

Artigo Técnico

Técnicas analíticas para o controle de resíduos de agrotóxicos em alimentos cítricos

*Analytical techniques for pesticide
residues control in citrus foodstuffs*

Kelly Cristina Manhani^{a*}, João Paulo Amorim de
Lacerda^b, Viviane Emi Nakano^c, Lucas Monteiro
Santa Cruz^c, Alan Roberto Costa^c, Jose Oscar
William Vega Bustillos^d

^a Laboratório de Processos Químicos e Tecnologia de partículas, Núcleo de Bionanomanufatura, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A., São Paulo-SP, Brasil.

^b Laboratório de Química e Manufaturados, Núcleo de Bionanomanufatura, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A., São Paulo-SP, Brasil.

^c Núcleo de Contaminantes Orgânicos, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP, Brasil

^d Centro de Química e Meio Ambiente, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo-SP, Brasil.

Palavras-chave: laranja; agrotóxicos; QuEChERS, citros.

Keywords: orange; pesticides; QuEChERS, citrus.

*e-mail: kellym@ipt.br

Resumo

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, responsável pela exportação de três quartos de suco de laranja consumidos no mundo. Devido a posição de destaque na cadeia agroindustrial, a segurança alimentar é item fundamental para garantir a sustentabilidade produtiva, qualidade e competitividade de mercado. Dado a sua importância, com o objetivo de avaliar a qualidade dos citros, neste trabalho foram estudados três métodos de extração: “QuEChERS ORIGINAL”, “QuEChERS Acetato MODIFICADO” e extração Líquido-Líquido, com a utilização dos equipamentos GC/ECD e GC/MS para quantificação e confirmação dos analitos. O método QuEChERS está revolucionando o preparo de amostras de matrizes complexas, e neste estudo, foram avaliados a mudança de pH na extração bem como a proporção de amostra e adição de diferentes sais e adsorventes na etapa de limpeza da amostra (*Clean Up*) para a eficiência da extração dos ingredientes ativos. Parâmetros de qualidade analítica como seletividade/efeito matriz, linearidade, limite de detecção e quantificação foram estabelecidos para cinco agrotóxicos: Trifluralina, Clorotalonil, Clorpirifós, Dicofol e Azoxistrobina. Foram analisadas um total de 26 amostras de laranja Pêra e suco de laranja, coletadas em feiras livres, supermercados, sítios com produção local e restaurantes da cidade de São Paulo, dentre as quais, três amostras de suco analisadas durante o desenvolvimento apresentaram indícios do agrotóxico Dicofol, proibido pela legislação brasileira.

Abstract

Brazil is the world's largest producer of oranges, responsible for exporting three quarters of the orange juice consumed in the world. Due to its prominent position in the agro-industrial chain, food safety is a fundamental item to guarantee productive sustainability, market competitiveness and quality in production. Given its importance, with the objective of evaluating the quality of citrus, three extraction methods were studied in this work: “QuEChERS ORIGINAL”, “QuEChERS Acetate MODIFIED” and Liquid-Liquid extraction, with the use of GC/ECD and GC/MS for quantification and confirmation of analytes. The QuEChERS method is revolutionizing the preparation of samples from complex matrices, and in this study, the pH change in the extraction as well as the sample proportion and the addition of different salts and adsorbent phase in the sample cleaning step (clean up) for the efficiency of extraction of active ingredients. Analytical quality parameters such as selectivity/matrix effect, linearity, limit of detection and quantification were established for five pesticides: Trifluralin, Chlorothalonil, Chlorpyrifos, Dicofol and

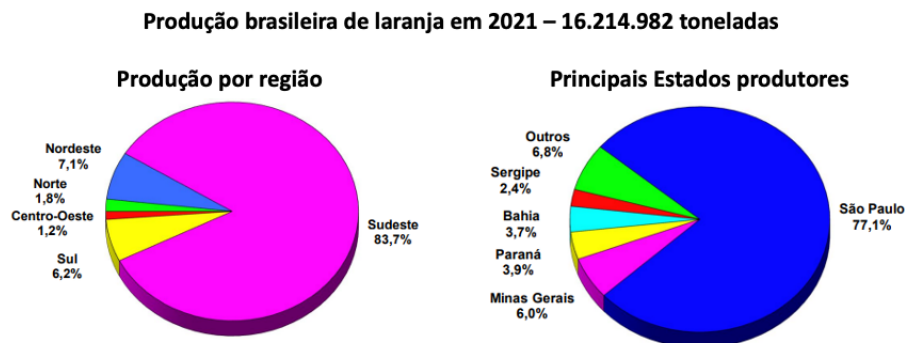
Azoxystrobin. 26 samples of pear orange and orange juice were analyzed, collected at street markets, supermarkets, sites with local production and restaurants in the city of São Paulo, among which, three samples of juice analyzed during the development showed evidence the pesticide Dicofol, which is prohibited by Brazilian law.

1 Introdução

A laranja é um dos alimentos cítricos mais consumidos no mundo. Além do aroma e sabor agradável, contém nutrientes e vitaminas que estão relacionados a benefícios à saúde (SILVEIRA, 2014).

O Brasil é o maior produtor de laranja do mundo, responsável por mais de um quarto da exportação *in natura* e três quartos da exportação mundial de suco de laranja (USDA, 2023; DA SILVA-DE PAULA, 2022). Em 2021, produziu 16.214.982 toneladas de laranja (FIGURA 1), dos quais São Paulo é o principal estado produtor (EMBRAPA, 2022).

