



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS INTEGRADAS DO PONTAL
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Rua Vinte, 1600. Bairro Tupã, CEP 38304-402, Ituiutaba / MG



LEONARDO CAETANO RIBEIRO

**EXTRAÇÃO QuEChERS DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAJÁ-
MANGA (*Spondias dulcis*), EMPREGANDO CROMATOGRAFIA GASOSA
COM DETECÇÃO POR IONIZAÇÃO EM CHAMA**

ITUIUTABA

2017

LEONARDO CAETANO RIBEIRO

EXTRAÇÃO QuEChERS DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAJÁ-MANGA (*Spondias dulcis*), EMPREGANDO CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECÇÃO POR IONIZAÇÃO EM CHAMA

Monografia de Conclusão de Curso apresentada à Comissão Avaliadora como parte das exigências do Curso de Graduação em Química: Bacharelado, da Faculdade de Ciências Integradas do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientador: Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria

ITUIUTABA

2017

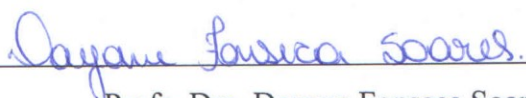
LEONARDO CAETANO RIBEIRO

EXTRAÇÃO QuEChERS DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAJÁ-MANGA (*Spondias dulcis*), EMPREGANDO CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECÇÃO POR IONIZAÇÃO EM CHAMA

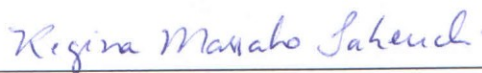
Monografia de Conclusão de Curso apresentada à Comissão Avaliadora como parte das exigências do Curso de Graduação em Química: Bacharelado, da Faculdade de Ciências Integradas do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia.

05 DE DEZEMBRO DE 2017

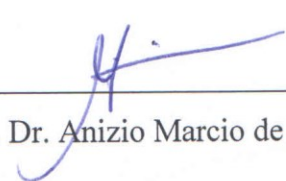
COMISSÃO AVALIADORA



Profa. Dra. Dayane Fonseca Soares



Profa. Dra. Regina Massako Takeuchi


Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria (Orientador)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que colaboraram para elaboração deste trabalho.

Agradeço em especial aos meus pais, Ademar e Maria Antonieta, pela compreensão em todos os momentos difíceis. Aos meus filhos, Yan e Melissa, pela alegria, amor e carinho. A minha amada esposa e companheira Maíra, que esteve sempre presente em todos os momentos desta caminhada, por todo amor, incentivo e paciência. E por fim, ao meu orientador Prof. Dr. Anízio Márcio de Faria, pelos ensinamentos, apoio, confiança, respeito em todos os momentos da realização deste trabalho, muito obrigado por ter me concedido esta oportunidade.

RESUMO

A contaminação de alimentos por resíduos de agrotóxicos é uma das grandes preocupações da sociedade atualmente com relação à segurança alimentar. Metodologias simplificadas que permitam determinar a presença e quantidade desses contaminantes nos alimentos são cada vez mais necessárias. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo desenvolver uma metodologia moderna de extração de resíduos de agrotóxicos em cajá-manga, fruto consumido com frequência e em grande quantidade no Cerrado brasileiro. O método proposto foi o QuEChERS para a extração dos resíduos de agrotóxicos da polpa de cajá-manga e a quantificação por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (CG-DIC). Inicialmente foi avaliada a variante do método QuEChERS que melhor resultasse na extração dos resíduos de carboxina, clorpirifós, difenoconazol e tiabendazol do cajá-manga. O melhor resultado foi obtido para o método original, que emprega o NaCl e o MgSO_4 para a extração. Em seguida, por se tratar de uma metodologia otimizada, o método QuEChERS-CG-DIC foi validado de acordo com o Guia de validação da comunidade Europeia, Guia Sante, por ser o mais adequado e mais rigoroso critério de aceitação de metodologias de determinação de resíduos de agrotóxicos. O método QuEChERS-CG-DIC se apresentou com boa linearidade ($r > 0,992$), boa precisão (em termos de repetibilidade e reprodutibilidade em laboratório, com desvio padrão relativo inferior a 20%) e boa exatidão, com recuperações majoritariamente na faixa de 80-120 %. O método se mostrou seletivo, sem efeito de matriz pronunciado nas determinações, porém apresentou níveis de detectabilidade piores que outros métodos destinados para a mesma finalidade, em que o limite de quantificação ficou na faixa de 0,36-0,72 mg kg^{-1} . Apesar da detectabilidade e limite de quantificação inferiores, estes valores ficaram abaixo dos limites máximos residuais para os agrotóxicos estudados, conferindo ao método QuEChERS-CG-DIC aplicabilidade adequada para a extração/quantificação de resíduos de agrotóxicos de polpa de cajá-manga.

PALAVRAS-CHAVE: Cromatografia gasosa, detecção por ionização em chama, frutos do Cerrado, agrotóxicos, cajá-manga, QuEChERS.

