida” devido ao polímero líquido não volátil que a compõem.

Na escolha da coluna para o método cromatográfico deve-se avaliar:

- **Diâmetro da coluna:** um dos conceitos avaliados na eficiência de separação de uma coluna é o número de pratos teóricos (N), que no caso das colunas de cromatografia a gás é inversamente proporcional ao diâmetro interno. Quanto menor o diâmetro, mais estreitos ficam os picos, porém deve-se diminuir o volume de injeção, já que a fase estacionária pode ficar saturada e os picos alargados. Com a diminuição do volume de injeção é necessário um detector mais sensível. Os diâmetros usuais são 0.32 mm para GC e 0.25 mm para cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas, porém outros diâmetros podem ser empregados.

- **Comprimento:** quanto maior a coluna, maior o tempo de análise e permanência dos analitos sistema. Ao iniciar testes de coluna, recomenda-se colunas menores de 15 a 30 metros. Caso não ocorra a separação, emprega-se colunas maiores. É importante dizer que colunas maiores podem auxiliar a separação de misturas com muitos analitos, porém podem diminuir a resolução no caso de excesso do comprimento. O tamanho usual é de 30 metros.

- **Espessura do filme da fase estacionária:** quanto maior a espessura, maior o poder de troca e retenção de analitos na coluna. Sendo assim, pode-se injetar volumes maiores de amostra. Filmes finos diminuem a retenção de compostos de ponto de ebulição e peso molecular elevados, com a vantagem de menor sangramento da coluna, porém comporta volumes menores de injeção de amostra. Espessuras maiores de filme são recomendadas para compostos voláteis que dessa forma permanecem mais tempo na coluna, porém para este tipo de espessura os sangramentos são maiores.

- **Polaridade:** quando a polaridade da fase estacionária é semelhante a polaridade da substância de interesse elas possuem grande afinidade, acarretando maior retenção na coluna. Através da rampa de temperatura é possível liberar os compostos retidos. Esta é uma ferramenta importante no desenvolvimento do método analítico.

Na tabela 2 foram apresentados os tipos de fases estacionárias mais utilizadas e as algumas marcas disponíveis no mercado (COLLINS et al.; 2006, NASCIMENTO et. al.; 2018).

Tabela 2 - Principais fases estacionárias utilizadas em colunas capilares

Fase estacionária	Nomes comerciais	Intervalo de temperatura (°C)	Variação de polaridade
Dimetilsiloxano	BP-1, DB-1, HP-1, OV-1, RTx-1, SPB-1 CPsil 5CB, ZB-1	-60 a 320
5% difenildimetilsiloxano	BP-5, DB-5, HP-5, RTx-5, SPB-5, CPsil 8CB, ZB-5	-60 a 320	
Dimetilsilarileno	BPX5, DB-5ms, SLB-5ms, Rxi-5Sil MS	- 80 a 370	
Dimetilsiloxano-carborano copolímero	HT-5	10 a 460	
14% cianopropilfenil-dimetilsiloxano	BP-10, DB-1701, HP-1701, OV-1701, RTx-1701, SPB-1701, CP-sil 19 CB-20-270, ZB-1701	20 a 270	
50% Cianopropilfenil-dimetilsiloxano	BP225, DB-225, HP-225, OV-225, RTx-225, SPB-225, CPsil 43CB	40 a 250	
Cianopropilsilarileno	BPX70, DB-23, RTx-2330, SP-2330, CPsil 84	25 a 270	
Polietilenoglicol	BP20, DB-WAX, HP-WAX, Stabilwax, Supelcowax, CPwax 52CB	20 a 250	Muito Polar

Fonte: COLLINS et. al.; 2006 e RESTEK, 2020 modificado

3.8.3.2 Detector de Captura de Elétrons - ECD

O detector ECD foi inventado pelo químico e cientista inglês James E. Lovelock em 1958. Sua motivação foi o desenvolvimento de um detector mais sensível para análises por cromatografia a gás, através de ionização das partículas. A princípio o detector consistia em uma pequena câmara cilíndrica, com um tubo de latão central que funcionava como um Ânodo. Esta câmara ficava alinhada com uma folha de prata revestida de nuclídeo Estrôncio (^{90}Sr), que funcionava como fonte de radiação beta (β) ionizante e como cátodo. Por questões de segurança e baixo custo Lovelock utilizou como gás transportador o nitrogênio. Durante seus experimentos, ele descobriu que substâncias como cloreto de carbono (CCl_4) entre outras halogenadas capturavam elétrons quando passavam pelo detector,

consumindo o sinal dele. Com esta observação, ele chegou à conclusão de que o novo dispositivo de detecção era mil vezes mais sensível que o detector de Argônio utilizado na época. O detector ECD passou por muitas melhorias, sendo a fonte de radiação β ionizante de nuclídeo ^{63}Ni uma das mais utilizadas (LOVELOCK, 1958; SELLA, 2015; RAFFERTY, 2015).

Esta técnica analítica é muito sensível a compostos halogenados como os organoclorados e organofosforados devido a sua afinidade por elétrons (MIAO et. al.; 2013). Os compostos de interesse são separados no cromatógrafo a gás através da rampa de temperatura e interação dos analitos com a fase estacionária (coluna) e fase móvel (gás de arraste). O detector ECD possui a fonte de ^{63}Ni que emite partículas β ionizantes (esboço do detector na figura 26). O gás de arraste nitrogênio (N_2) proveniente do sistema cromatográfico chega ao detector e quando passa pelo feixe de partículas beta, é ionizado formando elétrons. Esses elétrons são coletados em um ânodo que gera uma corrente elétrica. Esta corrente por sua vez é amplificada por um eletrômetro, gerando uma linha de base. Quando uma substância como a halogenada passa pelo feixe de elétrons, captura elétrons diminuindo a corrente que forma a linha de base. Esta diminuição é proporcional a concentração dos analitos. O Detector ECD (figura 26) é pouco sensível a hidrocarbonetos, álcoois e cetonas porque estes não tem afinidade de captura de elétrons, o que o torna mais seletivo e aplicável a análise de pesticidas clorados como os analisados neste trabalho (COLLINS et. al, 2006).

Figura 26 - Detector ECD e suas partes constituintes

Fonte: CHROMEDIA, 2017 modificado

3.8.4 Cromatografia a gás acoplada a Espectrometria de Massas - GC-MS

O acoplamento do cromatógrafo a gás ao espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia gasosa - GC (alta seletividade e eficiência de separação) as vantagens do espectrômetro de massas - MS (informação sobre a estrutura da substância, massa molar e aumento adicional de seletividade (CHIARADIA, et. al.; 2008)

3.8.4.1 Espectrometria de Massas – MS

O espectrômetro de Massas é um instrumento constituído por três partes principais:

- Fonte de íons: gera os íons a serem analisados na fase gasosa;
- Analisador ou filtro de massas: através de um campo elétrico/magnético separa os íons gerados na fonte de ionização de acordo com a relação carga massa (m/z);
- Sistema de detecção: quantifica os íons provenientes do analisador de massas.

O espectrômetro de massa se baseia na ionização das moléculas do analito para produzir íons, estes íons são separados pelo analisador de quadrupolo

segundo a razão massa/carga (m/z), finalmente os íons selecionados atingem o coletor gerando um sinal analítico (BUSTILLOS et. al, 2003). A figura 27 ilustra o esquema de um GC-MS. Este sistema é constituído por um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas.

Figura 27 - Esquema de um GC-MS

Fonte: Research gate 2019, modificado

3.8.4.1.1 Fontes de Ionização

Como fontes de ionização existem uma variedade de técnicas que podem ser empregadas, levando-se em consideração o estado físico e características da amostra como polaridade, estabilidade térmica e peso molecular. Alguns exemplos são: Ionização por impacto de elétrons (EI) ionização química (CI), ionização por átomos/íons rápidos (FAB/FIB), ionização por *Termospray* (TSP) entre outras. A ênfase deste trabalho será a Ionização por impacto de elétrons, que é a fonte que constitui o GC-MS utilizado para o desenvolvimento deste trabalho, sendo um dos métodos mais utilizados (KUSSUMI,2007; CHIARADIA, et. al.; 2008).

3.8.4.1.2 Ionização por Impacto de Elétrons (EI)

A técnica de ionização por impacto de elétrons foi utilizada pela primeira vez pelo canadense-americano Arthur Dempster em sua tese de doutorado publicada em 1916. O princípio da fonte de EI é que ao aplicar uma corrente elétrica em seu filamento, o aquecimento causado pelo efeito Joule até a incandescência

emite elétrons. É aplicado um potencial de 70V entre o filamento e placa colimadora é mantido, sendo os elétrons acelerados com energia média de 70 eV. Há interação das moléculas neutras do analito com os elétrons acelerados, tornando as moléculas íons positivos e negativos. Na câmara de ionização há dois ímãs fixos que criam um feixe helicoidal de elétrons energizados, consequentemente aumentando a probabilidade de interação das moléculas neutras.

O aumento da energia vibracional do cátion produto decorrente do impacto do elétron primário é uma importante ferramenta na espectrometria de massas. Com o aumento da razão da vibração e alongamento, crescem as chances de rompimento da ligação. A ruptura dessa ligação ocasiona a fragmentação do íon precursor. No processo de investigação das moléculas gasosas por GC-MS é observado que a intensidade dos fragmentos é superior à do íon precursor. O íon precursor pode ser chamado de íon molécula. A fragmentação padrão da substância depende da composição do íon precursor e sua investigação leva a compreensão da sua estrutura é como montar um quebra-cabeças.

A ionização por EI pode ser utilizada em interfases como a de GC-MS, para amostras líquidas, sólidas e gasosas desde que os compostos sejam voláteis, podendo ser utilizada uma sonda no caso de amostras sólidas. A ionização por EI produz o íon precursor ou molécula e vários fragmentos denominados íons produtos, sendo considerado uma ionização do tipo “forte”, descrevendo fielmente a estrutura molecular estudada.

A ionização por impacto de elétrons gera um espectro de massas reprodutivo, como uma espécie de impressão digital molecular, condicionado ao uso da energia de ionização de 70 eV. Com base nesse fenômeno em 1969 a agência americana NIST (*National Institute of Standards and Technology*) criou um banco de dados de espectros de massas da maior parte de moléculas químicas voláteis. Os equipamentos GC-MS geralmente possuem esse banco de dados da NIST, ferramenta muito útil para identificação de espectros de massas desconhecidos. Na figura 28 é exemplificado uma fonte de impacto de elétrons, na qual é possível observar as partes constituintes e o fluxo de moléculas ionizadas (BUSTILLOS, 2019).

Figura 28 - Esquema de uma fonte de Impacto de Elétrons (EI), os retângulos laterais nomeados S e N são os ímãs fixos

Fonte: CATALANI, 2011

3.8.4.1.3 Analisadores de massas (Filtro de Massas)

Os íons formados por EI são separados de acordo com a razão m/z . Existem vários tipos de filtro de massas, sendo a rádio frequência (filtro quadrupolo e aprisionamento de íons) uma das mais utilizadas (PIZZUTI, 2006).

- Quadrupolo

O quadrupolo é um dos analisadores mais utilizados, devido à facilidade de uso, faixa de massa, faixa linear de trabalho para determinações quantitativas, ótima resolução e qualidade do espectro de massas. Possui elevada sensibilidade, detectando o nível de pictogramas, de forma reprodutível, com valores de desvio padrão relativos (RSD) menores do que 5%. O quadrupolo consiste em 4 barras paralelas, dispostas na forma de um quadrado onde os íons do analito são direcionados para o centro do quadrado. Deve-se ter um controle preciso sobre as voltagens e sobre a rádio frequência, aplicadas as barras dos polos, que geram um campo eletrostático que age como filtro de massas. Esses campos determinam quais as razões m/z podem passar através dos filtros, em uma determinada voltagem (PIZZUTI, 2006). A figura 29 ilustra o esquema de um quadrupolo.

Figura 29 - Esquema de um quadrupolo

Fonte: FACCIABENE, 2016

Existem duas formas de operação/monitoramento da razão m/z através do quadrupolo:

- Monitoramento de íon selecionado (*SIM*)

Neste tipo de monitoramento, escolhem-se razões m/z específicas. Este método é significativamente mais sensível que o método *Full Scan*, mas é indicado para quantificação de um composto alvo, nas menores concentrações possíveis, no nível de traço. Este método fornece informações sobre os íons monitorados, ou seja, podem-se perder informações importantes para identificação do composto.

- Monitoramento *Full Scan*

Este monitoramento escolhe-se faixas de razão m/z , sendo mais amplo e indicado para análises qualitativas e quantitativas, nas quais a informação espectral é mais importante (PIZZUTI, 2006).

3.9 Validação Analítica

A validação de um método é considerada de suma importância para verificar se os resultados das análises são confiáveis, e se o método é adequado para a finalidade pretendida, antes de ser utilizado (ROHR, 2018).

A validação de um método analítico pode ser efetuada seguindo documentos normativos descritos por órgãos e agências competentes. No Brasil o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia) e a ANVISA

(Agência Nacional de Vigilância Sanitária) disponibilizam guias com orientações sobre como proceder para a implementação da validação analítica em laboratório (CHIARELLO, 2019).

O INMETRO dispõe do documento DOQ-CGCRE-008 – revisão 07 de julho de 2018, que tem por objetivo auxiliar os laboratórios de ensaio a obter e demonstrar que o método analítico avaliado atende os requisitos necessários para obtenção de resultados com o rigor exigido (INMETRO, 2018).

A ANVISA disponibiliza o documento RDC nº 166 de julho de 2017 com as diretrizes de aplicação e figuras de mérito necessários a métodos analíticos utilizados para controle de insumos farmacêuticos, medicamentos de produtos biológicos em todas as fases de produção, visando garantir a qualidade e segurança na cadeia produtiva farmacêutica (ANVISA, 2017a). Ainda no âmbito brasileiro, a norma ABNT NBR 14029 de 2016 é uma norma para validação de métodos analíticos aplicada para agrotóxicos e afins (CROCOLI, et. al.; 2019).

Normas internacionais publicadas pela ISO (Organização Internacional para a Padronização) como a ISO 17025 que determina requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e de calibração é harmonizada para o idioma em português brasileiro pela Associação Brasileira de Normas Técnicas nomeada como ABNT NBR ISO/IEC 17025, utilizada como uma das referências do INMETRO entre outros órgãos para compor documentos como a própria orientação sobre validação DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2018 ; ABNT, 2017).

A Comissão Europeia disponibiliza o guia de controle de qualidade analítica e procedimentos para validação de métodos analíticos para resíduos de pesticidas e análises em alimentos e rações denominado SANTE/11813/2017. Neste guia é detalhado todo o procedimento desde o rigor com a coleta das amostras, armazenamento e validação aplicados especificamente para resíduos de pesticidas em alimentos (EUROPEAN COMMISSION, 2017).

Tendo em vista a natureza do laboratório de análises químicas do IPT, no qual foram desenvolvidas a metodologia e preparo de amostras, para avaliação dos parâmetros de qualidade estatísticos foi utilizado como referência o documento do INMETRO DOQ-CGCRE-008 de julho de 2018.