Figura 1 - Produção de laranja no Brasil



Fonte: EMBRAPA, 2022 modificado pelos autores.

Na produção de frutos cítricos brasileiros, 80% são laranjas, e as mais cultivadas são das variedades: Pêra, Valência, Seleta, Natal, Baía e Baianinha da classe doce e ácida, e da qualidade sem acidez a laranja Lima e Piralima (BRASIL, 2015; NEVES, 2010).

Considerando a importância econômica e social da produção brasileira de laranja e outros cultivos, o Brasil como grande potência agropecuária tornou-se um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (GURGEL *et. al.*, 2017).

Segundo o relatório do Ibama, em 2011 as vendas de ingredientes ativos (i.a) em produtos formulados (PF) foram de 422.166,85 toneladas, sendo em 2021 um total de 720.869 toneladas, com crescimento expressivo entre 2018 e 2021 (IBAMA, 2022).

Os agrotóxicos são produtos químicos sintéticos utilizados para combater os insetos, larvas, fungos e carrapatos que são vetores de doenças em cultivos (INCA, 2022). A Fundação de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), instituição fitossanitária e de pesquisa, sem fins lucrativos, investiga doenças e pragas em culturas citros há mais de 20 anos. A instituição emite relatórios anuais de doenças, bem como orienta sobre manejo e tratamento para evitar a disseminação no cinturão citrícola de São Paulo, Minas Gerais e Paraná. Segundo os relatórios, as doenças e pragas mais comuns em citros são: Cancro cítrico; Clorose Variegada dos Citros (CVC) ou “amarelinho”; Greening, que é conhecido como HLB ou *Huanglongbing*; Leprose; Morte súbita dos citros (MSC); Pinta preta; Podridão floral. Entre as pragas, destacam-se: Ácaro da falsa ferrugem, Bicho Furão, Ortézia, Escama farinha (FUNDECITRUS, 2022).

Na formulação, o ingrediente ativo (i.a.) é o agrotóxico em sua forma sólida ou líquida concentrada, sendo o diluente o meio que auxilia na dispersão homogênea e mantém o i.a em suspensão para manipulação segura. Além do i.a e diluente, podem ser acrescentados aditivos surfactantes para melhoria de propriedades químicas, físicas e biológicas (SANTOS *et. al*, 2007).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) autoriza o uso dos agrotóxicos de acordo com os estudos de toxicidade e segurança alimentar, porém, o uso em excesso dessas substâncias e ausência de Boas Práticas Agrícolas (BPA) podem trazer riscos de intoxicação ao trabalhador rural e danos ao meio ambiente (ANVISA, 2015; CARNEIRO *et. al*, 2015; INCA, 2022;).

As técnicas analíticas aplicadas na determinação de resíduos em alimentos, devem garantir alta sensibilidade e robustez nas análises por instrumentação e não menos importante os métodos de preparo de amostras adequados para cada matriz, a fim de garantir a confiabilidade nos resultados obtidos (INMETRO, 2018; SANTE, 2017). Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo o estudo de uma metodologia para determinação multirresíduos de agrotóxicos em alimentos cítricos pelas técnicas de cromatografia GC-ECD e GC-MS. A determinação de resíduos nos alimentos torna-se ferramenta de grande valia na estimativa de exposição do ser humano e meio ambiente, bem como indicativo de BPA, ajudando na tomada de decisões regulatórias a fim de se garantir a segurança alimentar (ANVISA, 2012).

2 Procedimento metodológico

Cinco agrotóxicos foram analisados (Trifluralina, Clorotalonil, Clorpirifós, Dicofol e Azoxistrobina) em amostras cítricas pelas técnicas analíticas de cromatografia à gás com detector de captura de elétrons (GC-ECD) e cromatografia à gás com espectrometria de massas (GC-MS). As etapas de preparo e análise aplicadas às amostras resultaram de uma série de testes e desenvolvimento de métodos. Dentre essas duas etapas, foi dado ênfase ao preparo de amostras.

2.1 Coleta e moagem das amostras

Doze amostras de laranja Pêra foram coletadas em feiras livres, sítios e supermercados do Estado de São Paulo e nove amostras de suco de laranja integral produzidos no Brasil. Para amostras de laranja adotou-se a nomenclatura “LAR - número de coleta”, conforme descrito na TABELA 1. Também constam nesta tabela a descrição da origem e tipo de estabelecimento.

Tabela 1 - 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	Jaguará, 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 agrotóxicos – Fonte: elaborado pelos autores, 2023.

O preparo das amostras de laranja *in natura*, seguiu o Procedimento Operacional Padrão (POP) do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em alimentos (PARA), no qual foram coletadas uma quantidade mínima de 10 unidades de laranja, e o conjunto com massa ≥ 1 kg, acondicionadas sob refrigeração e preparadas no menor tempo possível para garantir a integridade do alimento (ANVISA, 2012a, ANVISA, 2019). Cada laranja foi quarteadada e duas partes opostas coletadas e cortadas em partes menores, trituradas e homogeneizadas, gerando uma massa que foi armazenada em embalagem plástica e refrigerada para posterior análise.

As nove amostras de sucos de laranja foram adquiridas em supermercados convencionais e restaurantes na região da zona oeste de São Paulo. Foram identificadas como “SUCO - número de coleta” e a descrição como tipo e cidade de origem de fabricação estão apresentadas na TABELA 2.

Tabela 2 - Identificação das amostras de suco de laranja e características da embalagem .