3.9.1 Parâmetros de desempenho

Neste tópico foram descritas as figuras de mérito de uma validação de metodologia analítica segundo o documento orientativo DOQ-CGCRE-008 de julho de 2018 do INMETRO.

Para que um método de validação analítica seja considerado qualitativo, deve atender os parâmetros de seletividade e limite de detecção. E para que o método seja considerado quantitativo deve atender os parâmetros de seletividade, linearidade/faixa de trabalho/faixa linear de trabalho/sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, tendência/recuperação e precisão. O teste de robustez é um parâmetro opcional tanto para métodos quantitativos como qualitativos (INMETRO, 2018).

3.9.1.1 Seletividade/Efeito matriz

É o poder de distinção do método quando se analisa um analito entre vários ou um analito dentro de uma matriz ou outro material com possibilidade de interferir na análise. É seletivo o método que distingue um analito do outro. A avaliação da seletividade pode ser feita de duas maneiras:

- Análise de amostra e materiais de referência pelo método em análise, comparando a outro método já validado
- Análise de amostras com possíveis interferentes na presença do analito.

Quando a seletividade não é demonstrada, a linearidade, tendência, e precisão podem ser comprometidas.

A matriz pode conter interferentes que prejudicam a detecção do(s) analito(s), reduzindo ou aumentando o sinal, por isso no estudo de seletividade deve ser avaliado o efeito matriz. O estudo de efeito matriz pode ser conduzido de duas maneiras:

- Matriz sem analito: deve-se preparar dois grupos de amostra teste, um com matriz e outro sem, com adição idêntica de concentração de padrão dos analitos de interesse, avaliando toda a faixa de estudo (baixa, média e alta) em triplicata para cada faixa.

Aplicar o Teste F (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias por nível de concentração e Teste t (*Student*) que compara médias por nível de concentração. Sendo os Testes F não significativo a matriz não tem efeito sobre a precisão por nível de concentração. Sendo o Teste t não significativo, a matriz não tem efeito sobre os resultados por nível de concentração.

- Matriz sem analito indisponível: preparar duas curvas analíticas uma com a matriz que já possui os analitos e outra sem a matriz. Adicionar o padrão de forma idêntica nos dois estudos para cada nível de concentração. A curva deve ter ao menos 5 níveis de concentração e o preparo deve ser feito em triplicata.

Aplicar o Teste t para as inclinações das curvas. Esse teste pode ser feito também na condição da matriz sem o analito. Ao comparar as inclinações, se a regressão linear não diferirem significativamente, não há efeito matriz. Isso pode ser observado também graficamente pelo paralelismo aproximado das duas curvas. Caso haja divergência na comparação, o estudo deve ser executado na matriz nos requisitos de linearidade, precisão e a tendência/recuperação (INMETRO, 2018).

3.9.1.2 Linearidade/Faixa de trabalho/Faixa linear de trabalho/Sensibilidade

A linearidade de uma metodologia analítica é a capacidade de obter resultados diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra, estipulados dentro de uma faixa de concentração.

A faixa de trabalho é o intervalo entre a menor e maior concentração de analito na amostra, no qual a precisão, exatidão e linearidade apresentaram níveis aceitáveis.

Faixa linear de trabalho é deduzida como faixa de concentração do analito na qual os resultados do método são proporcionais aos da concentração do analito.

Sensibilidade analítica é a inclinação da curva analítica, ou seja, a mudança de resposta que condiz a mudança da quantidade medida.

Para que a quantificação de um analito seja feita com rigor, é necessário conhecer a relação de medida e concentração do analito.

A linearidade pode ser obtida por padronização interna ou externa e deve sendo apresentada por meio de expressões matemáticas para cálculo de

concentração do analito a ser aplicado em uma amostra real. A equação da reta que relaciona as variáveis é descrita da equação 1.

$$y = a + bx \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

y: resposta medida no equipamento (por exemplo intensidade analítica, absorbância, área etc.);

x: concentração;

a: coeficiente linear (intersecção com o eixo y, quando x= 0);

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

Os coeficientes da equação da reta são obtidos através das equações 2 e 3:

$$a = \frac{\sum y_i - b \sum x_i}{n} = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{Equação 2}$$

$$b = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

x_i: valores individuais de concentração

y_i: valores individuais de sinal instrumental

$\bar{x}$: média de valores de x (concentração)

$\bar{y}$: média de valores e y (sinal instrumental)

A curva analítica deve ser construída por meio de no mínimo cinco níveis de concentração que estejam dentro da faixa de trabalho prevista na aplicação do método. A curva deve ser preparada em triplicata, partindo-se de soluções padrões distintos (concentrações idênticas preparadas em recipientes diferentes).

A avaliação da linearidade não deve ser baseada somente no gráfico de resultados da resposta do equipamento em função da concentração. A ausência de valores aberrantes chamados *outliers* em cada nível de concentração devem ser observados, assim como a homocedasticidade que é a igualdade das variâncias dos dados.

Para avaliação dos *outliers* pode ser utilizado o teste estatístico de *Grubbs* ou resíduos padronizados *Jackknife*. A homocedasticidade pode ser feita pelos testes estatísticos de *Cochran*, *Levene* ou *Brown-Forsythe*.

Quando o sistema é considerado homocedástico, utiliza-se a regressão linear simples calculada pelo método dos mínimos quadrados ordinários não ponderados (MMQONP). No caso do resultado heterocedástico, a regressão linear simples é calculada pelo método dos mínimos quadrados ordinários ponderados (MMQOP). A heterocedasticidade pode ser ocasionada devido a procedimentos analíticos realizados com pouco rigor ou de forma inadequada. É importante investigar, pois correções na parte operacional podem tornar o método homocedástico novamente.

Por meio da regressão linear simples são calculados os resíduos e o coeficiente de correlação linear (r). O coeficiente de correlação é um indicativo complementar de que a reta pode ser considerada adequada, porém os resíduos devem ser avaliados. O resíduo é diferença do resultado observado e calculado com a equação da reta, para cada valor de x . Quando os resíduos são avaliados no gráfico, deve-se observar o comportamento aleatório. Quando há uma tendência, pode haver o indício de que o modelo linear não está adequado (INMETRO, 2018).

Como critério de aceitação para o coeficiente de correlação (r) ou de determinação (r^2) pode ser considerado ótimos valores próximos de 1, quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto experimental (RIBANI *et al.*, 2004).

A linearidade deve ser avaliada por meio do teste F (ou F -Snedecor) na análise de variância (ANOVA) da regressão.

Quando uma curva analítica não apresenta comportamento linear mesmo após ajustes, pode ser utilizado uma outra função ou modelo que a represente.

Portanto, a primeira etapa de determinação da faixa linear de trabalho é a avaliação de uma curva exploratória, preparada com um branco da amostra por exemplo e adição de padrões em concentrações distintas. Ao compor o gráfico de concentração em relação a intensidade, fazer uma observação visual do limite inferior e superior.

A segunda etapa para a determinação da faixa linear de trabalho é preparar a curva de calibração em um branco da amostra ou solvente (concentrações previamente selecionadas na primeira etapa) em triplicata para cada nível, com a observação de utilizar solução mãe padrão distintas. A curva deve ter no mínimo cinco pontos de calibração. Com os dados obtidos, construir os gráficos observando se há valores aberrantes, se há homocedasticidade e coeficiente de correlação (r) adequado. Ao avaliar os resíduos, observar se há tendência, pois tendências sistemáticas indicam que o modelo linear não está adequado (INMETRO, 2018).

3.9.1.3 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção de um método analítico é a menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser detectado, e não necessariamente quantificado. É importante saber o LD do método ao se analisar níveis traço como no caso dos resíduos de pesticidas, sabendo assim se a metodologia é adequada.

O LD pode variar de uma matriz para outra, por isso é importante garantir que todas as etapas de preparo estejam representadas na amostra final, para que a sensibilidade da detecção seja avaliada de forma confiável. O LD também é importante para ensaios qualitativos.

O INMETRO sugere cinco métodos diferentes para o cálculo de LD, sendo eles: avaliação/percepção visual, relação sinal/ruído, estimativa a partir da curva analítica (método simplificado e método completo), estimativa pelo desvio padrão do branco e estimativa por meio de curva de desvios padrão.

O método da estimativa do LD a partir da curva analítica (método simplificado) foi aplicado neste trabalho, tendo em vista que é o método que possibilita os melhores resultados a nível traço como no caso de análise multirresíduos de pesticidas, conforme a equação 4.

$$LD = 3,3 s/b$$

Equação 4

Onde:

s: desvio padrão da resposta do branco

b: inclinação (coeficiente angular) da curva analítica

Notas:

¹A inclinação “b” pode ser estimada com base na curva analítica utilizada na avaliação da linearidade.

²Quando não há intensidade de sinal no branco, adota-se para o valor de “s” o desvio padrão da menor concentração da curva analítica.

Após a determinação do LD por qualquer um dos métodos indicados ou algum outro método referenciado em normas internacionais, deve-se confirmar o valor de LD, por meio da análise de seis replicatas independentes, e caso alguma não seja detectada o LD pode ter sido subestimado, devendo ser reavaliado (INMETRO, 2018).

3.9.1.4 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação de uma metodologia analítica é a menor concentração de analito na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. Em geral adota-se o LQ como o menor nível de concentração da curva analítica. Após a determinação do valor de LQ devem ser injetadas de amostra com adição do mesmo valor de concentração do LQ, avaliando se a precisão e a recuperação/tendência alcançam valores aceitáveis. Podem ser avaliadas seis replicadas caso seja aplicável.

A orientação do INMETRO sugere cinco métodos para avaliação do LQ: avaliação/percepção visual, relação sinal/ruído, estimativa a partir da curva analítica, estimativa pelo desvio padrão do branco e estimativa por meio da curva de desvios padrão.

O método da estimativa do LQ a partir da curva analítica foi aplicado neste trabalho, tendo em vista que é o método que possibilita os melhores resultados a nível traço como no caso de análise multirresíduos de pesticidas, conforme a equação 5.

$$LQ = 10 s/b$$

Equação 5

Onde:

s: desvio padrão da resposta do branco

b: inclinação (coeficiente angular) da curva analítica

Notas:

¹A inclinação “b” pode ser estimada com base na curva analítica utilizada na avaliação da linearidade.

²Quando não há intensidade de sinal no branco, adota-se para o valor de “s” o desvio padrão da menor concentração da curva analítica.

É importante fazer a confirmação do LQ por meio da análise de seis replicatas independentes, avaliando se a precisão e recuperação são aceitáveis (INMETRO, 2018).

3.9.1.5 Tendência/Recuperação

A tendência ou recuperação são um conjunto de processos como uso de materiais de referência certificados (MRC), participação de comparações interlaboratoriais, comparação com métodos de referência e realização de testes de recuperação de padrão. A análise crítica desses dados pode trazer informações a respeito de erros aleatórios e sistemáticos.

A tendência ou recuperação analítica pode ser calculada por meio da equação 6.

$$\frac{\text{valor observado}}{\text{valor esperado}} \times 100\% \quad \text{Equação 6}$$

O material de referência é um material com concentração ou outro tipo de grandeza, para o qual é apresentado uma incerteza associada. Esse tipo de material certificado deve ser fornecido por organismos competentes. O MRC pode ser utilizado para avaliar o desempenho do método, sendo utilizado na análise de tendência, podendo ser calculado com base nos valores amostrais, a média, desvio padrão amostral, erro relativo e erro normalizado.

A participação em rodadas analíticas interlaboratoriais promovidas por organizações produtoras de materiais de referência certificadas também é uma ferramenta que pode ser utilizada na avaliação da tendência. Nesse tipo de exame, o laboratório participante não tem conhecimento das concentrações reais das amostras avaliadas. Dessa forma, todos os laboratórios participantes são avaliados

sem qualquer tipo de interferência e a identificação permanece em sigilo. Em geral para participar de interlaboratoriais, deve ser feita uma inscrição com um valor agregado a ser pago.

A comparação de resultados de um método a ser validado com métodos de referência pode ser uma ferramenta para demonstrar a exatidão do método. A realização das análises deve ser feita na mesma faixa de aplicação, com as mesmas amostras em replicata. Os resultados podem ser comparando usando métodos estatísticos como testes de hipótese (*Teste F*) avaliando se as variâncias são iguais ou diferentes e posteriormente o teste t (*Student*) que compara as médias dos resultados, sendo possível avaliar se são estatisticamente iguais (INMETRO, 2018).

3.9.1.6 Ensaio de recuperação

A avaliação da recuperação de uma analito pode ser feita com a adição de concentração conhecida da sustância de interesse chamada *Spike* na amostra em estudo. Esta adição também é chamada de “fortificação” da amostra, sendo o estudo feito em pelo menos três faixas de concentração (baixa, média e alta) dentro da faixa de aplicação do método analítico (INMETRO, 2018).

A exatidão de um método analítico é a conformidade do valor real do analito contido na amostra e o verificado pela determinação analítica. Ela pode ser representada pela recuperação, que é a medida da eficiência do preparo da amostra, com a extração do analito da matriz em que está presente (LANÇAS, 2009).

A recuperação pode ser calculada conforme a equação 7 e é representada em porcentagem.

$$\text{Recuperação \%} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

C₁: concentração do analito na amostra fortificada

C₂: concentração do analito na amostra não fortificada

C₃: concentração do analito adicionado à amostra fortificada

Crítérios de aceitação para recuperação devem ser estabelecidos seguindo orientações normativas aplicadas as atividades executadas pelos laboratórios analíticos. Em geral os critérios de aceitação estão relacionados ao nível de concentração. Na tabela 3 foram apresentados valores sugeridos pela AOAC, que podem ser utilizados como base de critério de aceitação.

Tabela 3 - Critério de aceitação para recuperação segundo AOAC

Analito, (%)	Unidade	Faixa de recuperação média (%)
100	100%	98 - 102
10	10%	98 - 102
1	1%	97 - 103
0,1	0,1%	95 - 105
0,01	100 ppm (mg.kg ⁻¹)	90 - 107
0,001	10 ppm (mg.kg ⁻¹)	80 - 110
0,0001	1 ppm (mg.kg ⁻¹)	80 - 110
0,00001	100 ppb (µg.kg ⁻¹)	80 - 110
0,000001	10 ppb (µg.kg ⁻¹)	60 - 115
0,0000001	1 ppb (µg.kg ⁻¹)	40 - 120

Fonte: AOAC, 2016; INMETRO 2018 modificado.

3.9.1.7 Precisão

A precisão pode ser apresentada de três maneiras diferentes como repetibilidade, precisão intermediária, e reprodutibilidade, geralmente expressa pelo desvio padrão e coeficiente de variação.

O Coeficiente de variação (CV) é chamada também de desvio padrão relativo (DPR) e pode ser calculado conforme a equação 8.

$$CV \text{ ou } DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

Onde:

DP: é o desvio padrão

CMD: é a concentração média determinada

3.9.1.7.1 Repetibilidade

A repetibilidade é um parâmetro que permite avaliar a dispersão dos resultados de um conjunto de medições feitas em um mesmo local, equipamento, com os mesmos padrões de referência e analista em um período de tempo curto. Nessas condições é feita a avaliação do desvio padrão amostral da repetibilidade de cada concentração.

Para avaliação podem ser utilizados padrões, material de referência certificado, ou amostras em branco fortificadas em várias concentrações dentro da faixa de trabalho.