Identificação	Qualidade	Cidade em que foi produzido
SUCO-1	Suco natural fresco	São Paulo, SP
SUCO 2	Suco integral orgânico certificado	Jarinu, SP
SUCO 3	Suco integral industrializado	Tabatinga- SP
SUCO 4	Suco integral industrializado	Tabatinga- SP
SUCO 5	Suco integral orgânico certificado	São Sebastião do Cai/RS
SUCO 6	Suco integral orgânico certificado	Lagarto/SE
SUCO 7	Néctar de laranja com 56% de suco integral	Visconde do Rio Branco - MG
SUCO 8	Néctar de laranja com 80% de suco integral	Jarinu, SP
SUCO 9	Suco integral orgânico certificado	Dobrada, SP

Fonte:elaborado pelos autores, 2023.

2.2 Extração de resíduos de agrotóxicos

2.2.1 Desenvolvimento de métodos de extração

Com base em referências bibliográficas, três métodos foram testados conforme descrito nos sub itens.

2.2.1.1 Método 1 - Extração líquido-líquido

Testes preliminares da técnica de partição líquido-líquido foram testadas com amostra de suco de laranja, sendo os solventes utilizados: Diclorometano, Acetato de etila, Heptano e Hexano. Em aumento de escala, utilizando um funil de separação contendo 1 litro de suco de laranja, adicionou-se 50 mL do solvente com melhor eficiência para separação e cuja estrutura não interferiu no sinal do detector de GC-ECD (hexano), agitação por 2 minutos e repouso para separação de fases.

2.2.1.2 Método 2 - Preparo QuEChERS original

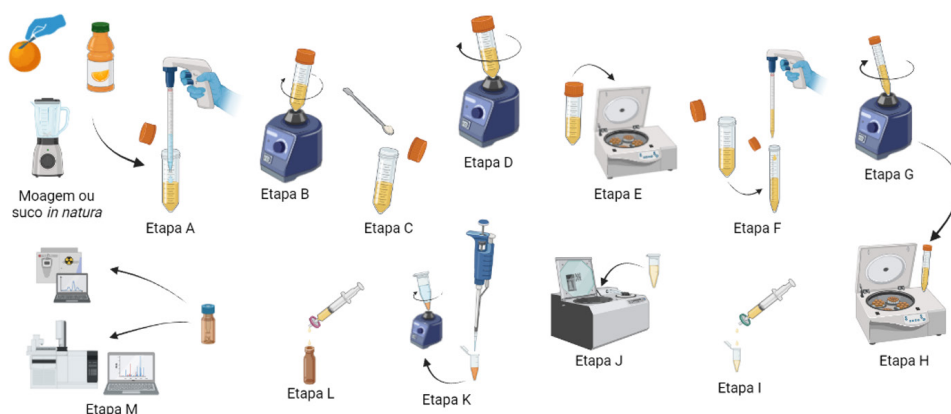
Em tubo Falcon de 50 mL, 10 g de amostra de suco de laranja foram pesadas, adicionados 10 mL de acetonitrila e agitou-se por 1 minuto. Adicionou-se 4 g de Sulfato de Magnésio Anidro (MgSO₄, Sigma Aldrich), 1 g de Cloreto de sódio (NaCl, Merck - P.A.) e agitou-se por 1 minuto. Centrifugou-se e transferiu-se 2 mL do sobrenadante para tubo de 15mL. A etapa de *Clean-Up* consistiu na adição de 300 mg de MgSO₄ anidro e 50 mg de Amina primária secundária (PSA - Agilent Technologies), agitação por 1 minuto, centrifugação e filtração (filtro 0,45 um PTFE hidrofílico, Allcrom). Para troca de solvente, 1 mL do extrato foi evaporado e ressuspendido em acetato de etila com ajuda de vortex e ultrassom, filtrado em filtro 0,22 um PTFE e analisado por GC-ECD e GC-MS.

Os equipamentos utilizados foram ilustrados na **FIGURA 2**, descritos com mais detalhes no método 3. A fim de comparar os dois métodos, o parâmetro de recuperação de padrão foi estudado.

2.2.1.3 Método 3 - Preparo QuEChERS Acetato Modificado Otimizado

O método QuEChERS acetato, da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) foi testado com modificações. Conforme demonstrado na FIGURA 2, 15 g de amostra de suco de laranja foram pesadas (Mettler Toledo - balança analítica AG 245) em um tubo falcon de 50 mL, adicionados 15 mL de Acetonitrila (Merck – grau HPLC) acidificada com ácido acético glacial (Tedia - grau ACS) a 1% (etapa A) e agitado vigorosamente por 1 minuto com cerâmicas para homogeneização (etapa B). Foram adicionados 6 g de sulfato de magnésio anidro (Sigma Aldrich – grau *Reagent Plus* 99,5%) e 1,5 g de acetato de sódio anidro (Sigma Aldrich – P.A 99%) (etapa C) com agitação vigorosa durante um minuto (etapa D). Após a centrifugação do material (centrífuga Himac CR22GII da marca Hitachi por 10 minutos a 5000 rpm e 22 °C - etapa E), dois tipos de limpeza foram testados (*Clean-Up*). Em ambas, uma alíquota de 2mL de extrato foi transferida para um tubo falcon de 15ml contendo *Clean Up* 1 - 300 mg de MgSO₄ anidro, 100 mg de amina primária secundária –PSA (Agilent Technologies) e para outro tubo contendo *Clean-Up* 2- 300 mg de MgSO₄ anidro, 100 mg de amina primária secundária – PSA (Agilent Technologies) e 200 mg de SPE C18 ODS (Agilent Technologies) (etapa F). Os tubos foram agitados por 1 minuto (etapa G), centrifugados (etapa H) e filtrados (Allcrom - filtro PTFE de 0,45 µm hidrofílico - etapa I) . Na etapa de troca de solvente, 1 mL do sobrenadante foi evaporado (evaporação por vácuo à 40°C por 1h30min - etapa J) ressuspendido em 1 mL de acetato de etila sob agitação (etapa K) e auxílio de ultrassom, filtrado (Allcrom - filtro PTFE de 0,22 µm hidrofílico - etapa L) e analisado por GC-ECD e GC-MS (etapa M).

Figura 2 - Etapas de extração das amostra pelo método QuEChERS acetato modificado. As etapas de preparo têm a mesma sequência do QuEChERS Original, com a diferença da quantidade de amostra/solvente e reagentes.



Fonte: elaborado pelos autores, 2023 (Created with BioRender.com).

2.3 Análise por GC-ECD e GC-MS

2.3.1 Curva de calibração

Para a quantificação de resíduos de agrotóxicos nas amostras, duas soluções estoque (S.E.) foram preparadas nas concentrações: S.E. 1 – 0,1 mg kg⁻¹ de Trifluralina e 5 mg kg⁻¹ para os demais i.a.; S.E. 2 - 1,0 mg kg⁻¹ de Trifluralina e 10 mg kg⁻¹ para os demais compostos, todos em solvente acetato de etila (Tedia – grau HPLC). A partir das diluições das S.E. 1 e 2, três curvas de calibração contendo treze pontos cada, foram preparadas no extrato de matriz de laranja orgânica isenta de contaminantes. A linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram determinadas para cada i.a. seguindo as orientações de validação analítica do INMETRO (DOQ-CGCRE-008-Ver.07-Jul/18 e o guia da Comissão Europeia SANTE 11813/2017.

2.3.2 Metodologia Analítica

Para as determinações por cromatografia à gás foi utilizado o equipamento GC-ECD 2010 Plus com radionuclídeo de ⁶³Ni, injetor automático AOC-20i marca Shimadzu e coluna cromatográfica HP5 30m X 0,32mm x 0,25µm de filme marca Agilent Technologies. As condições analíticas foram descritas na **TABELA 3**.

Tabela 3 – Descrição das condições analíticas para o equipamento GC-ECD.

Parâmetros		
Temperatura do injetor	250°C	
Tipo de injeção e volume	Split/ divisão de 5 e 1µL na injeção	
Controle de fluxo	Pressão/41,6 kPa	
Fluxo total	10,1 mL/min	
Fluxo da coluna	1,19 mL/min	
Velocidade linear	22,7 cm/sec	
Fluxo de purga no injetor	3,00 mL/min	
Temperatura detector	300°C	
Parâmetros da rampa de aquecimento		
Rampa de aquecimento (°C/min.)	Temperatura (°C)	manter por (minutos)
-	60	0
30	95	0
20	190	0
5	250	0
30	300	18

Fonte: elaborado pelos autores, 2023

Para as análises por cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas foi utilizado o equipamento modelo GC System 7890A acoplado a MS 5975C inert XL EI/CI MSD marca *Agilent Technologies*, injetor modelo CTC Analytics da Pal System, com a coluna cromatográfica similar a do GC-ECD porém com menor diâmetro, a RTX-5 30 m X 0,25 mm x 0,25 µm de filme marca Restek. As condições analíticas para o método SIM (Selective ion monitoring) e SCAN foram descritas na TABELA 4, totalizando 34,6 minutos de corrida.

Tabela 4 – Descrição das condições analíticas pelo método SIM e SCAN para o equipamento GC-MS.

Parâmetros	
Temperatura do injetor	250°C
Tipo de injeção e volume	Split/ divisão de 5 e 1µL na injeção
Controle de fluxo	Pressão: 8,2317 psi
Fluxo total	9 mL/minuto
Temperatura linha de transferência	300°C
Fluxo de purga no injetor	3,00 mL/minuto
Temperatura detector	300°C

Parâmetros da rampa de aquecimento		
Rampa de aquecimento (°C/min.)	Temperatura (°C)	manter por (minutos)
-	60	0
30	95	0
20	190	0
5	250	0
30	300	15

Fonte: elaborado pelos autores, 2023

Os íons monitorados pela técnica de GC-MS foram descritos na TABELA 5.

Tabela 5 – Íons monitorados para análise de resíduos de agrotóxicos por GC-MS (modo SIM).

Íons	Identificação do ingrediente ativo/tempo de início de varredura				
	Trifluralina	Clorotalonil	Clorpirifós	Dicofol	Azoxistrobina
	7,8 min	9,7 min	11,2 min	11,4 min	22,8 min
Íons molecular (m/Z)	306	266	197	139	344
Íons fragmento 1 (m/Z)	264	264	197	139	344
Íons fragmento 2 (m/Z)	290	266	199	141	345
Íons fragmento 3 (m/Z)	306	268	314	251	372
Íons fragmento 4 (m/Z)	-	-	316	253	388

Fonte: elaborado pelos autores, 2023

Os dados obtidos foram tratados pelo software GC-Solutions (GC-ECD) e *MSD Chemstation* (GC-MS) e os cálculos executados com auxílio do Excel 2010 e ferramenta Action Stat versão 3.7_2019.