O preparo das repetições deve ser independente, incluindo todas as etapas e medição no equipamento. Devem ser testadas três faixas de concentração (baixa, média e alta) com um número de seis a quinze repetições por nível de concentração. Quanto maior o número de replicatas, mais eficaz a avaliação da dispersão.

Os critérios de aceitação da repetibilidade devem ser estabelecidos assim como o da recuperação, baseados em normas e legislações compatíveis com a aplicação do método analítico. Geralmente o nível de concentração é associado ao critério de aceitação. Na tabela 4 são sugeridos valores para critério de aceitação da repetibilidade.

Tabela 4 - Critérios de aceitação para repetibilidade segundo AOAC

Analito, %	Fração Mássica (C)	Unidade	DPR, %
100	1	100%	1,3
10	10^{-1}	10%	1,9
1	10^{-2}	1%	2,7
0,1	10^{-3}	0,1%	3,7
0,01	10^{-4}	100 ppm (mg.kg ⁻¹)	5,3
0,001	10^{-5}	10 ppm (mg.kg ⁻¹)	7,3
0,0001	10^{-6}	1 ppm (mg.kg ⁻¹)	11
0,00001	10^{-7}	100 ppb (µg.kg ⁻¹)	15
0,000001	10^{-8}	10 ppm (µg.kg ⁻¹)	21
0,0000001	10^{-9}	1 ppm (µg.kg ⁻¹)	30

Fonte: AOAC, 2016; INMETRO 2018 modificado.

3.9.1.7.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária consiste em fazer um conjunto de medições repetidas de um mesmo padrão ou amostra em branco fortificada (no mínimo quinze) para testar a variabilidade dos resultados em um laboratório. Diferente da repetibilidade, são adicionadas variáveis aos testes como: diferentes analistas e/ou diferentes equipamentos, em dias diferentes. Por meio dos ensaios é calculado o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial de cada nível de concentração.

De acordo com a aplicação do método analítico, após a execução das medidas, os dados podem ser tratados de várias maneiras. Uma delas é por meio de um gráfico, com os valores de desvio padrão relativo, no qual é possível avaliar a dispersão dos dados. Equações e testes estatísticos também podem ser aplicados, mais detalhes podem ser consultados no documento DOQ-CGCRE-008 – VER.07 – julho de 2018.

3.9.1.7.3 Reprodutibilidade

O estudo de reprodutibilidade é utilizado para determinação do desvio padrão da reprodutibilidade interlaboratorial, ou seja, uma mesma amostra analisada no laboratório que a metodologia analítica foi validada deve ser analisada por outro laboratório para comparação dos resultados. Esta é uma forma de verificar o desempenho do método de forma interlaboratorial, portanto é necessário um estudo colaborativo. Uma mesma amostra ou padrão é analisada em ambos laboratórios, sendo calculado o desvio padrão amostral de cada nível de concentração, sendo avaliado segundo os critérios de aceitação estabelecidos pelo laboratório.

3.9.1.7.4 Robustez

A robustez é a capacidade de um método se manter estável com pequenas variações em parâmetros de execução, demonstrando que tem confiabilidade na aplicação da rotina do laboratório.

A robustez é um parâmetro obrigatório, mas traz informações importantes que podem ajudar na otimização do método analítico. Pode ser determinada por meio do planejamento de *Youden* ou *Plackett-Burman* por

exemplo. O estudo da robustez permite avaliar a confiabilidade do método e o quanto cada variável interfere nos resultados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes materiais e reagentes:

4.1 Materiais e reagentes

- Solvente acetona grau HPLC - marca tédia
- Solvente acetonitrila grau HPLC - marca merck
- Solvente hexano grau HPLC - marca J.T. Baker
- Solvente metanol grau HPLC – marca Merck
- Solvente acetato de etila grau HPLC – marca Tédia
- Ácido acético glacial ACS – marca Tédia
- Acetato de sódio anidro 99% - marca Sigma Aldrich
- Amina primária secundária (PSA) - marca Agilent Technologies
- SPE C18 ODS – marca Agilent Technologies
- SPE Bondesil – Marca Agilent Technologies
- Sulfato de Magnésio anidro reagentes Plus $\geq 99,5\%$ marca Sigma Aldrich;
- Cloreto de sódio ACS – marca Merck
- Filtro de seringa PTFE 0,45 μ m – marca Allcrom
- Paletes de cerâmica para extração QuEChERS – marca Agilent Technologies
- Vial de 2mL com tampa de rosca
- Pipetas automáticas de 10-100 μ L, 100-1000 μ L, 500 a 5000 μ L – marca eppendorf
- Padrão Trifluralina 100,4250 mg L⁻¹ em Isooctano – marca Dr. Ehrenstorfer
- Padrão Clorotalonil 100,4700 mg L⁻¹ em Isooctano – marca Dr. Ehrenstorfer
- Padrão Clorpirifós 100,4700 mg L⁻¹ em Isooctano – marca Dr. Ehrenstorfer
- Padrão Dicofol 100,4700 mg L⁻¹ em Isooctano – marca Dr. Ehrenstorfer
- Padrão Azoxistrobina 100,4700 mg L⁻¹ em Acetato de Etila – marca Dr. Ehrenstorfer
- Gás N₂ ultrapuro 99,9999% – marca Linde
- Vial de 2mL ambar com tampa de rosca – marca AMFB
- Água ultrapura tipo I

- Tubo falcon de 15 mL – marca Kasvi
- Tubo falcon de 50 mL – marca Kasvi
- Tubo Eppendorf de 2mL – marca Kasvi

4.2 Equipamentos

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Balança analítica modelo AG 245 – marca Mettler Toledo
- Centrifuga modelo Himac CR 22GII - marca Hitachi
- Agitador de soluções AP 56 – marca Phoenix Luferco
- GC-ECD 2010 Plus com radionuclídeo de Ni^{63} , injetor automático AOC-20i marca Shimadzu, coluna HP5 30 m , 0.32 mm, 0.25 μm de filme marca Agilent Technologies, o software de operação e tratamento de dados utilizado foi GC-Solutions versão 2.40.00. marca Shimadzu.
- O GC-MS – 1- modelo GC System 7890A acoplado a MS 5975C inert XL EI/CI MSD marca Agilent Technologies, injetor modelo CTC Analytics da Pal System, coluna cromatografica RTX-5 30 m x 0,25 mm x 0, 25 μm film marca Restek. O Software utilizado para operação e tratamento dos dados foi o MSD Chemstation versão E.02.00.493 1989-2008.
- O GC-MS – 2 – modelo 2010 Plus e injetor AOC-20i marca Shimadzu, coluna cromatografica RTX-5 30 m x 0,25 mm x 0, 25 μm film marca Restek. O software utilizado para operação e tratamento dos dados foi LabSolutions.

4.3 Procedimento Experimental

4.3.1 Amostras

As amostras seguiram etapas como coleta, preparo, extração e limpeza do extrato para que se tornassem aptas à análise no instrumento analítico.

4.3.1.1 Coleta e preparo de amostras

Conforme descrito no item “3.8.1 Coleta e preparo de amostras” seguindo as diretrizes do PARA (ANVISA, 2012; ANVISA, 2012a; ANVISA, 2019), o mínimo de dez unidades de laranja que pesadas resultaram em massa ≥ 1 kg foram coletadas em várias regiões de São Paulo, em locais como: feiras de rua, comercio local, supermercados e distribuidores.

Para as amostras de laranja adotou-se a nomenclatura “LAR - número da coleta”. Na tabela 5 foram listadas doze amostras de laranja coletadas no Estado de São Paulo, com a descrição da origem e tipo de estabelecimento.

Tabela 5 - Identificação das amostras de laranja e características observadas na coleta

Identificação das amostras de laranja	Cidade de Origem	Endereço do estabelecimento	Tipo de estabelecimento
LAR-O-1 *	Ibiúna - SP	Jd. Bonfiglioli, Zona oeste de SP	Loja de produtos orgânicos certificados
LAR-1	Limeira-SP	Jd. Bonfiglioli, Zona oeste de SP	Feira de Bairro
LAR-2	Bebedouro-SP	Jd. Bonfiglioli, Zona oeste de SP	Feira de Bairro
LAR-3	desconhecida	Jd. Bonfiglioli, Zona oeste de SP	Feira de Bairro
LAR-4	desconhecida	Santo André, cidade metropolitana de SP	Feira de Bairro
LAR -5	desconhecida	Parque Peruche, Zona norte de SP	Feira de Bairro
LAR-6	desconhecida	Bairro Itaquera, Zona Leste de SP	Feira de Bairro
LAR-7	Limeira-SP	Bairro Morumbi, Zona Oeste de SP	Feira de Bairro
LAR-8	desconhecida	Jaguapé, Zona Oeste de SP	Ceagesp
LAR-9	Ibiúna-SP	Ibiúna, interior de SP	Sítio Local
LAR-10	Jardinópolis-SP	Bebedouro, interior de SP	Supermercado
LAR-11	Pirassununga, SP	Pirassununga, interior de SP	Sítio local

*laranja orgânica isenta de pesticidas – Fonte: autor, 2019.

As amostras coletadas foram preparadas conforme descrito no item “3.8.1 Coleta e preparo de amostras”. Na figura 30 demonstrou-se as etapas de preparo, para cada lote de amostras de laranja *in natura* (a) e (b), as unidades coletadas foram quarteadas, duas partes opostas do quarteamento foram cortadas em partes menores e colocadas no liquidificador (c) e (d), sendo trituradas e homogeneizadas (f). A massa resultante foi armazenada em embalagem plástica (g), e refrigeradas para posterior análise.

Figura 30 - Etapas do preparo de amostras de laranja in natura

Fonte: autor, 2019

Os sucos de laranja foram adquiridos em supermercados e restaurante na região da zona Oeste de São Paulo. Na tabela 6 foram nomeadas as nove amostras de suco de laranja coletadas e as características correspondentes com a nomenclatura “SUCO - número da coleta”. Uma das amostras foi de suco fresco preparado no ato da compra em um restaurante nas proximidades da Universidade do Estado de São Paulo. O restante foram sucos industrializados conhecidos como sucos integrais e néctar. O motivo da escolha de sucos industrializados foi avaliar a qualidade (em relação ao resíduo de pesticidas) com que chegam ao consumidor após passarem por processos mecânicos de extração entre outras etapas industriais. O suco de laranja fresco foi acrescentado no corpo de amostras para a comparação dos de classe industrial com algum padrão natural.

Tabela 6 - Identificação das amostras de suco de laranja e características da embalagem

Identificação	Qualidade	Cidade em que foi produzido
SUCO-1	Suco natural fresco	*
SUCO 2	Suco integral orgânico certificado	Jarinu, SP
SUCO 3	Suco integral industrializado	Tabatinga- SP
SUCO 4	Suco integral industrializado	Tabatinga- SP
SUCO 6	Suco integral orgânico certificado	São Sebastião do Cai/RS
SUCO 7	Suco integral orgânico certificado	Lagarto/SE
SUCO 8	Néctar de laranja com 56% de suco integral	Visconde do Rio Branco - MG
SUCO 9	Néctar de laranja com 80% de suco integral	Jarinu, SP
SUCO 10	Suco integral orgânico certificado	Dobrada, SP

*Suco fresco extraído direto do fruto, comprado em restaurante da zona oeste de São Paulo.

Fonte: autor, 2019

4.3.1.2 Extração QuEChERS modificado acetato – otimizado

A amostras de laranja e suco de laranja foram preparadas conforme a metodologia QuEChERS modificado acetato, porém algumas modificações foram aplicadas durante o processo de desenvolvimento do método, abordado com mais detalhes no item “6 RESULTADOS E DISCUSSÕES”. Na figura 31 apresentou-se o fluxograma das etapas do preparo conforme o método QuEChERS modificado acetato – otimizado.

Figura 31 - Fluxograma preparo QuEChERS modificado acetato - otimizado

Fonte: autor, 2020

Na figura 32 foram ilustradas as etapas de pesagem, extração e partição. Uma massa de amostra com aproximadamente 15 g foi pesada em tubo Falcon de 50 mL com tampa (etapa 1 - pesagem). Em seguida foram adicionados 15 mL de acetonitrila acidificada 1% e uma unidade cerâmica, sendo a amostra agitada vigorosamente por 1 minuto (etapa 2 - extração).

Os kits de extração pesados previamente, compostos por 6 g de sulfato de magnésio anidro e 1,5 g de acetato de sódio anidro foram adicionados ao tubo Falcon, e a amostra foi agitada vigorosamente por mais 1 minuto (etapa 3 - partição). A mistura resultante foi centrifugada por 10 minutos com rotação de 5000 rpm para melhor separação das fases utilizando a temperatura de 22°C para evitar evaporação do solvente (etapa 4 - centrifugação).

Figura 32 - QuEChERS modificado acetato otimizado - etapas de extração e partição

Fonte: autor, 2019

Na etapa de *clean-up* do método QuEChERS modificado acetato são recomendados 150 mg de sulfato de magnésio anidro + 50 mg de amina primária secundária (PSA) para cada 1 mL de amostra extraída. Neste trabalho o método foi modificado, sendo acrescentado a esta etapa 100 mg de SPE C18 ODS. Conforme descrito na revisão bibliográfica, a adição de C18 com PSA melhora a remoção de lipídios e gorduras (KIM et. al, 2019; BERNARDI, 2017; PRESTES et. al, 2009), como é o caso da laranja, rica em óleos essenciais da casca.

Na figura 33 é demonstrado a etapa de *clean-up* e concentração do extrato. Aos kits de *cleanup* previamente pesados em tubo Falcon de 15 mL, foram adicionados 2mL de cada extrato de amostra sendo agitados vigorosamente por 1 minuto (etapa 5 – *Clean-up*) e centrifugados por 10 minutos a 5000 rpm a temperatura de 22°C (etapa 6 - centrifugação).

O extrato tratado foi filtrado em filtro 0,22 µm de PTFE hidrofílico para retirada de material particulado proveniente da *cleanup* e 1mL transferido para tubo *Eppendorf* (etapa 7 - filtrado), sendo levado para o concentrador a vácuo por 1 hora e 30 minutos a 40°C, sendo todo o solvente evaporado e restando somente o extrato seco no tubo *Eppendorf* (etapa 8 – extrato seco). Em seguida o extrato seco foi ressuspenso em 1mL de acetato de etila com auxílio de um vórtex e ultrassom até a dissolução. O extrato final foi analisado por GC-ECD e GC-MS.

Figura 33 - QuEChERS modificado acetato otimizado – *clean-up* e concentração do extrato

Fonte: autor, 2019

4.4 Metodologia analítica

4.4.1 Parâmetros de desempenho analítico

Com base na orientação sobre validação analítica DOQ-CGCRE-008-Rev.07-Jul/18, o método analítico no equipamento GC-ECD foi avaliado em relação as seguintes figuras de mérito: seletividade/efeito matriz, linearidade, limite de detecção e quantificação. Os dados obtidos foram tratados nos programas Excel 2013 e Action Stat versão 3.7_2019.

4.4.1.1 Seletividade/Efeito matriz

A avaliação da seletividade foi feita inicialmente por meio da análise comparativa de extratos da matriz com adição de padrões individuais em várias faixas de concentração, comparando-se com o branco e um padrão mix em matriz (contendo todos os pesticidas estudados), verificando-se a separação dos analitos de interesse e otimizando o método analítico a fim de melhorar a especificidade

A avaliação do efeito da matriz foi realizada pelo método de preparo de curva de calibração no extrato da matriz isenta de analitos de interesse e idêntica concentração em solvente orgânico acetonitrila acidificada a 1% com ácido acético (referência: método de extração QuEChERS modificado acetato otimizado). As curvas foram preparadas em triplicata, e os dados obtidos foram comparados, sendo avaliados: igualdade do intercepto, paralelismo e o teste de coincidência.

O critério para que a matriz não afete a precisão, o sinal e a inclinação da curva é que exista semelhança na inclinação das curvas de calibração na matriz e no solvente. Estas curvas de calibração foram utilizadas para o estudo de linearidade, detalhes sobre o preparo foram descritos no item “4.4.1.2 Linearidade”.

4.4.1.2 Linearidade

A linearidade foi determinada por meio da análise de três curvas de calibração preparadas no extrato da matriz de laranja, isenta dos analitos de interesse. Por se tratar de uma curva de calibração com mais de um analito, que apresentaram intensidades de sinal diferentes, a faixa de trabalho adotada foi de treze níveis de concentração. O pesticida Trifluralina é o que possui o menor LMR, por isso as soluções estoque dessa substância foram preparadas separadamente em concentrações menores conforme listado:

- Solução estoque 1 - Trifluralina: a partir da solução mãe de 100 mg. L⁻¹, preparou-se uma solução de 0,1 mg. L⁻¹ em solvente acetato de etila.
- Solução estoque 1 – Mix: a partir da solução mãe de 100 mg. L⁻¹ dos pesticidas Clorotalonil, Clorpirifós, Dicofol e Azoxistrobina, preparou-se uma solução de 5 mg. L⁻¹ em solvente acetato de etila.
- Solução estoque 2 - Trifluralina: a partir da solução mãe de 100 mg. L⁻¹, preparou-se uma solução de 1,0 mg. L⁻¹ em solvente acetato de etila.
- Solução estoque 2 – Mix: a partir da solução mãe de 100 mg. L⁻¹ dos pesticidas Clorotalonil, Clorpirifós, Dicofol e Azoxistrobina, preparou-se uma solução de 10 mg. L⁻¹ em solvente acetato de etila

As soluções estoque foram preparadas em solvente acetato de etila, esse solvente foi escolhido por ser miscível em acetonitrila que é o solvente de extração e em isooctano que é o solvente da maioria das soluções mãe.

Tabela 7 - Preparo e concentração das soluções-estoque 1 e 2

SOLUÇÃO ESTOQUE (S.E.) 1			
Padrão Pesticida	Concentração solução mãe (mg. L ⁻¹)	Alíquota solução mãe (mL)	Concentração Final (mg. L ⁻¹)
Trifluralina	100,4250	0,010	0,10
Clorotalonil	100,4700	0,498	5,00
Clorpirifós	100,4700	0,498	5,00
Dicofol	100,4700	0,498	5,00
Azoxistrobina	100,4700	0,498	5,00
SOLUÇÃO ESTOQUE (S.E.) 2			
Padrão Pesticida	Concentração solução mãe (mg. L ⁻¹)	Alíquota solução mãe (mL)	Concentração Final (mg. L ⁻¹)
Trifluralina	100,4250	0,100	1,0
Clorotalonil	100,4700	0,995	10,0
Clorpirifós	100,4700	0,995	10,0
Dicofol	100,4700	0,995	10,0
Azoxistrobina	100,4700	0,995	10,0

Fonte: autor, 2019

Com as soluções estoque preparadas, as curvas de calibração foram preparadas conforme a tabela 8 e 9.

Tabela 8 - Preparo da curva analítica dos níveis de concentração P1 a P6

Preparo - Curva Analítica – Níveis P1 a P6				
Nível de calibração	Alíquota S.E. 1 Trifluralina (mL)	Alíquota S.E. 1 mix (mL)	Concentração Final Trifluralina (mg. L ⁻¹)	Concentração Final - Mix pesticidas ** (mg. L ⁻¹)
P1	1,000	0,050	0,010	0,025
P2	2,000	0,100	0,020	0,050
P3	0,300	0,016	0,030	0,080
P4	0,400	0,020	0,040	0,100
P5	0,500	0,040	0,050	0,200
P6	0,060*	0,060	0,060	0,300

* No preparo do ponto P6 foi utilizado a solução estoque 2 do pesticida Trifluralina

** Mix pesticidas é denominado o padrão que contém os pesticidas Clorotalonil, Clorpirifós, Dicofol e Azoxistrobina.

Fonte: autor, 2019

Tabela 9 - Preparo da curva analítica dos níveis de concentração P7 a P13

Preparo - Curva Analítica – Níveis P7 a P13				
Nível de calibração	Alíquota S.E. 2 Trifluralina (mL)	Alíquota S.E. 2 mix (mL)	Concentração Final Trifluralina (mg. L ⁻¹)	Concentração Final - Mix pesticidas ** (mg. L ⁻¹)
P7	0,070	0,040	0,070	0,400
P8	0,080	0,050	0,080	0,500
P9	0,090	0,060	0,090	0,600
P10	0,100	0,070	0,100	0,700
P11	0,200	0,080	0,200	0,800
P12	0,300	0,090	0,300	0,900
P13	0,400	0,100	0,400	1,000

** Mix pesticidas é denominado o padrão que contém os pesticidas, Clorotalonil, Clorpirifós, Dicofoi e Azoxistrobina.

Fonte: autor, 2019

Após o preparo das diluições, os extratos das curvas de calibração foram levados para o concentrador a vácuo por aproximadamente 1h30min à temperatura constante de 40°C para evaporação do solvente acetonitrila. Os extratos secos foram ressuspensos em 1mL de acetato de etila, agitados em vórtex e ultrassom até dissolução para posterior análise em GC-ECD. Os dados obtidos no GC-ECD foram tratados no software Action Stat.

A linearidade da curva analítica foi demonstrada por meio regressão linear, coeficiente de determinação (r^2), coeficiente de correlação (r) e faixa linear de trabalho.

4.4.1.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O LD foi calculado por meio do método simplificado que utiliza a regressão da curva de calibração.

O LQ foi calculado por meio do método que utiliza a regressão da curva de calibração.

4.4.2 Curva Analítica

A curva analítica foi preparada em uma única replicata no extrato de laranja conforme o item “4.4.1.2 Linearidade”. Os extratos seguiram para análise em GC-ECD. Os dados obtidos foram tratados e construída a curva de calibração

sendo obtida a equação da reta (equação 1) para cálculo dos resultados das amostras.

4.4.3 Análise de pesticidas por GC-ECD

As análises foram feitas no GC-ECD 2010 plus marca Shimadzu, utilizando o método nomeado “Método Pesticidas_Met 3_V_7” com parâmetros otimizados listados na tabela 10.

Tabela 10 - Condições analíticas - GC-ECD – Método Pesticidas_Met 3_V_7

Parâmetro	Condição
Temperatura do injetor	250 °C
Volume de injeção	1 µL
Tipo de Injeção	Split/ divisão de 5
Controle de fluxo	Pressão/ 41,6 kPa
Fluxo total	10,1 mL/min
Fluxo da coluna	1,19 mL/min
Velocidade linear	22,7
Fluxo de purga no injetor	3,00
Temperatura Detector	300 °C

Parâmetros da rampa de aquecimento – GC-ECD		
Rampa de aquecimento (°C por minuto)	Temperatura (°C)	Manter por (minutos)
–	60	0
30	95	0
20	190	0
5	250	0
30	300	18

Fonte: autor, 2019.

A coluna cromatográfica utilizada foi a HP5 30 m x 0,32 mm e 0,25 um filme. A aquisição de dados e tratamento foram feitos através do software GC-Solutions. Posteriormente para cálculos da validação e quantificação das amostras foram utilizadas a plataforma Excel 2010 associado ao software Action Stat –versão 3.7_2019.

Para a quantificação das amostras aplicou-se o valor da área do analito na equação da reta (equação 1 – item 3.9.1.2) da curva de calibração, onde x é a concentração experimental.

Com a obtenção da concentração do equipamento é possível determinar o valor de concentração em massa dos analitos, relacionando os dados de massa e volume final utilizados no preparo, conforme a equação 9:

$$C_{amostra} = \frac{C_{equip} \times volume_{final} \times fator\ de\ diluição}{massa\ da\ amostra}$$
Equação 9

Onde,

C amostra: concentração de pesticida contido na amostra em mg kg⁻¹;

C equip: concentração do equipamento em mg L⁻¹ encontrada através da equação 1;

Volume final: volume de acetonitrila adicionado na extração (mL)

Fator de diluição: valor de diluição caso seja necessária

Massa da amostra: massa da amostra pesada para extração (g)

4.4.4 Análise de pesticidas por GC-MS

Após a análise por GC-ECD, os extratos foram analisados por GC-MS afim de confirmar a presença dos pesticidas. A partir do método analítico utilizado no GC-ECD, um método para o GC-MS com uma coluna semelhante de menor diâmetro (RTX 5 com 30 m, 0,25 m e 0,25 mm de filme) foi otimizado. Dois métodos foram utilizados no GC-MS, o método pesticidas SIM_2 e o método pesticidas SCAN_1. Os parâmetros analíticos foram descritos na tabela 11. A diferença entre o método SIM e o SCAN é que no método SIM o equipamento faz a leitura somente dos íons selecionados e por um tempo maior, apresentando um sinal mais intenso no cromatograma. No método SCAN é feito uma varredura em determinado tempo de corrida, diminuindo a intensidade dos analitos, porém dessa forma pode-se fazer a pesquisa para confirmação de estruturas na biblioteca NIST.

Tabela 11 - Condições analíticas GC-MS – Método Pesticidas SIM_2 e SCAN_1

Parâmetro	Condição	
Temperatura do injetor	250 °C	
Volume de injeção	1 µL	
Tipo de Injeção	Split/ divisão de 5	
Controle de fluxo	Pressão: 8,2317psi	
Fluxo total	9 mL /minuto	
Temperatura linha de transferência	300 °C	
Fluxo de purga no injetor	3,00 mL /minuto	
Tempo de corrida total: 34,583 minutos		
Parâmetros da rampa de temperatura – GC-MS		
Rampa de aquecimento (°C por minuto)	Temperatura (°C)	Manter temperatura por (minutos)
–	60	0
30	95	0
20	190	0
5	250	0
30	300	15

Fonte: autor, 2019.

A confirmação dos pesticidas foi feita através do monitoramento de pelo menos três íons fragmento, as referências utilizadas seguem na tabela 12.

Tabela 12 - Dados de íon molecular e íon fragmento dos pesticidas em estudo

Íons	Identificação do pesticida/ tempo de início de varredura				
	Trifluralina 0 min	Clorotalonil 8,50 min	Clorpirifós 11 min	Dicofol 11,25 min	Azoxistrobina 22,00 min
Íon Molecular (m/Z)	306	266	197	139	344
Íon fragmento 1 (m/Z)	264	264	197	139	344
Íon fragmento 2 (m/Z)	290	266	199	141	345
Íon fragmento 3 (m/Z)	306	268	314	251	372
Íon fragmento 4 (m/Z)	–	–	316	253	388

Fonte: autor, 2019.

Os resultados do equipamento foram tratados através do software *MSD Chemstation* com a consulta na biblioteca NIST para confirmação do espectro de massas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento da metodologia analítica foi feito em três grandes etapas que envolveram tanto os métodos de preparo de amostras quanto análises cromatográficas distintas.

5.1 Desenvolvimento – Etapa 1

5.1.1 Teste de preparo de amostras 1

Utilizando quatro amostras de sucos de laranja, foram testados dois métodos de extração: A – Extração líquido-líquido e B – QuEChERS Original. A escolha de iniciar os testes pela matriz de suco, é o fato de não ser necessário triturar a amostra como no caso da laranja. Nesta etapa preliminar foi analisado apenas um pesticida com carácter exploratório: o Dicofol que foi escolhido devido a sua sensibilidade de detecção no GC-ECD, sendo possível detectar baixas concentrações. A identificação dos sucos analisados constam na tabela 13.

Tabela 13 - Características dos sucos de laranja analisados

Identificação das amostras de Suco de laranja	Composição Tipo	Região onde foi produzido
SUCO Teste N	Integral/Natural	Estabelecimento na Zona oeste de São Paulo
SUCO Teste O	Integral/Orgânico	Jarinu, SP
SUCO Teste Q	Néctar - 50% suco	Tabatinga- SP
SUCO Teste C	Néctar - 40% suco	Guarulhos - SP

Fonte: autor, 2019

5.1.1.1 Método A - Extração Líquido-Líquido

Por meio do processo de partição de solvente na fase aquosa, os compostos de interesse migram da fase aquosa para a fase orgânica. Na figura 34 mostram-se os solventes de diferentes polaridades testados, de forma que uma alíquota de amostra e solvente em um tubo de ensaio foram agitadas e após um período de repouso observou-se a separação das fases.

Figura 34 - Tubos de ensaio com uma alíquota de suco e o solvente de extração, sendo (a) diclorometano; (b) acetona; (c) Heptano e (d) Hexano

Fonte: autor, 2019

Ao avaliar os testes de extração líquido-líquido, o solvente escolhido para execução de etapas posteriores de extração foi o hexano, pois além de apresentar uma melhor separação da amostra a sua estrutura não interfere no sinal do detector de GC-ECD.

Na etapa seguinte um litro das amostras de suco teste foi transferido para um funil de separação de dois litros. Como amostra em branco um litro de água tipo 1 foi utilizada e preparada como as demais amostras. O processo de extração consiste em adicionar 50mL de hexano no funil de separação, agitar por 2 minutos e deixar em repouso. Posteriormente recolher o extrato em um balão de 250mL de fundo chato com funil, filtrando-se em funil com filtro de papel quantitativo (filtração rápida) e sulfato de sódio conforme figura 35, na qual consta a identificação da esquerda para a direita da amostra suco teste N, O, Q e amostra em branco.

Figura 35 – Montagem da extração líquido-líquido de suco de laranja

Fonte: Autor, 2019

Porém, na primeira etapa de extração as amostras apresentaram formação de grandes quantidades de emulsão como mostrado na figura 36 durante o processo de extração líquido-líquido com hexano, em (a) foi possível observar uma pequena quantidade de solvente sobre grande quantidade de emulsão; em (b) a emulsão transferida para balão de fundo chato e adicionado sulfato de sódio para separação do solvente e da emulsão, em (c) a emulsão centrifugada com formação de quatro fases distintas, em (d) devido a formação de grande quantidade de emulsão na amostra, não ficou aparente a separação de solvente na fase superior. sendo inviável o tratamento da emulsão devido a quantidade desprezível de solvente recuperado.

Figura 36 - Etapas do teste de extração de suco – Método A

Fonte: autor, 2019

Devido a formação de emulsão em grande quantidade nos três sucos em teste, a extração líquido-líquido tornou-se inviável para este estudo.