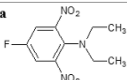

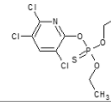
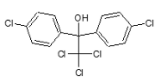
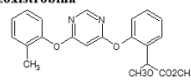
3 Resultados e discussão

Neste trabalho foi estudada 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). No preparo de amostras foram realizados estudos para comparar os métodos e verificar a eficiência de extração dos agrotóxicos da matriz e qual o mais adequado em relação a detecção do i.a. e o efeito matriz sobre o sinal do equipamento.

Os agrotóxicos em estudo foram selecionados com base nos resultados do PARA coordenado pela ANVISA, cujo programa de monitoramento é realizado em todos os Estados Brasileiros por uma rede de laboratórios oficiais e equipes de Vigilâncias Sanitárias. Das 744 amostras de laranja analisadas no período de 2013 a 2015, o i.a. Azoxistrobina foi encontrado em 71 amostras, Clorpirifós em 217 e Dicofol em 30 amostras. O Dicofol é um acaricida organoclorado que era utilizado para cultura citros, e se destaca por ter sido recentemente proibido pela ANVISA, e adicionado à convenção de Estocolmo devido a sua classificação como POP (Poluente Orgânico Persistente). NAKANO *et al.* analisaram resíduos de agrotóxicos em laranja Pêra utilizando a técnica analítica de GC-micro ECD. Dentre os pesticidas analisados, o Clorpirifós e Dicofol foram encontrados nas amostras, indicando o uso sistêmico, com risco de desenvolvimento de resistência das pragas submetidas a esse tratamento agroquímico (NAKANO *et al.*, 2016). O i.a. Clorpirifós está sob reavaliação da ANVISA e outros órgãos internacionais do Canadá, Austrália e EUA. O motivo da reavaliação são aspectos toxicológicos como mutagenicidade e toxicidade para o desenvolvimento, especialmente a neurotoxicidade para o desenvolvimento encontrados em estudos recentes (ANVISA, 2021).

Os outros i.a analisados, a Trifluralina que é um herbicida e Clorotalonil são utilizados para cultura citros (AGROFIT, 2019; ANVISA, 2016). A **FIGURA 3** ilustra as características dos agrotóxicos avaliados.

Figura 3 - Características dos agrotóxicos avaliados em cultura de citros.

Ingrediente Ativo	Nomenclatura	Fórmula molecular	Massa molecular g.mol ⁻¹	CAS	LMR mg.kg ⁻¹	Grupo químico	Ação
 Trifluralina	<i>α,α,α</i> -trifluoro-2,6-dinitro- <i>N,N</i> -dipropyl- <i>p</i> -toluidine	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄	335,283	1582-09-8	0,05	Dinitroanilina	Herbicida
 Clorotalonil	tetrachloroisopt halonitrile	C ₅ Cl ₄ N ₂	265,91	1897-45-6	0,5	Isoftalonitrila	Fungicida
 Clorpirifós	<i>O,O</i> -diethyl <i>O</i> -3,5,6-trichloro-2-pyridylphosphorot hioate	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	350,575	2921-88-2	2,0	Organofosforado	Inseticida, formicida e acaricida
 Dicofol	2,2,2-trichloro-1,1-bis(4-chlorophenyl)	C ₁₄ H ₉ Cl ₅ O	370,475	115-32-2	Proibido	Organoclorado	Acaricida
 Azoxistrobina	methyl (2 <i>E</i>)-2-[2-(6-(2-cyanophenoxy)pyr imidin-4-ylloxy]phenyl]-3-methoxyacrylate	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	403,4	131860-33-8	0,5	Estrobilurina	Fungicida

Fonte: MANHANI, K.C.,2019 adaptado.

Nos testes comparativos dos métodos, o de extração líquido-líquido apresentou problemas, com formação de grande quantidade de emulsão, tornando-se inviável a separação do solvente e a matriz. Na extração via QuEChERS ORIGINAL (Método 2), a separação dos analitos da matriz foi feita por meio do uso de acetonitrila, sulfato de magnésio e cloreto de sódio, e no QuEChERS MODIFICADO (Método 3), além de uma alíquota maior de amostra, utilizou-se acetonitrila acidificada (1% ácido acético), sulfato de magnésio e acetato de sódio. Ambos os métodos têm as etapas de extração similares, com a diferença da quantidade de amostra e tipos de reagentes. O método de preparo de amostras QuEChERS, sigla em inglês que significa *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* (rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro) foi desenvolvido em 2003 por ANASTASSIADES *et. al.*, bastante divulgado e empregado no preparo de amostras complexas como as amostras de alimentos. O processo de extração por QuEChERS consiste em três etapas: 1^a extração com solvente; 2^a adição de sais para partição da amostra e 3^a limpeza com fase sólida dispersiva (*Clean-Up*). A adição de sais 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 (PRESTES, *et.al.*, 2011).

Em análises iniciais do i.a. Dicofol por GC-ECD para cinco sucos de laranja, todas indicaram a presença deste agrotóxico, sendo que um deles era de categoria orgânica certificada (amostra E).

Em uma segunda etapa de testes, foram comparados os métodos de extração 2 e 3 para os i.a. Trifluralina, Clorpirifós e Dicofol na concentração de 0,1mg kg⁻¹ para avaliar a resolução dos i.a. e ruídos de linha de base. Os resultados encontrados por GC-ECD para cinco sucos estão apresentados na **TABELA 6**.