5.1.1.2 Método B - Extração QuEChERS Original

O procedimento de preparo de amostras pelo método B QuEChERS original foi feito segundo o item “3.8.2.2 QuEChERS Original”. Foram preparados dois brancos de extração ambos utilizando água ultrapura como amostra. O primeiro branco foi extraído para avaliação de contaminação dos reagentes e sistema de extração. No segundo branco (branco fortificado) foi adicionado uma alíquota de padrão estoque de Dicofol antes da extração para avaliar a sua

eficiência. Foi feito o preparo de uma amostra fortificada para avaliação da recuperação do padrão. A concentração adicionada foi de 0,1mg L⁻¹ de padrão Dicofol e após o preparo, os extratos foram analisados em GC-ECD.

5.1.1.3 Método analítico experimental 1 – GC-ECD

Utilizando o método analítico experimental as amostras de suco de laranja foram analisadas. No equipamento GC-ECD foi instalada a coluna Equity TM-1701 de 30 m x 0,53 mm x 1,00 µm de filme, marca Supelco que é recomendada para compostos organoclorados. As condições do método seguem na tabela 14.

Tabela 14 - Condições analíticas método experimental 1- GC-ECD

Parâmetro		Condição
Temperatura do injetor		220 °C
Volume de injeção		1 µL
Tipo de Injeção		Split/ divisão de 5
Controle de fluxo		Velocidade linear
Fluxo total		5,72 mL/min
Temperatura do injetor		290 °C
Gás de arraste		N ₂
Parâmetros da rampa de aquecimento – GC-ECD		
Rampa de aquecimento (°C por minuto)	Temperatura (°C)	Manter por (minutos)
–	120	1
20	170	1
2	224	4
35	250	1

Fonte: autor, 2019

Uma curva de calibração foi preparada com um padrão estoque de Dicofol 1 mg L⁻¹ em acetato de etila nas seguintes concentrações: 0,005; 0,01; 0,025; 0,1; 0,2; e 0,3 mg L⁻¹ em solvente acetonitrila.

O limite de detecção (LD) encontrado foi de 0,005 mg kg⁻¹ e o limite de quantificação (LQ) foi de 0,025 mg kg⁻¹ para Dicofol. A figura 37 demonstra o cromatograma padrão de menor concentração da curva de 0,005 mg kg⁻¹ de Dicofol.

Figura 37 - Padrão na concentração de 0,005 mg kg⁻¹ com o pico de dicofol no tempo de retenção de 25,3 minutos

Fonte: Autor, 2019

A figura 38 demonstra o cromatograma do padrão da curva de 0,025 mg kg⁻¹ de Dicofol que seria o LQ do método em uso.

Figura 38 - Padrão de 0,025 mg kg⁻¹ com o pico de Dicofol em 25,3 minutos

Fonte: Autor, 2019

A curva de calibração apresentou um coeficiente de determinação $r^2 = 0,9987$ conforme a figura 39.

Figura 39 - Curva de calibração Dicofol feita no programa excel

Fonte: Autor, 2019

A concentração de Dicofol nas amostras foram calculadas através da equação 10:

$$y = 1,0120 \cdot 10^6 x + 1,3547 \cdot 10^{-4} \quad \text{Equação 10}$$

Onde,

y = Área

x = Concentração em mg kg⁻¹Coeficiente Angular = $1,0120 \cdot 10^6$ Coeficiente Linear = $1,3547 \cdot 10^{-4}$

Os resultados calculados para as amostras foram plotados na tabela 15.

Tabela 15 - Resultados – Análise de DICOFOL em amostras de suco de laranja

Identificação da amostra	Média das concentrações (mg kg ⁻¹)	Intervalo de confiança (mg kg ⁻¹)	Taxa de recuperação (%)
Amostra N	<LD	-	101
Amostra O	0,030	0,003	94
Amostra Q	<LD	-	105
Amostra C	<LD	-	148

Fonte: Autor, 2019

A figura 40 contém a sequência dos cromatogramas das amostras de suco analisadas. Nota-se que as amostras de suco N, O e Q apresentam um pico no tempo de retenção do Dicofol em 25,3 minutos e a amostra de suco C não

apresenta nenhum pico. Das amostras que apresentaram pico de Dicofol a única em que é possível mensurar a quantidade é a amostra de suco O, na qual o resultado de concentração é de $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$, e apesar do valor ser menor que LQ, o suco em questão é um suco Orgânico com selo e certificação exigida. Nesta etapa infelizmente não havia disponibilidade do GC-MS para fazermos a confirmação do resultado positivo. No período de realização de experimento o Dicofol ainda era permitido sendo o LMR $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$, porém com a proibição de produção de pesticida DDT, o Dicofol também foi proibido pois o DDT é uma impureza do processo de produção de Dicofol. Fazendo parte dessa família de substâncias o Dicofol entrou para a lista de restrição da convenção de Estocolmo como um dos poluentes orgânicos persistentes chamado POP (CETESB, 2020; STOCKHOLM CONVENTION, 2020) A resposta da recuperação esperada segundo a AOAC, 2007 para a adição destes padrões era de 80-100% e esse critério foi utilizado como indicado na orientação do guia de validação do INMETRO (2018). A recuperação da amostra C ficou acima do esperado, pode ter ocorrido algum erro no preparo ou na adição do padrão, possivelmente sendo adicionado o dobro de padrão, resultando em um valor super estimado. Avaliando o preparo e análise nesta 1ª etapa, observou-se que o GC-ECD tem uma boa sensibilidade analítica para o Dicofol sendo possível detectar baixas concentrações. O objetivo dos próximos testes foram: expandir a lista de pesticidas analisados e testar o método de QuEChERS modificado acetato comparando-o com o método de QuEChERS original.

Figura 40 - Cromatogramas das amostras de suco analisadas na etapa 1 de desenvolvimento

Fonte: autor, 2019

5.2 Desenvolvimento – Etapa 2

5.2.1 Método analítico experimental 2 – GC-ECD

Com alguns pequenos ajustes no método analítico 1 com a mesma coluna Equity - 1701, foram feitos testes com mais seis padrões a fim de se avaliar a resposta analítica. Nesta etapa foram avaliados sete pesticidas: Diclorvós, Dicofol, Clorpirifós, Tebuconazol, Trifluralina, Clorotolanil e Azoxistrobina. Na tabela 16 os dados do método analítico experimental foram plotados.

Tabela 16 - Parâmetros utilizados no método analítico 2 – GC-ECD

Parâmetro		Condição
Temperatura do injetor		220 °C
Volume de injeção		1,5 µL
Tipo de Injeção		Split/ divisão de 5
Controle de fluxo		Velocidade linear
Fluxo total		45 mL min ⁻¹
Temperatura do detector		280 °C
Fluxo de purga no injetor		3,00
Parâmetros da rampa de aquecimento – GC-ECD		
Rampa de aquecimento (°C por minuto)	Temperatura (°C)	Manter por (minutos)
–	120	1
20	170	1
2	224	4
35	250	5

Fonte: autor, 2019.

Dos sete pesticidas avaliados somente quatro foram separados nessa coluna com este método. Foram eles: Diclorvós em 4,70 minutos; Trifluralina em 12,25 minutos; Clorpirifós em 22,40 minutos e Dicofol em 23,40 minutos como estão representados na figura 41. O padrão utilizado foi o de concentração de 0,1 mg L⁻¹ para cada um dos pesticidas.

Figura 41 - Perfil cromatográfico dos padrões de pesticidas por GC-ECD – método analítico 2

Fonte: autor, 2019.

A curva de calibração foi preparada por meio de duas soluções padrão contendo os quatro pesticidas (padrão estoque mix) nas concentrações, sendo a solução estoque 1 de 1 mg L⁻¹ e solução estoque 2 de 10mg L⁻¹ em solvente acetonitrila. Os detalhes das concentrações estão na tabela 17.

Tabela 17 - Concentração da curva de calibração método analítico 2 – GC-ECD

Padrões Mix Pesticidas – Curva de calibração GC-ECD		
Identificação do padrão	Solução Padrão Estoque utilizada	Concentração (mg L ⁻¹)
P1	1	0,025
P2	1	0,050
P3	1	0,075
P4	1	0,100
P5	2	0,250
P6	2	0,500
P7	2	0,750
P8	2	1,000

Fonte: autor, 2019.

Os resultados das curvas de calibração foram plotados em um gráfico para observar a linearidade e o coeficiente de determinação, conforme observado nas figuras de 42 a 45.

Figura 42 - Curva de calibração do pesticida Diclorvós, concentração 0,025 a 0,25 mg L⁻¹.

Fonte: autor, 2019.

Figura 43 - Curva de calibração do pesticida, concentração de 0,025 a 0,50 mg L⁻¹

Fonte: autor, 2019.

Figura 44 - Curva de calibração do pesticida Clorpirifós, concentração de 0,025 a 0,50 mg L⁻¹.

Fonte: autor, 2019.

Figura 45 - Curva de calibração do pesticida Clorpirifós, concentração de 0,025 a 0,50 mg L⁻¹

Fonte: autor, 2019.

A partir dos dados obtidos das curvas de calibração do GC-ECD foram feitos os testes de preparo de amostras.

5.2.2 Teste de preparo de amostras 2

Nesta etapa foram testados cinco tipos de suco de laranja devido a questão de não haver necessidade de moagem prévia. As amostras foram preparadas pelo método QuEChERS original (QO) e QuEChERS modificado acetato (QM) conforme os itens 3.8.2.2 e 3.8.2.3. A amostras foram identificadas na tabela 18.

Tabela 18 - Características dos sucos utilizados no teste de preparo de amostras 2

Identificação do Suco	Características
SUCO A	Suco de laranja natural, comprado em lanchonete próxima a USP-Butantã - região Sudeste do Brasil
SUCO B	Néctar de laranja com 50% de polpa, produzido na região Sudeste do Brasil
SUCO C	Néctar de laranja com 50% de polpa, produzido na região Nordeste do Brasil.
SUCO D	Néctar misto de laranja e tangerina com 30% de polpa, produzido na região Sul do Brasil
SUCO E	Suco Orgânico de laranja integral (100%) produzido região Sudeste do Brasil

Fonte: autor, 2019.

Além dos preparos de amostras listadas na tabela 19 para determinação de concentração de pesticidas, foram feitas amostras fortificadas para avaliação da recuperação de padrão com a adição de padrão de 0,1mg kg⁻¹ de um padrão mix pesticidas conforme a tabela 19.

Tabela 19 - Resultados de concentração das amostras de suco analisadas por GC-ECD, utilizando o método analítico 2 e preparo de amostras 2

Identificação amostras	Diclorvós mg kg ⁻¹	Trifluralina mg kg ⁻¹	Clorpirifós mg kg ⁻¹	Dicofol mg kg ⁻¹
Suco A - QO	N.D.	N.D.	N.D.	0,029 ± 0,002
Suco B - QO	N.D.	N.D.	N.D.	≤ 1º ponto da curva
Suco C - QO	N.D.	N.D.	N.D.	≤ 1º ponto da curva
Suco D - QO	N.D.	N.D.	N.D.	≤ 1º ponto da curva
Suco E - QO	N.D.	N.D.	N.D.	0,103 ± 0,005
Suco A - QM	N.D.	N.D.	N.D.	0,053 ± 0,005
Suco B - QM	N.D.	N.D.	N.D.	≤ 1º ponto da curva
Suco C - QM	N.D.	N.D.	N.D.	≤ 1º ponto da curva
Suco D - QM	N.D.	N.D.	N.D.	0,040 ± 0,002
Suco E - QM	N.D.	N.D.	N.D.	0,070 ± 0,001

Legenda:

QO: extração por QuEChERS Original

QM: extração por QuEChERS Modificado

N.D.: Não detectado

Fonte: autor, 2019.

Avaliando os dados da tabela 19, observa-se que as amostras que apresentaram indício da presença do pesticida Dicofol foram: Suco A por QO e QM, Suco D por QM e Suco E por QO e QM.

Durante as análises foi observado que o método QM apresenta um pequeno aumento da linha de base em comparação com o método de QO.

Dos três sucos que foram encontrados a presença do pesticida Dicofol, o suco E que é um suco de origem orgânica certificada apresentou novamente o pesticida, agora na concentração de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ no método de extração QM. Vale ressaltar que o pesticida Dicofol foi preparado após janeiro de 2017, período no qual a ANVISA baniu a monografia deste pesticida em seus registros. Os processos de plantação de produtos com certificação orgânica seguem padrões rigorosos de qualidade, porém devido à característica persistente do Dicofol, há a hipótese que este pesticida esteja presente no solo e não que tenha sido adicionado no meio de cultura. Para confirmar a presença do Dicofol nessas amostras, os extratos foram analisado no GC-MS -2 utilizando o método conforme descrito no item 5.2.3.

Os resultados de recuperação das amostras fortificadas com padrão calculados por meio da equação foram apresentados na tabela 20.

Tabela 20 - Recuperação das amostras de suco fortificadas utilizando método analítico 2 e preparo de amostras 2

Resultados de Recuperação de amostras de suco de Laranja – Etapa 2 – Método QO e QM				
Taxa de recuperação em % (adição de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de cada padrão)				
Identificação amostra	Diclorvós	Trifluralina	Clorpirifós	Dicofol
Branco QO	111	79	86	67
Branco QM	113	60	59	50
Suco A QO	144	103	110	87
Suco B QO	68	92	104	81
Suco C QO	69	59	78	27
Suco D QO	59	103	103	91
Suco E QO	62	115	102	50
Suco A QM	103	78	71	72
Suco B QM	92	60	65	55
Suco C QM	75	57	58	47
Suco D QM	38	69	67	51
Suco E QM	**	81	62	57
Legenda: QO: extração por QuEChERS Original QM: extração por QuEChERS Modificado ** analito não detectado				

Fonte: autor, 2019.

Segundo os resultados apresentados na tabela 21 a metodologia QO apresentou valores que variaram de 59 a 144% para Diclorvós, 59 a 115% para Trifluralina, Clorpirifós de 78 a 110% e Dicofol de 27 a 91% de recuperação. Enquanto isso para a metodologia QM foram apresentados resultados para Diclorvós de 38 a 111%, Trifluralina de 57 a 81%, Clorpirifós 58 a 86% e Dicofol de 47 a 72% de recuperação. O valor esperado segundo a AOAC (2007) para esta concentração de padrão adicionada era de 80 a 110%. Observando os conjuntos de amostra, o método QO apresentou valores de recuperação mais compatíveis com a faixa esperada. Porém devido a variação nos resultados nos dois tipos de preparo, uma nova etapa de teste foi proposta a fim de avaliar a eficiência da *Clean-up* (limpeza do extrato com algum material adsorvente).

Nas análises por GC-MS descritas no próximo tópico 5.2.3, pode ser observado que a extração por QM fica com um pouco mais de ruído na linha de base do que o QO conforme a figura 46, na qual a linha de cor preta é o cromatograma do método QO e a rosa do método QM. Isso significa que o pH colabora para extração de mais substâncias interferentes de matriz, mas também pode auxiliar na extração dos pesticidas de interesse que não tenha uma extração eficiente utilizando outros métodos de extração como o QuEChERS original, conforme indicado por LEHOTAY et. al (2005). Nos cromatogramas apresentados na figura 45, pode-se observar o pico de Dicofol no tempo de retenção de aproximadamente 19,8 minutos, sendo que essa pequena mudança de tempo de retenção em relação ao padrão preparado em solvente pode ter ocorrido devido ao efeito da matriz laranja.

Figura 46 – Cromatogramas sobrepostos das análises de GC-MS dos sucos A, D e E por QO e QM

Fonte: autor, 2019.

5.2.3 Método analítico experimental 1 – GC-MS

A partir dos resultados encontrados no GC-ECD, para que fosse possível confirmar a presença dos pesticidas, foi otimizado um método analítico no GC-MS - 2. O artigo referência para a metodologia foi escrito por FERNÁNDEZ et. al, 2001. A coluna HP 1MS UI 30 m X 0,25 mm x 1,0 μ m de filme marca Agilent foi utilizada. As condições cromatográficas e de espectrometria de massas seguem na tabela 21.

Tabela 21 - Condições cromatográficas GC-MS – método 1

Condições de aquecimento – GC-MS		
Taxa de aquecimento (°C por minuto)	Temperatura (°C)	Manter por (minutos)
-	100	0
10	180	0
5	250	2
Condições Cromatográficas		
Parâmetro	Condição	
Volume de injeção	1 μ L	
Modo de injeção	Splitless	
Temperatura do injetor	250 °C	
Temperatura da fonte de íons	250 °C	
Temperatura da linha de transferência	250 °C	
Fluxo de gás Hélio	5,4 mL min ⁻¹ (total flow)	

Fonte: FERNÁNDEZ et. al modificado, 2001.

Através da análise pelo método *SCAN* foi possível encontrar o tempo de retenção do composto de 19,5 minutos.

Conhecido o tempo de retenção, um método *SIM* foi aplicado monitorando-se os íons fragmentos: 111, 139, 141, 250, 251 e 252 *m/z* no tempo de 18,5 a 21 minutos. O método *SIM* permite o aumento da intensidade do sinal, gerando cromatogramas com picos de melhor resolução, sendo possível fazer análises quantitativas.

O cromatograma de um padrão de Dicofol 0,5 mg L⁻¹ foi apresentado na figura 47 e seu respectivo espectro de massas na figura 48. O Espectro de massas apresenta o perfil do Dicofol, com a confirmação de três íons fragmento: 111, 139 e 250 *m/z*. Na figura 46 o eixo y representa a intensidade relativa e o eixo x o tempo de retenção do composto em minutos.

Figura 47 - Cromatograma do padrão Dicofol 0,5 mg L⁻¹ detectado em 19,50 minutos

Fonte: autor, 2019

Figura 48 - Espectro de massas do padrão Dicofol 0,5 mg L⁻¹. O eixo y representa a abundância em % e o eixo x a relação massa/carga (*m/z*)

Fonte: autor, 2019

Nas figuras 49, 50 e 51 constam os cromatogramas das amostras de suco A, D e E (extração QuEChERS original - QO) respectivamente sobrepostos com o padrão de menor concentração de $0,025 \text{ mg L}^{-1}$. Nas figuras aparecem três quadros, sendo que o primeiro quadro de cima para baixo a sobreposição dos cromatogramas padrão (linha preta) e amostra (linha rosa). O segundo é o espectro de massas do padrão e o terceiro é o espectro de massas da amostra.

Figura 49 - Cromatograma da amostra de suco A - QO sobreposta com o padrão de Dicofol - GC-MS - SCAN

Fonte: autor, 2019

Figura 50 - Cromatograma da amostra de suco D - QO sobreposta com o padrão de Dicofol - GC-MS – SCAN

Fonte: autor, 2019

Figura 51 - Cromatograma da amostra de suco E - QO sobreposta com o padrão de Dicofol - GC-MS - SCAN

Fonte: autor, 2019

Observando as figuras 49, 50 e 51 dos cromatogramas sobrepostos com os espectros de massa nota-se que o GC-MS tem sensibilidade analítica para determinação do pesticida Dicofol, porém quando se trata da matriz de suco de laranja, no perfil cromatográfico o pico não fica com boa resolução e no espectro só aparecem 2 íons fragmentos de confirmação. O efeito da matriz pode interferir

na detecção e suprimir o pesticida Dicofol, não sendo possível detectar o mesmo na amostra com baixas concentrações do analito. Não foi possível confirmar a presença de Dicofol através do método proposto pelo método analítico experimental 1 por GC-MS.

Durante o processo de testes no GC-MS a coluna HP 1 não apresentou sensibilidade para Diclorvós, Trifluralina e Clorpirifós. Isso pode ser explicado devido a sua alta polaridade da coluna, há maior retenção dos compostos na fase estacionária. Por isso, foi proposto novo teste com uma coluna HP 5 no GC-MS na próxima etapa de desenvolvimento.

5.3 Desenvolvimento Etapa 3

5.3.1 Método analítico Experimental 3

5.3.1.1 GC-ECD

Avaliando os dados obtidos e as substâncias em análise, consultando as fontes de pesquisa bibliográfica foram propostos três novos métodos analíticos com base nos artigos: LEHOTAY et. al 2005, AOAC 2007 e RISSATO et. al 2005. A coluna cromatográfica utilizada no GC-ECD foi a HP5 30m X 0,32mm x 0,25µm de filme marca Agilent Technologies.

Um padrão mix contendo os pesticidas Trifluralina, Clorotalonil, Clorpirifós, Dicofol e Azoxistrobina foi preparado, assim como as soluções contendo os analitos individualmente. A partir desse padrão uma série de testes com esses métodos foi executada, sendo avaliado seletividade e menor tempo de corrida. O método mais eficiente foi o baseado no artigo de LEHOTAY.et. al 2005.

Com o método de GC-ECD definido, foram feitas otimizações variando-se uma condição por vez como: fluxo, rampa de temperatura, condições do detector entre outros. Foram testados 25 condições diferentes até alcançar o método definitivo: “método Pesticidas HP 5 _3_V_7”. Esse método foi aplicado para a validação analítica, curva de calibração e análises das laranjas e sucos de laranja. A descrição detalhada das condições foram colocadas no tópico “4.4.3”, tabela 10.

5.3.1.2 GC-MS

O método implementado para análise por GC-ECD foi aplicado a técnica de GC-MS, porém adaptando a condição do espectrômetro de massa e a coluna utilizada de fase similar RTX-5 30 m X 0,25 mm x 0,25 µm de filme marca Restek, sendo esta coluna de diâmetro menor e mais apropriada para a técnica de GC-MS, conforme descrito na revisão bibliográfica.

No item “4.4.4” a tabela 11 contém os parâmetros dos métodos para GC-MS modo SIM e SCAN. O equipamento utilizado foi o GC-MS-1

No desenvolvimento do método para GC-MS foram analisados os padrões individuais e um padrão Mix primeiramente para confirmação dos analitos em modo SCAN. Na figura 52 consta o perfil cromatográfico de um padrão mix 10ppm modo SCAN, sendo os tempos de retenção aproximados dos analitos: Trifluralina em 7,8 minutos, Clorotalonil 9,7 minutos, Clorpirifós 11,2 minutos, Dicofol 11,4 minutos e Azoxistrobina em 22,8 minutos.

Figura 52 - Perfil cromatográfico GC-MS - padrão mix 10ppm modo SCAN

Fonte: Autor, 2019.

Os espectros de massas de cada pesticida foram consultados na biblioteca NIST. As ilustrações com os dados podem ser consultados no item “ANEXOS 1 a 5” O mesmo padrão foi analisado pelo método SIM e confirmado os tempos de retenção como é demonstrado na figura 53 com a sobreposição dos cromatogramas do método SIM (linha cor preto) e SCAN (linha cor azul).

Figura 53 – Sobreposição de cromatograma padrão- método GC-MS SIM e SCAN

Fonte: Autor, 2019

O método SIM do GC-MS foi utilizado para a confirmação dos pesticidas nas amostras. A condição SIM foi mais adequada já que o GC-MS não tem o mesmo nível de sensibilidade para concentrações de padrão pesticidas halogenados nível traço como o GC-ECD ou outros espectrômetros de massas triplo-quadrupolo que possuem melhor resolução e sensibilidade. Os equipamentos GC-MS 1 e o 2 utilizados neste trabalho possuem um “*single quadrupole*” como filtro de massas, que é uma configuração robusta e eficiente, porém das mais simples.

5.3.2 Preparo de amostras 3

5.3.2.1 Testes para avaliação da *Clean up*

Os testes de recuperação da etapa 2 de preparo de amostras apresentaram grande variação de resposta analítica. Por isso, nesta etapa foi avaliado o processo de limpeza da amostra, a *clean-up*. Os dois extratos de QuEChERS original e modificado acetato foram preparados a partir de uma matriz de laranja orgânica isenta de pesticidas, porém só a etapa extração e partição, sem a etapa de *clean-up*. Esses extratos foram fortificados com padrão mix pesticidas e

assim passaram pela etapa de *clean-up*. Kits de *clean-up* com proporções diferentes de adsorventes foram preparados conforme descrito na tabela 23.

Na tabela 22 a nomenclatura QO significa extrato preparado por QuEChERS original, assim como QM para método QuEChERS modificado. As siglas “LAR-O” significa laranja orgânica e “T1, 2 e 3” significa teste 1, 2 e 3. A matriz de laranja orgânica utilizada foi a mesma para todos os testes. A distinção por T1, 2 e 3 foi utilizada somente para ficar claro as três condições aplicadas de *clean-up*

Tabela 22 - Nome dos extratos e tipo de *clean-up* utilizada

Nome da amostra/Extrato QuEChERS	Kit de <i>Clean-up</i>
QO-LAR- O - T1/ QuEChERS original	2 mL de extrato + 50 mg PSA
QM-LAR- O – T2/ QuEChERS modificado	2 mL de extrato + 100 mg PSA
QM--LAR- O – T3 / QuEChERS modificado	2 mL de extrato + 100 mg PSA + 100 mg C18 ODS

Fonte: Autor, 2019

Na tabela 23 seguem os resultados de recuperação dos padrões após a *clean-up*. O critério adotado para recuperação segundo AOAC 2016 foi de 80 a 110%.

Tabela 23 - Resultados de recuperação para amostras em teste de *clean-up*

Nome da amostra/Extrato QuEChERS	Trifluralina (%)	Clorotalonil (%)	Clorpirifós (%)	Dicofol (%)	Azoxistrobina (%)
QO-LAR-O-T1 / QuEChERS Original	89	44	71	101	81
QM-LAR-O-T2 / QuEChERS Modificado	101	76	79	98	90
QM-LAR-O-T3 / QuEChERS Modificado	86	77	89	109	97

Fonte: Autor, 2019.

Segundo PRESTES et. al 2011, o adsorvente C18 pode ser utilizado na *clean-up* para remoção de compostos apolares e lipídios que interferem na detecção dos analitos de interesse.

No teste QM-LAR-O-T3 foi adicionado o C18 ODS, e observando os cromatogramas sobrepostos na figura 54 e os resultados de recuperação na tabela

23, observa-se que este último preparo teve uma eficiência melhor na recuperação do que dos outros preparos convencionais.

Figura 54 - Cromatogramas sobrepostos dos diferentes testes de *clean-up*. Em corte os analitos aproximados para melhor visualização

Fonte: autor, 2019

Portanto, o método de preparo de amostras definido foi: QuEChERS Modificado acetato com *clean-up* e acréscimo de 50 mg de C18 ODS. A nomenclatura que se refere a este método desenvolvido é “método QuEChERS modificado acetato otimizado” para que não seja confundido com o método oficial QuEChERS modificado acetato utilizado pela AOAC (2007).

Para a rotina foi aplicado o valor de 100 mg de C18 ODS na *clean-up* (conforme fluxograma da figura 31), pois o preparo foi proporcional ao dobro do volume de extrato de amostra. Preferiu-se trabalhar com a *clean-up* de 2 mL ao invés de 1 mL de extrato, pois durante esta etapa parte do extrato fica retido nos adsorventes, reduzindo muito o volume e dificultando a manipulação nas etapas seguintes.

5.4 Parâmetros de desempenho analítico

Segundo a orientação do guia de validação do INMETRO (2018) para que um método seja considerado quantitativo, devem ser apresentadas todas as figuras de mérito com exceção da robustez que é opcional. Em um método qualitativo devem ser apresentados os parâmetros seletividade e limite de detecção.

Neste trabalho somente etapas de seletividade/efeito matriz e LD foram atendidas para que a metodologia fosse considerada uma determinação qualitativa validada segundo as diretrizes do INMETRO.

Para as curvas preparadas na matriz foram determinadas a linearidade por meio da regressão linear, coeficiente de determinação (r^2), coeficiente de correlação (r) e faixa linear de trabalho.

O LQ e LD foram determinados por meio da regressão linear da curva analítica. Os dados apresentados foram obtidos por meio dos programas Excel 2013 e Action Stat versão 3.7_2019.

5.4.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada com a análise de padrões preparados em solvente orgânico e amostras de extrato de laranja com adição de padrões, sendo observado a separação dos picos a fim de garantir que o método obtivesse respostas individuais para cada analito de interesse, sem que um interferisse na resposta do outro. Inicialmente a avaliação foi visual e alguns ajustes no método foram necessários.

Posteriormente foi avaliado a efeito matriz com a análise de curvas de calibração em solvente e matriz de laranja orgânica.

Para avaliação do efeito matriz foi aplicado Modelo estatístico aplicado foi o de Regressão Linear com variáveis Dummy. Os itens de comparação da curva em solvente e curva na matriz de laranja foram: teste de igualdade do intercepto, paralelismo das retas das curvas e teste de coincidência, que foram listados na tabela 24.

Tabela 24 - Resultados de estudo do efeito matriz

Parâmetro	Trifluralina	Clorotalonil	Clorpirifós	Dicofol	Azoxistrobina
Igualdade do intercepto	Não possuem mesmo intercepto	Não possuem mesmo intercepto	Possuem mesmo intercepto	Não possuem mesmo intercepto	Não possuem mesmo intercepto
Paralelismo das retas	Não são paralelas	Não são paralelas	São paralelas	Não são paralelas	Não são paralelas
Teste de coincidência	Não são coincidentes	Não são coincidentes	São coincidentes	Não são coincidentes	Não são coincidentes
Matriz é interferente	SIM	SIM	NÃO	SIM	SIM

Fonte: autor, 2020

Na avaliação do efeito matriz é possível visualizar os diagramas de dispersão das curvas conforme na figura 55 e 56, sendo que sigla “com” representa a curva preparada com matriz e “sem” representa a curva preparada com solvente. É possível observar que o resultados do teste de paralelismo ficam mais evidentes.

Figura 55 - Diagramas de dispersão das curvas de calibração com e sem matriz da Trifluralina, Clorotalonil e Clorpirifós

Fonte: autor, 2020

Figura 56 – Diagramas de dispersão das curvas de calibração com e sem matriz da Dicofol e Azoxistrobina

Fonte: autor, 2020

Avaliando os dados obtidos no estudo de efeito matriz, o único pesticida que apresentou a mesma resposta de paralelismo e os outros itens para o caso da curva em solvente e matriz foi o Clorpirifós, para os restante dos pesticidas, a matriz interfere na resposta dos analitos. Como a curva de calibração é preparada a partir de uma solução estoque mix com todos os pesticidas, optou-se por trabalhar todos os parâmetros de desempenho analítico no extrato e matriz de laranja.