Tabela 6 - Resultados das amostras em testes preliminares com aplicação dos métodos de preparo de amostras 2 e 3 e recuperação de padrão.

Identificação das amostras	Trifluralina		Clorpirifós		Dicofol	
	¹ Conc. Amostra mg kg ⁻¹ /Rec %		¹ Conc. Amostra mg kg ⁻¹ /Rec %		¹ Conc. Amostra mg kg ⁻¹ /Rec %	
	² Met. 2	³ Met.3	² Met. 2	³ Met.3	² Met. 2	³ Met.3
Branco	N.D./79,0	N.D./60,0	N.D./86,0	N.D./59,0	N.D./67,0	N.D./50,0
Suco A	N.D./103,0	N.D./78,0	N.D./110,0	N.D./71,0	0,029+-0,002/87,0	0,053+-0,002/72,0
Suco B	N.D./92,0	N.D./60,0	N.D./104,0	N.D./65,0	< 0,025*/81,0	< 0,025*/55,0
Suco C	N.D./59,0	N.D./57,0	N.D./78,0	N.D./58,0	<0,025*/27,0	< 0,025*/47,0
Suco D	N.D./103,0	N.D./69,0	N.D./103,0	N.D./67,0	< 0,025*/91,0	0,040+-0,002/51,0
Suco E	N.D./115,0	N.D./81,0	N.D./102,0	N.D./62,0	0,103+-0,005/50,0	0,070+-0,001/57,0

¹Concentração da amostra sem a adição do padrão

²Met.2 - Método de preparo de amostras 2

³Met.3 - Método de preparo de amostras 3

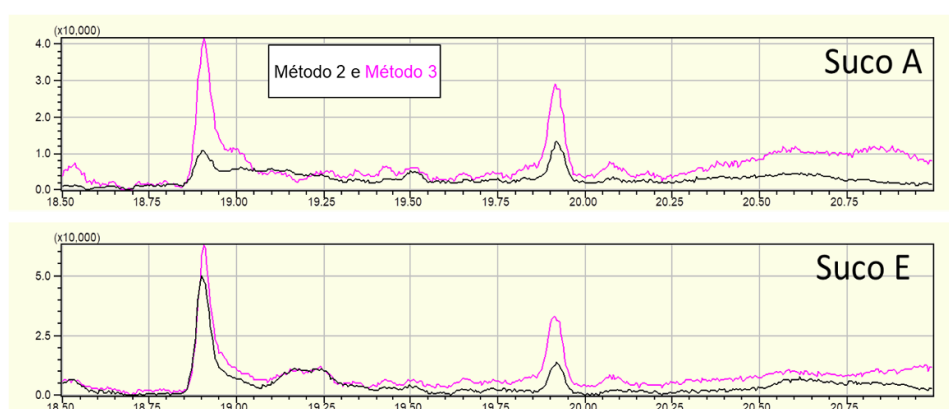
N.D. - ingrediente ativo não detectado

< 0,025* - pico de Dicofol detectado, porém com concentração menor que o primeiro ponto da curva (0,025 mg kg⁻¹)

Fonte: elaborado pelos autores, 2023.

Das cinco amostras avaliadas, duas amostras (A e E) apresentaram i.a. Dicofol acima do primeiro ponto da curva de calibração ($0,025 \text{ mg kg}^{-1}$) pelo preparo do método 2 e três amostras (A, D e E) pelo método 3. Na análise por GC-ECD e GC-MS observou-se que o método 3 apresentou maior ruído na linha de base do cromatograma, conforme demonstrado com as amostras A e E na **FIGURA 4**. Isso significa que o pH colabora para extração de mais substâncias interferentes de matriz, mas também pode auxiliar na extração dos i.a. de interesse que não tenham uma recuperação eficiente utilizando outros métodos de preparo como o QuEChERS original, conforme indicado por LEHOTAY *et al.* (2005).

Figura 4 - Cromatogramas de GC-MS sobrepostos - método 2 na cor preto e método 3 na cor rosa



Fonte: elaborado pelos autores, 2023

Os métodos 2 e 3 foram testados em relação à etapa de *Clean Up*. Extratos de matriz de laranja orgânica isenta de contaminantes, com adição de padrão, foram submetidas à etapa de *Clean Up*. Três testes foram executados, conforme a descrição:

- Método 2 - *Clean Up* 1: Extrato preparado conforme método 2 e adição de padrão, etapa de limpeza com 300 mg de MgSO_4 anidro e 50 mg de PSA
- Método 3 - *Clean Up* 1: Extrato preparado conforme método 3 e adição de padrão, etapa de limpeza com 300 mg de MgSO_4 anidro e 100 mg de PSA
- Método 3 - *Clean Up* 2: Extrato preparado conforme método 3 e adição de padrão, etapa de limpeza com 300 mg de MgSO_4 anidro, 100 mg de PSA e 100 mg de C18 ODS.

Os resultados obtidos para os testes foram apresentados na **TABELA 7**.