5.4.2 Linearidade

Por meio das curvas de calibração foram calculadas a regressão linear (equação 1) e encontrado o coeficiente de determinação (r^2) para cada um dos pesticidas, conforme ilustrado na tabela 25. O critério de aceitação segundo o INMETRO (2018) para $r^2 \geq 0,90$.

Tabela 25 - Coeficiente de correlação das curvas preparadas na matriz de laranja

Identificação da curva de calibração	Coeficiente de determinação (r^2)	Coeficiente de correlação de Pearson (r) *	Critério de aceitação r e $r^2 \geq 0,90$ (INMETRO, 2003)
Curva Trifluralina - 1	0,9817	0,9913	conforme
Curva Trifluralina - 2	0,9841		conforme
Curva Trifluralina - 3	0,9926		conforme
Curva Clorotalonil - 1	0,9821	0,9935	conforme
Curva Clorotalonil - 2	0,9885		conforme
Curva Clorotalonil - 3	0,9959		conforme
Curva Clorpirifós - 1	0,9811	0,9958	conforme
Curva Clorpirifós - 2	0,9925		conforme
Curva Clorpirifós - 3	0,9932		conforme
Curva Dicofol - 1	0,9929	0,9975	conforme
Curva Dicofol - 2	0,9988		conforme
Curva Dicofol - 3	0,9989		conforme
Curva Azoxistrobina - 1	0,9916	0,9971	conforme
Curva Azoxistrobina - 2	0,9969		conforme
Curva Azoxistrobina - 3	0,9974		conforme

Fonte: autor, 2020

*coeficiente de correlação de Pearson foi calculado por meio do software Action Stat por meio das três curvas de calibração de cada pesticida.

Por meio da linearidade das curvas de calibração e determinação do LD e LQ, foi determinada a faixa linear de trabalho linear de trabalho conforme descrito na tabela 26.

Tabela 26 - Faixa linear de trabalho dos pesticidas em curva matriz

Identificação do pesticida	Faixa de concentração (mg. L ⁻¹)
Trifluralina	0,03 - 0,10
Clorotalonil	0,30 – 0,70
Clorpirifós	0,30 – 0,90
Dicofol	0,11 – 0,50
Azoxistrobina	0,12 – 0,50

Fonte: autor, 2020

5.4.3 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção (LD) foi calculado através da regressão linear das curvas de calibração no método simplificado (equação 4 – item 3.9.1.3) das curvas de calibração. O LD de cada um dos pesticidas encontra-se na tabela 27.

Tabela 27 - Limite de detecção dos pesticidas em curva matriz

Identificação do pesticida	Limite de detecção – LD (mg. L ⁻¹)
Trifluralina	0,012
Clorotalonil	0,060
Clorpirifós	0,100
Dicofol	0,040
Azoxistrobina	0,040

Fonte: autor, 2020

5.4.4 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) foi calculado por meio da regressão linear das curvas de calibração (equação 5 – item 3.9.1.4). O LQ de cada um dos pesticidas encontra-se na tabela 28.

Tabela 28 - Limite de quantificação dos pesticidas em curva matriz

Identificação do pesticida	Limite de quantificação – LQ (mg. L ⁻¹)
Trifluralina	0,04
Clorotalonil	0,20
Clorpirifós	0,30
Dicofol	0,11
Azoxistrobina	0,12

Fonte: autor, 2020

5.5 Amostras de laranja e suco de laranja analisadas por GC/ECD e GC/MS

A curva de calibração contendo os cinco padrões preparada em matriz de laranja extraída pelo método QuEChERS acetato modificado otimizado foi analisada no GC-ECD. A regressão linear foi calculada por meio da equação da reta (equação 1), a qual foi utilizada para quantificar as amostras de laranja analisadas. As equações da reta estabelecidas para as curvas de calibração e o coeficiente de determinação (r^2) foram demonstradas na tabela 29.

Tabela 29 - Equação da reta e coeficiente de determinação (r^2) das curvas de pesticidas

Identificação da curva de pesticida	Equação da reta $y = a + b \cdot x$	Coeficiente de determinação (r^2)
Trifluralina	$y = -561,23 + 4,53 \cdot 10^6 \cdot x$	0,992
Clorotalonil	$y = -352136,83 + 2,08 \cdot 10^6 \cdot x$	0,995
Clorpirifós	$y = 456055,38 + 2,77 \cdot 10^6 \cdot x$	0,993
Dicofol	$y = 73223,97 + 9,24 \cdot 10^5 \cdot x$	0,998
Azoxistrobina	$y = -3747,78 + 1,26 \cdot 10^6 \cdot x$	0,997

Fonte: autor, 2020.

Por meio da equação da reta de cada pesticida, as amostras foram quantificadas. O resultado experimental juntamente com os dados das amostras de massa e volume de extração foram aplicados na equação 9 para o cálculo de concentração de pesticidas nas amostras.

Das onze amostras de laranja e nove amostras de suco de laranja analisadas, quatro amostras de laranja apresentaram resultado positivo para o pesticida Clorpirifós. A concentração de Clorpirifós foi calculada através da equação 1 e 4 já citadas anteriormente. Os dados calculados foram apresentados na tabela 30.

Tabela 30 - Resultados calculados – amostras de laranja

Identificação amostra	Concentração (mg. kg ⁻¹)	Origem
LAR - 2	≤ LD (0,1)	Bebedouro, SP
LAR - 5	0,038 ± 0,007	Zona Norte, SP
LAR - 6	0,040 ± 0,008	Zona Leste, SP
LAR - 9	0,011 ± 0,007	Ibiúna, SP

Fonte: Autor, 2019

Nas figuras 57 a 60 são apresentados os cromatogramas das amostras com resultado positivo para Clorpirifós.

Figura 57 - Sobreposição amostra LAR-2 com padrão – GC-ECD

Fonte: Autor, 2019

Figura 58 - Sobreposição amostra LAR-5 com padrão – GC-ECD

Fonte: Autor, 2019.

Figura 59 - Sobreposição amostra LAR-6 com padrão – GC-ECD

Fonte: Autor, 2019

Figura 60 - Sobreposição amostra LAR-9 com padrão – GC-ECD

Fonte: Autor, 2019.

As amostras de laranja LAR - 2, 5, 6 e 9 foram analisadas por GC-MS para confirmação da presença do pesticida Clorpirifós. Na figura 61 foram apresentados os cromatogramas do GC-MS sobrepostos com as amostras de laranja.

Figura 61 - Cromatogramas das amostras de suco de laranja sobrepostas com padrão de Clorpirifós – GC-MS – SIM.

Fonte: Autor, 2019

Avaliando os resultados das amostras observa-se que todas apresentam resultados menores que o LD do método ($\leq 0,1 \text{ mg kg}^{-1}$), em especial a amostra LAR-2 possui uma concentração menor que as outras amostras, ficando na altura do sinal ruído no GC-ECD. Apesar dos resultados de concentração estarem abaixo do LQ do método do GC-ECD há indicativos da presença do Clorpirifós por meio da análise de GC-MS-SIM com sobreposição dos cromatogramas.

Nas etapas de desenvolvimento dois sucos dentro todos os analisados apresentaram um resultado positivo, porém nessa ocasião não foi possível confirmar pela técnica de GC-MS, pois ainda não estava disponível. Esses dois sucos apresentaram a concentração de $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$ do pesticida Dicofol. Este pesticida foi banido das monografias pela ANVISA em 2017 e seu uso proibido devido a sua entrada na lista de restrição de poluentes orgânicos persistentes (POP) da convenção de Estocolmo. O DDT que já é uma ativo restrito e proibido no Brasil, é uma impureza encontrada na produção de Dicofol, por isso é importante controle desse pesticida halogenado nos alimentos (ANVISA, 2017; CETESB, 2020; STOCKHOLM CONVENTION, 2020)

Embora os resultados encontrados tenham sido de baixa concentração e dentro do LMR é importante o alerta de que produtos comuns e produtos com certificação orgânica que são oferecidos para os consumidores em mercados, feiras e comércios locais como sítios podem estar contaminados com pesticidas.

6 CONCLUSÃO

O desenvolvimento de técnica analítica para determinação multirresíduos de pesticidas em alimentos cítricos e análise por GC-ECD e GC-MS alcançou resultados satisfatórios de seletividade, com o estudo do efeito matriz e limite de detecção de acordo com o preconizado no método de validação analítica, podendo ser classificado como uma análise qualitativa validada para os pesticidas Trifluralina, Clorotalonil, Clorpirifós, Dicofol e Azoxistrobina.

A coluna cromatográfica de fase tipo HP-5 (5% difenildimetilsiloxano) de baixa polaridade foi a que apresentou melhor separação dos analitos de interesse.

A aplicação de diferentes métodos de preparo de amostra demonstrou que a metodologia QuEChERS é eficiente no preparo de matriz cítrica como a laranja e suco de laranja, sendo uma alternativa a métodos convencionais que dispendem de grandes quantidades de solvente como a extração líquido-líquido.

A comparação dos métodos QuEChERS original e QuEChERS acetato modificado para laranja com adição de padrão apresentou uma pequena diferença na linha de base do método modificado e dentro de um conjunto de amostras, o método original apresentou taxas de recuperação de padrão mais próximas do esperado segundo a AOAC (2016) na faixa de 80 a 120%. O método QuEChERS acetato modificado ainda pode ser otimizado com acréscimo de adsorvente SPE C18 ODS, que proporcionou a melhoria na limpeza da amostra (clean-up) diminuindo ruídos na linha de base. Com a avaliação dos resultados de preparo e indicação na literatura (LEHOTAY et. al, 2005) o método QuEChERS acetato modificado foi otimizado e aplicado as amostras deste estudo.

O método analítico demonstrou sensibilidade analítica para análises de resíduos de pesticidas em alimentos, apresentado valores de LD entre 0,01 a 0,04 mg. kg⁻¹ e LQ na faixa de 0,04 a 0,12 mg. kg⁻¹. Os valores de LD e LQ de obtidos alcançaram valores inferiores ao LMR dos pesticidas, sendo que com esta sensibilidade foi possível observar a presença ou ausência dos pesticidas em estudo, uma característica interessante para o monitoramento da qualidade dos alimentos.

A linearidade das curvas de calibração de cada pesticida apresentaram relação linear adequada com valores $\geq 0,99$ atendendo o coeficiente de determinação (r^2) $\geq 0,90$ como preconizado pelo INMETRO.

Foram analisadas no total 29 amostras (nove sucos de laranja na etapa experimental, onze laranjas mais nove sucos de laranja na aplicação do método validado). Na etapa experimental o pesticida Dicofol foi encontrado em quatro amostras de suco de laranja na concentração traço de 0,03 a 0,10 mg. kg⁻¹, sendo que duas amostras eram um suco orgânico certificado e este pesticida foi banido das monografias autorizadas pela ANVISA. Nas amostras analisadas com o método validado, o pesticida Clorpirifós foi encontrado em quatro amostras de laranja na concentração de 0,01 a 0,04 mg. kg⁻¹, valor inferior ao limite máximo de resíduo (LMR) de 2 mg. kg⁻¹ preconizado pela ANVISA.

Tendo em vista que o pesticida Clorpirifós encontrado nas amostras está na lista de reavaliação da ANVISA, o presente trabalho desenvolvido e aplicado a amostras de laranja e suco de laranja demonstra a importância do controle de qualidade dos alimentos e do desenvolvimento de análises cada vez mais sensíveis para monitoramento de agrotóxicos em alimentos, assegurando a saúde da população.

Como sugestões de trabalhos futuros:

- Execução da validação analítica quantitativa para maior confiabilidade nos resultados analíticos,
- Aumento da abrangência da área de coleta de amostras;
- Aplicação de Kits QuEChERS industriais a fim de comparar a robustez em relação a kits preparados manualmente em laboratório
- Acréscimo de técnicas analíticas como a espectrometria de massas triplo-quadrupolo ou *Orbitrap* para aumentar a sensibilidade analítica;
- Aumento da quantidade de pesticidas em estudo, para que seja possível avaliar de forma mais completa os alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. ABNT NBR ISO/IEC 17025: 2017 -Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. 2017.

AGÊNCIA CÂMARA DE NOTÍCIAS, 2018 – “Comissão especial aprova parecer que muda legislação brasileira sobre agrotóxicos”. Disponível em: <https://www.camara.leg.br/noticias/541040-comissao-especial-aprova-parecer-que-muda-legislacao-brasileira-sobre-agrotoxicos/> - acesso: julho de 2020.

AGROFIT, Plataforma do Ministério da Agricultura para consulta de ativos e produtos formulados como defensivos agrícolas. Disponível em <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em 20 mai.2019.

AGROZAPP, Estágios fenológicos da laranjeira. Disponível em: <<https://www.agrozapp.pt/multimedia/Infografias/estados-fenologicos-laranjeira>> Acesso em 17 nov.2019.

ANASTASSIADES. M.; LEHOTAY.S. J; STAJNBAHER.D. SCHENCK.F.J. Fast an Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/ Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticides Residues in Produce. ***Journal of de Association of Official Analytical Chemists***,2003, V.86. p 412.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – busca no site sobre ativos banidos em 2017 - disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso em 10.out.2018.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - Guia de coleta de amostras nº19/2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2957432/Guia+n%C2%BA+19-2019+-+vers%C3%A3o+2.pdf/43c1ad08-004b-4665-881d-6da2177e1f54>> Acesso em: 20 de junho de 2020.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - Legislação - Resolução da diretoria colegiada – RDC nº166 de 24/04/2017a. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401> – acesso em 15 de junho de 2020.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - RDC Nº 4, DE 18 DE JANEIRO DE 2012a. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/res0004_18_01_2012.html> Acesso em 10 out.2017.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA NOTA TÉCNICA Nº 15/2018/SEI/DICOL/ANVISA contrária a PL 6299/2002. Ano 2018a. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/4340788/___+SEI+_+ANVISA+-+0202694+-+Nota+T%C3%A9cnica+da+Dicol+__.pdf/7af8b109-5fbe-4338-b5fa-3698e513bf96. Acesso: julho de 2020.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA –Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA ANVISA 2012. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso em 05 ago.2015.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA **Reavaliação de Agrotóxicos**, atualizado em 11/10/2019 - Disponível em: portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/reavaliacao-de-agrotoxicos, ano 2019a – acesso em: 28/07/2020.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Agrotóxicos - Monografias autorizadas, consulta em 2018. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>> acesso em 15 de junho de 2018.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos, PARA. Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015. Publicação em 25 de novembro de 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>> Acesso em 25 jan.2019.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Revista **Saúde Pública**.V.40, nº2, 2006.

AOAC International, *Official methods of analysis of AOAC International*, in *Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F)*. Gaithersburg: AOAC International, 2016.

AOAC, *Association of Official Analytical Chemists* - Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate. **AOAC Official Method 2007.01**, 2007.