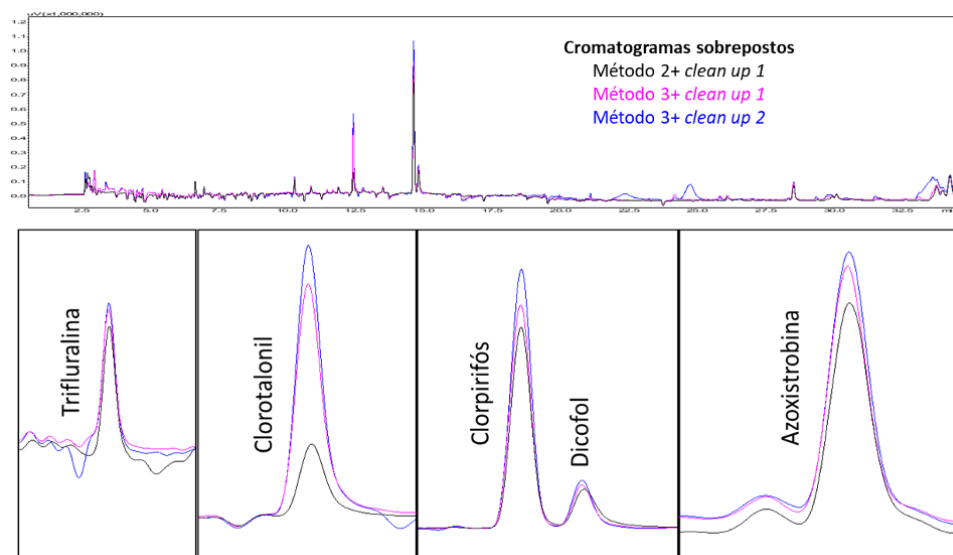
Tabela 7 - Resultados dos testes e *Clean Up* para os métodos de preparo de amostras 2 e 3.

Identificação do teste	Trifluralina Rec (%)	Clorotalonil Rec (%)	Clorpirifós Rec (%)	Dicofol Rec (%)	Azoxistrobina Rec (%)
Método 2 - <i>Clean up</i> 1	89	44	71	101	81
Método 3 - <i>Clean up</i> 1	101	76	79	98	90
Método 3 - <i>Clean up</i> 2	86	77	89	109	97

Fonte: elaborado pelos autores, 2023.

Na FIGURA 5 foram apresentados o cromatograma dos testes descritos na TABELA 7 e o corte para cada banda cromatográfica dos i.a.

Figura 5 - Cromatogramas dos testes de preparo de amostras descritos na Tabela 7.



Fonte: elaborado pelos autores, 2023.

Avaliando os resultados de todos os preparos, os testes de recuperação com maior eficiência foram os preparados com o método 3. Este método teve como referência bibliográfica o artigo de LEHOTAY *et al.* (2005), no qual foi indicado mudanças de reagentes e proporção, faixa de pH em 4,8 para melhoria de recuperação de i.a. A otimização foi feita com adição de maior quantidade de adsorvente PSA e acréscimo de C18 ODS para a diminuição de interferentes da matriz como óleos presentes na casca da laranja que possam co-eluir com os analitos de interesse, sendo portanto o método 3 adotado para a análise das demais amostras.

Para as análises por GC-ECD e GC-MS foram testados 25 condições, entre troca de coluna, rampa de temperatura, modo de injeção e fluxo de gás, até obter a melhor seletividade, resolução dos picos, intensidade de sinal, com um tempo de análise adequado. Inicialmente o método foi desenvolvido no GC-ECD e depois otimizado no GC-MS, para identificação confiável dos agrotóxicos.

Como parâmetros de qualidade, foram determinados LD, LQ, coeficiente de determinação (r^2), coeficiente de correlação (r) e faixa linear de trabalho com base em 3 curvas de calibração preparadas na matriz de extrato de laranja, conforme apresentados na **TABELA 8**.

Tabela 8 - Parâmetros de qualidade para os ingredientes ativos no método QuEChERS modificado

Identificação do i.a.	Trifluralina mg kg ⁻¹	Clorotalonil mg kg ⁻¹	Clorpirifós mg kg ⁻¹	Dicofol mg kg ⁻¹	Azoxistrobina mg kg ⁻¹
Limite de detecção (LD)	0,012	0,060	0,100	0,040	0,040
Limite de quantificação (LQ)	0,04	0,20	0,30	0,11	0,12
Coeficiente de determinação (r^2) (com base em 3 curvas de calibração)*	0,992	0,995	0,993	0,998	0,997
Coeficiente de Correlação de Pearson (r)*,**	0,9913	0,9935	0,9958	0,9975	0,9971
Faixa linear de trabalho	0,03-0,10	0,30-0,70	0,30 - 0,9	0,11-0,50	0,12-0,50

*Como critério de aceitação para r e r^2 foi adotado o valor $\geq 0,90$ (INMETRO, 2003).

**O coeficiente de Pearson foi calculado pelo software Action Stat por meio das três curvas de calibração.

Fonte: elaborado pelos autores, 2023

Com os métodos de preparo e análise definidos, as 21 amostras cítricas foram analisadas utilizando o método de preparo de amostra 3, análise por GC-ECD e análise por GC-MS utilizando o método SIM.

A técnica analítica de GC-ECD é uma das mais sensíveis para determinação de compostos halogenados, podendo fazer leitura de picogramas (10^{-12} g) de concentração, sem interferência de solventes derivados de hidrocarbonetos, considerada uma técnica sensível, reproduzível, simples e de fácil operação para determinação dos i.a. como o Dicofol, Clorotalonil, Trifluralina, Clorpirifós e também Azoxistrobina.