BERNARDI, G. **Agrotóxicos em vinho: avaliação do método QuEChERS e da microextração líquido-líquido dispersiva na determinação multirresíduo por UHPLC-MS/MS**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

BOTEON, M. Cadeia agroindustrial de citros. **Textos CEPEA/Esalq. Disponível em:** < <http://cepea.esalq.usp.br> >. Acesso em, v. 12, 2012.
BRASIL, 2019a – Tramitação da PL 6299/2002 na câmara dos deputados. **Câmara dos deputados**. Disponível em:
<<https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=46249>> – acesso em 7 de jul. de 2020

BRASIL, Decreto nº 6871 de 4 de junho de 2009 - Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em:
<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm>
Acesso 11 nov.2019.

BRASIL, LEI Nº 9.782, DE 26 DE JANEIRO DE 1999. Define o Sistema nacional de vigilância sanitária, cria a Agência nacional de vigilância sanitária, e dá outras providências. Disponível em:
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9782.html – acesso 7 de jul. de 2020 – acesso em 15 out. de 2019.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, MAPA. Decreto 4074-2002 de 04 de janeiro de 2002. Decreto que regulamenta a Lei 7802 de 11 de julho de 1989 que dispõe sobre agrotóxicos, seus componentes e afins e de outras providências. **Diário Oficial da União**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/decreto-4074-2002-decreto-dos-agrotoxicos/view>> Acesso 15 nov.2019.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, MAPA. Instrução Normativa Nº42, de 11 de setembro de 2013. Altera a quantidade mínima de suco de fruta nos néctares de laranja e uva. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-no-42-de-11-de-setembro-de-2013.pdf/view>. Acesso em 11 de Nov. de 2019

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Alimentos regionais brasileiros / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br>> Acesso em: 11 nov.2019.

BRASIL. Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L7802.htm - acesso: 20 de jun. de 2020

BRITO, Ruth Emily Santana Costa et al. O Projeto de Lei nº 6.299/2002 e as violações socioambientais. 2020.

BUSTILLOS, O.; SASSINE, A.; MARCH, R. **A espectrometria de massas quadrupolar**. 1º Ed. São Paulo: Editora Scortecci, 2003.

BUSTILLOS, O.V. A fonte de íons por impacto de elétrons na espectrometria de massas **Revista analytica**, 2019. Disponível em: <<https://revistaanalytica.com.br/a-fonte-de-ions-por-impacto-de-eletrons-na-espectrometria-de-massas/>> Acesso em: 13 nov.2019.

CARNEIRO, F. F. et al. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. EPSJV/Expressão Popular, 2015.

CATALANI, L.H. **Disciplina: QFL-5922 Espectrometria de Massa**, IQ USP. Disponível em: <http://www2.iq.usp.br/docente/lhc/disciplinas/qfl5922-2011/2011_massa_-_bloco_1_-_lique.pdf> Acesso em: 10 abr.2016.

CETESB – Introdução à Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes. Disponível em <https://cetesb.sp.gov.br/pops/wp-content/uploads/sites/19/2018/06/Hist%C3%B3rico-e-legisla%C3%A7%C3%A3o-de-poluentes-org%C3%A2nicos-persistentes-POPs-no-Brasil.pdf> – Acesso: julho de 2020

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

CHIARELLO, M. Determinação de resíduos de pesticidas em alimentos por cromatografia a líquido acoplada a analisadores de espectrometria de massas. 2019.

CHROMEDIA Analytical Sciences, ECD: Electron Capture Detector. Disponível em: <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=wbqucDsHqnOxmOIIEcCdCqBhBmB&subNav=qpbgcDsHqnOxmOIIEcCdCqBhBmBbC> Acesso em: 27 jul.2017.

CITRUS BR, **Associação Nacional dos exportadores de sucos cítricos** ANUÁRIO DA CITRICULTURA 2017 Disponível em: http://www.citrusbr.com/download/biblioteca/CitrusBR_Anuario_2017_alta.pdf >– acesso 7 de jul. de 2020.

CITRUS BR, **Associação Nacional dos exportadores de sucos cítricos**. Tipos de suco e bebidas de laranja. Disponível em: <http://www.citrusbr.com/laranjaesuco/?ins=21> Acesso em: 11 out.2019.

CNA, **Comissão Nacional de Fruticultura** – Cenário Econômico- Baixo estoque de suco de laranja deverá garantir a estabilidade nos preços pagos ao produtor para a compra antecipada da safra 2019/2020. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/boletinstecnicos/Antecipa-CNA-Cena%CC%81rio-Econo%CC%82mico-da-Fruticultura.pdf> Acesso em: 11 nov.2019.

CODEX ALIMENTARIUS – *Food and agriculture Organization of the United Nations (FAO-ONU)*. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/> Acesso em: 10 out.2018.

CODEX ALIMENTARIUS. **Recommended Methods of Sampling for the determination of Pesticide Residues for Compliance with MRLS CAC/GL 33**,1999.

COELHO, B. E.S.; DUARTE, V.M.; SILVA, L.F.M.; SOUZA, K.S.M.; NETO, A.S. Atributos físico-químicos de frutos de laranja 'Pêra' produzidos sob sistemas de cultivo orgânico e convencional. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 5, n. 1, 2019.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Editorada Unicamp, 2006.

COUTO, M. A. L.; BRAZACA, S.G. C, Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 15-19, 2010

CROCOLI, L. C.; ORTIZ, R. S.; MOURA, S. Development and validation of a qNMR method for analyses of legal and illegal formulations of glyphosate. **Analytical Methods**, 2019, v. 11, n. 31, p. 4052-4059.

DCTech Laboratory Technologies– **Entendendo um sistema cromatográfico**. Disponível em: <https://www.dctech.com.br/entendendo-um-sistema-de-cromatografia-gasosa-cg/> - acesso em 10 de outubro de 2019.

DELLOYD'S, figura dos tipos de coluna cromatográfica, publicação em 2000. Disponível em: <<http://delloyd.50megs.com/moreinfo/gaschrom.html>> Acesso em: 08 jun.2020.

DUTRA, R. M. S.; DE SOUZA, M. M. O. IMPACTOS NEGATIVOS DO USO DE AGROTÓXICOS À SAÚDE HUMANA. **Revista Hygeia**, 2017, v. 13, n. 24, p. 127-140.

ERPEN, L; MUNIZ, F.R.; MORAES, T.S.; TAVANO, E.C.R. Análise do cultivo da laranja no Estado de São Paulo de 2001 a 2015. **Revista IPecege**, Piracicaba, SP, Brasil, v. 4, n. 1, p. 33-43, mar.2018. ISSN 2359-5078. Disponível em: <<https://revista.ipecege.com/Revista/article/view/221/122>> Acesso em: 15 de out. de 2019.

EURL, DataPool, EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides. **European Commission**. Consulta estrutura dos pesticidas. Disponível em: <<https://www.eurl-pesticides-datapool.eu/Member/Compound>> Acesso em: 17 out.2019.

EUROPEAN COMMISSION. SANTE/11813/2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. **European Commission Directorate-General for Health and Food Safety**. v. 0, 2017.

FACCIABENE, D.– Figura do Espectrometro de massas - **Introduzione ala Spettrometria di massa in GC** – ThermoFisher. Disponível em: <<http://pt.slideshare.net/davidefacciabene/introduzione-alla-spettrometria-di-massa-in-gc>> Acesso em 10 abr.2016.

FAO (*Food and Agriculture Organization*). *Agricultural database*, 2003. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em: 15 nov2019.

FERNANDEZ, M.; PICO, Y.; MANES, J. Comparison of gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry for the residue analysis of pesticides in oranges. **Chromatographia**, v. 54, n. 5-6, p. 302-308, 2001.
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz - Nota técnica contra projeto que flexibiliza regulação de agrotóxicos. Ano 2018. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/fiocruz-divulga-nota-tecnica-contra-projeto-que-flexibiliza-regulacao-de-agrotoxicos> – acesso em: 20 de jul. 2020.

FUNDECITRUS – Programa de estimativa de safra (PES) - REESTIMATIVA DA SAFRA DE LARANJA 2019/20 DO CINTURÃO CITRÍCOLA DE SÃO PAULO E TRIÂNGULO/SUDOESTE MINEIRO – FECHAMENTO EM ABRIL/2020. Disponível em:https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0420_Reestimativa_da_Safra_de_Laranja.pdf - acesso: junho de 2020.

FUNDECITRUS, Consulta sobre doenças e pragas em Citros. Consulta pelo site: <https://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro> - Acesso em: 15 nov.2019a.

FUNDECITRUS, Fundo de Defesa da Citricultura – Unidos contra o *Greening*. Disponível em: <<http://unidoscontraogreening.com.br/>> Acesso em: 27 out.19.

GOMES, Pimentel. Livro **Fruticultura brasileira**. NBL Editora, 1973, p. 38-39.

GURGEL, A. M. et al. Reflexos da perda do controle estatal sobre os agrotóxicos no Brasil e sua regulação pelo mercado. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação & Inovação em Saúde**, v. 11, n. 3, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>> Acesso em: 15 de jul. de 2019.

IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Nota técnica Nº 2/2018/CGASQ/CGFIN contrária a PL 6299/2002. Ano 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/centrais-de-conteudo/sei-02000-000406-2016-93-pdf> – acesso: julho/2020

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático de produção agrícola, SIDRA – **Safra laranja 2019/2020** – Disponível em <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>>: acesso em 20 de jul. de 2020.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. **Nota Publica acerca do posicionamento do Instituto Nacional de Câncer sobre o projeto de lei nº 6299/2002**. Ano 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/notas-tecnicas/posicionamento-do-inca-sobre-o-projeto-de-lei-no-6299-2002>> - acesso: 7 de jul. de 2020.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE-008: **Orientação sobre validação de métodos analíticos. Instituto Nacional de Metrologia**, Documentação de carácter orientativo. Revisão 07, 2018.

KIM, L. et al. 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, p. e00063, 2019.

KUSSUMI, T.A. **Desenvolvimento de método multirresíduo para determinação de pesticidas benzimidazóis, carbamatos e triazinas em milho por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem e sua certificação**. 2007.149P. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/SP, São Paulo.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Editora Átomo, 2009.

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

LIMA, D. M. **Tabela brasileira de composição de alimentos-TACO**. Nepa-Unicamp, 2006.

LOVELOCK, J. E. **A detector for use with capillary tube columns in gas chromatography**. Revista *Nature*, 1958, v. 182, n. 4650, p. 1663-1664.

MAPA, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – Registros de agrotóxicos concedidos de 2005 a 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas> – acesso: 7 de jul. de 2020.

MATTOS J.D. de et al. Citros: principais informações e recomendações de cultivo. **Boletim Técnico**, v. 200, 2005

MIAO, Q. et al. Rapid analysis of multi-pesticide residues in lotus seeds by a modified QuEChERS-based extraction and GC–ECD. **Chemosphere**, 2013, v. 91, n. 7, p. 955-962

MORAES, R. F. de. **Agrotóxicos no Brasil: Padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**. Texto para Discussão, 2019. Disponível em: http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/9371/1/td_2506.pdf - Acesso: julho de 2020.

NAKANO, V. E. et al. Evaluation of pesticide residues in oranges from São Paulo, Brazil. **Food Science and Technology**, 2016, v. 36, n. 1, p. 40-48.

NASCIMENTO, R. F. do et, al. Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos. 2018.

NEVES, M. F. et al. O retrato da citricultura brasileira. **Ribeirão Preto: Citrus BR**, 2010

OECD, FAO. OECD-FAO agricultural outlook 2015. **Organization for Economic Co-operation and Development, Paris**, 2015.

PAS/OMS, 1996, **Manual de Vigilância de Saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília. Disponível em: <<http://ministeriodaagricultura.org.br>> Acesso em: 05 ago.2015.

PAVANI, N. D. Pesticidas: uma revisão dos aspectos que envolvem esses compostos. **Repositório Unesp Bauru**, 2016. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/discover>> Acesso: 28 out.2019.

PHENOMENEX soluções em química analítica. Figura de coluna cromatográfica. Disponível em: <<https://www.phenomenex.com/Info/Page/pahcolumns>> Acesso em: 08 jun.2020.

PIZZUTTI, I. R. **Validação de Métodos Multirresíduos de Extração e Desenvolvimento de Método de Purificação por GPC para Análise de Resíduos de Pesticidas em Soja utilizando GC-MS, GC-MS/MS e LC-MS/MS**. Tese de Doutorado, Universidade Federal Santa Maria, Santa Maria, 2006.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS, um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova** 2009, v. 32, n. 6, p. 1620-1634.

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**, 2011, v. 3, n. 1, p. 51-64.

RAFFERTY, J.P, James Lovelock. Britannica Online Encyclopedia, 2015. Disponível em: <<https://www.britannica.com/biography/James-Lovelock>> Acesso em: 17ago.2017.

RESTEK, Tabela de comparação de colunas. Disponível em: <<http://www.restek.com/Chromatography-Columns/GC-Columns/GC-Column-Cross-Reference-Columns-by-Phase>> Acesso em: 08 jun.2020.

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

RISSATO, S. R. et al. Development of a supercritical fluid extraction method for simultaneous determination of organophosphorus, organohalogen, organonitrogen and pyrethroids pesticides in fruit and vegetables and its comparison with a conventional method by GC-ECD and GC-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2005, v. 16, n. 5, p. 1038-1047

RODRIGUES, L. **Estudo de Agrotóxicos usados em agricultura através da técnica de difração de Raios X**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2012.

ROHR, C. **Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Determinação de Pesticidas Organoclorados (OCPs) e Bifenilas Policloradas (PCBs) em leite cru**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

SANTOS, M.A.T.; AREAS, M.A.; REYES, F.G.R. **Piretróides – Uma visão geral**. 2007, v.18, n.3, p.339-349.

SELLA, A. **Lovelock's Detector - Opinion, Chemistry World**. 2015. Disponível em: <<https://www.chemistryworld.com/opinion/lovelocks-detector/9181.article>> Acesso em: 18 ago.2017.

SILVEIRA, J. Q. ***Biodisponibilidade de flavononas e atividade antioxidante do suco de laranja fresco versus suco de laranja pasteurizado em humanos saudáveis***. 2014. 104 p. Tese (doutorado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/114027>> Acesso em: 20/10/2019.

SOMBRA, K. E. S. et al. A Citricultura Como Instrumento de Preservação da Agricultura Familiar no Semiárido Cearense. **Revista de Extensão e Estudos Rurais**, Brasil, 2018, v. 7, n. 1, p. 353-372.

STOCKHOLM CONVENTION - Persistent Organic Pollutants Review Committee (POPRC) – disponível em: <<http://www.pops.int/Convention/POPsReviewCommittee/Chemicals/tabid/243/Default.aspx>> - acesso 28/07/2020

VARELI, C. S. ***Métodos individual e multirresidual para determinação de agrotóxicos em camas biológicas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas***. 2018. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

VELASCO, L. O. M.; CAPANEMA, L.X.L. ***“O Setor de Agroquímicos”***. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, 2006, n.24, p. 69-96.

ANEXO 1 - Perfil cromatográfico da Trifluralina SCAN com confirmação do espectro de massas na biblioteca NIST.

ANEXO 2 - Perfil cromatográfico da Clorotalonil SCAN com confirmação do espectro de massas na biblioteca NIST.

ANEXO 4 - Perfil cromatográfico da Dicofol SCAN com confirmação do espectro de massas na biblioteca NIST

ANEXO 5 - Perfil cromatográfico da Clorpirifós SCAN com confirmação do espectro de massas na biblioteca NIST

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.