Apesar de nas etapas de desenvolvimento três amostras de suco de laranja, dentre elas um da classe orgânica, apresentarem indícios da presença do agrotóxico Dicofol, na aplicação do método e preparo desenvolvido, nenhuma amostra apresentou tal agrotóxico. Para as 12 amostras de laranja, um pico no tempo de retenção do agrotóxico Clorpirifós (composto organofosforado) foi encontrado em três amostras, porém não pode ser confirmado na análise por GC-ECD e GC-MS devido à concentração menor que a detectável pelo equipamento de forma confiável ($<LD - 0,1 \text{ mg kg}^{-1}$).

A técnica de GC-MS demonstrou eficácia na determinação dos agrotóxicos em estudo, avaliando-se a matriz cítrica com adição dos padrões nas faixas de concentração do LMR dos agrotóxicos em estudo, sendo confirmado na biblioteca NIST com mínimo de três íons fragmentos no espectro de massas.

4 Conclusões

O desenvolvimento de técnica analítica para determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos cítricos por QuEChERS modificado 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 metodologia QuEChERS foi estudada com maior profundidade, demonstrando ser eficiente no preparo de matriz cítrica como a laranja e suco de laranja, uma alternativa ambientalmente sustentável se comparada a métodos convencionais que utilizam grandes quantidades de solvente como a extração líquido-líquido. A comparação entre os métodos QuEChERS original

e QuEChERS acetato modificado para laranja, este último com otimização, proporcionou a melhoria na limpeza da amostra, com eficiente recuperação de padrão e diminuição do efeito matriz aplicados a um total de 26 amostras de laranjas e suco de laranja (5 amostras de suco de laranja nas etapas experimentais e 21 amostras cítricas com método consolidado). Durante o processo de desenvolvimento, detectou-se a presença do i.a. Dicofol com monografia excluída pela ANVISA, em três amostras de suco de laranja em concentrações acima do primeiro ponto da curva experimental, das quais uma amostra de suco era de certificação orgânica. Contudo, o conjunto de resultados obtidos demonstram a importância do controle e do desenvolvimento de análises cada vez mais sensíveis e eficazes para monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos, para assegurar a saúde da população, valorização do produto interno e de exportação.

5 Agradecimentos

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT) por fornecer a infraestrutura, materiais e equipamentos necessários para o desenvolvimento do trabalho, bem como proporcionar a capacitação técnica.

Ao Instituto Adolfo Lutz pela parceria e suporte técnico que tornaram possível este trabalho.

6 Referências

USDA, 2023. **Citrus: World Markets and Trade**. Disponível em: <https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/w66343603/tt44r006w/b56464320/citrus.pdf>
Acesso em: 13 fev./2023

DA SILVA-DE PAULA, M.C.M.; DE CARVALHO, D.U.; DA CRUZ, M.A.; LONGHI, T.V.; TAZIMA, Z.H.; BEHLAU, F.; DE CARVALHO, S.A.; LEITE, R.P., Jr. Agronomic Performance of Sweet Orange Genotypes under the Brazilian Humid Subtropical Climate. **Horticulturae** 2022, v. 8, p. 254. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2311-7524/8/3/254>. Acesso em 23 fev. 2023.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2022. **Consulta na base de dados, produção brasileira, laranja.** Disponível em: http://www.cnpqm.f.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/laranja/b1_laranja.pdf. Acesso em: 30 jan. 2023.

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: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/alimentos_regionais_brasileiros_2ed.pdf. Acesso em: 13 fev. 2023.

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

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: 18 de fev. 2023.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA, 2023 – **Relatório de comercialização de agrotóxicos.** Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos#Painel-comercializacao>. Acesso em: 30 jan.2023.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA, 2022. **Agrotóxicos.** Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxico>. Acesso em 30 jan. 2023.

FUNDAÇÃO DE DEFESA DA CITRICULTURA – FUNDECITRUS, 2022. **Levantamento de incidência de doenças dos citros.** Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/levantamentos>. Acesso em: 3 fev. 2023.

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

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Monografias de agrotóxicos.** Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/dadosabertos/informacoes-analiticas/monografias-de-agrotoxicos>. Acesso em 18 Fev. 2023.

CARNEIRO, F. F. *et al.* (org.) **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. Disponível em: https://www.abrasco.org.br/site/wp-content/uploads/2015/03/Dossie_Abrasco_01.pdf. Acesso: 18 fev. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA QUALIDADE E TECNOLOGIA – INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008- Revisão 07. 2018.

EUROPEAN COMMISSION - EU, Directorate General for Health and Food Safety. **Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed**. Sante 11312/2021. 2021.

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 30 jan..2023.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - **RDC Nº 4, DE 18 DE JANEIRO DE 2012a**. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/res0004_18_01_2012.html> Acesso em: 10 dez.2022.

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: 29/11/2022.

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.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos - **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: 10 jan. 2023.

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

ANVISA, 2021 - EDITAL DE CHAMAMENTO Nº 22, DE 7 DE DEZEMBRO DE 2021, **Processo de reavaliação de ingrediente ativo Clorpirifós**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/perguntasfrequentest/agrotoxicos/reavaliacao-de-agrotoxicos-2/EditalClorpirifos.pdf>>. Acesso em: 18 fev.23.

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 nov.2022.

BIORENDER **plataforma de desenhos científicos**. Disponível em: <https://app.biorender.com/illustrations/63f134d89bc75eec6d486b83>. Acesso em 18 fev.2023.

MANHANI, Kelly Cristina. **Análise multirresíduos de pesticidas em alimentos cítricos via técnicas cromatográficas: GC/ECD E GC/MS**. dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.

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.

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 Association of Official Analytical Chemists**, 2003, V.86. p 412

10.29327/2152495.8.23-4