ABSTRACT

Contamination of food by pesticide residues is one of major society's concerns in nowadays regarding the food safety. Simplified methodologies to determine the presence and quantity of these contaminants in food are increasingly needed. In this context, the objective of this work was to develop a modern methodology for extraction of pesticide residues in caja-mango pulp, fruit frequently consumed and in large quantity in the Brazilian Cerrado. The proposed method was the QuEChERS for extraction of pesticide residues from the caja-mango pulp and quantification by gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID). Initially, the variant of QuEChERS method was evaluated that best resulted in the extraction of carboxin, chlorpyrifos, diphenconazole and thiabendazole residues from the caja-mango. The best result was obtained for the original method, which uses NaCl and MgSO₄ for extraction. Then, because it is an optimized methodology, the QuEChERS-GC-FID method was validated according to the European Community Validation Guide, Guia Sante, as it is the most appropriate and rigorous criterion for acceptance of methodologies for determining pesticide residues. The QuEChERS-GC-FID method presented good linearity ($r > 0.992$), good precision (in terms of repeatability and reproducibility in the laboratory, with relative standard deviation less than 20%) and good accuracy, with mostly recoveries in 80-120% range. The method was selective, with no pronounced matrix effect in the determinations, but showed worse detectability levels than other methods intended for the same purpose, where the limit of quantification was in the range of 0.36-0.72 mg kg⁻¹. Despite the lower detectability and limit of quantification, these values were below the residual maximum limits for the pesticides studied, giving the QuEChERS-GC-FID method suitable applicability for the extraction of pesticide residues from caja-mango pulp.

KEYWORDS: Gas Chromatography, flame ionization detector, QuEChERS, Cerrado fruits, pesticides, cajá-mango pulp.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Frutas típicas do cerrado brasileiro. (a) macaúba, (b) caju do cerrado, (c) murici, (d) cajá-manga, (e) marmelada de cachorro, (f) mangaba, (g) puçá, (h) chichá, (i) pitomba, (j) araticum, (l) lobeira, (m) cagaita, (n) pequi, (o) banha de galinha e (p) gabioba. _____ 12
- Figura 2.** Cromatograma da separação de uma solução padrão dos agrotóxicos estudados, empregando cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama. Condições cromatográficas: Coluna capilar 30 m × 0,32 mm d.i. × 0,25 µm, fase estacionária poli(5%-fenilmetilsiloxano-95%-dimetilsiloxano), injeção split 1:5, volume injetado de 1 µL, temperatura do injetor de 280 °C, detecção por ionização em chama a 300 °C, gás de arraste N₂ a 1,5 mL min⁻¹, programação de temperatura do forno: 100 °C (1 min), 25 °C min⁻¹, 200 °C, 40 °C min⁻¹, 300 °C (4,5 min). Identificação dos compostos: (1) clorpirifós, (2) tiabendazol, (3) carboxina, e (4) difenoconazol. _____ 30
- Figura 3.** Quantidade extraída de resíduos dos agrotóxicos (A) clorpirifós, (B) carboxina, (C) difenoconazol e (D) tiabendazol da polpa de cajá-manga, empregando os métodos QuEChERS original, acetato e citrato. _____ 31
- Figura 4.** (A) Imagem da polpa de cajá-manga. (B) Imagem ilustrativa de um extrato obtido pelo Método QuEChERS original na extração dos resíduos de agrotóxicos da polpa de cajá-manga. _____ 32
- Figura 5.** Curvas analíticas obtidas para os agrotóxicos (A) Carboxina, (B) Clorpirifós, (C) difenoconazol e (D) Tiabendazol. _____ 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos agrotóxicos de acordo com a toxicidade à saúde humana. _____	15
Tabela 2. Informações físicas e químicas dos agrotóxicos estudados. _____	16
Tabela 3. Parâmetros obtidos das curvas analíticas para os agrotóxicos em matriz de cajá-manga. _____	34
Tabela 4. Limites de detecção e de quantificação para cada agrotóxico estudado, empregando o método QuEChERS-CG-DIC. _____	35
Tabela 5. Repetibilidade do método QuEChERS-CG-DIC para a extração de resíduos de agrotóxicos da polpa de cajá-manga. _____	36
Tabela 6. Reprodutibilidade em laboratório para o método QuEChERS-CG-DIC na extração de resíduos de agrotóxicos de polpa de cajá-manga. _____	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coeficiente de Variação
DIC	Detector por Ionização em Chama
LMR	Limite máximo residual
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
LTP	Low-temperature partition
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos
PSA	Primary secondary amines
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
RSD	Relative Standard Deviation
SLE	Solid-liquid extraction
SPE	Solid phase extraction
USFDA	United States Food and Drug Administration

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 O Cerrado e suas espécies vegetais	11
1.2 O Cajá-manga	12
1.3 Agrotóxicos	14
1.4 Técnicas de extração	16
1.5 Técnicas de análise dos resíduos de agrotóxicos em alimentos	18
1.6 Validação de métodos	18
2 OBJETIVOS	22
3 METODOLOGIA	23
3.1 Materiais, equipamentos e reagentes	23
3.2 Preparo de soluções e fortificação da polpa de cajá-manga	23
3.2.1 <i>Processamento das amostras de polpa de cajá-manga</i>	23
3.2.2 <i>Preparo das soluções estoque dos resíduos de agrotóxicos</i>	23
3.2.3 <i>Preparo das soluções de trabalho dos resíduos de agrotóxicos</i>	24
3.2.4 <i>Fortificação da polpa de cajá-manga com solução padrão dos agrotóxicos</i>	24
3.3 Otimização da separação cromatográfica da mistura de agrotóxicos	24
3.4 Extração QuEChERS dos resíduos de agrotóxicos da polpa de cajá-manga	25
3.4.1 <i>Método QuEChERS original</i>	25
3.4.2 <i>Método QuEChERS acetato</i>	25
3.4.3 <i>Método QuEChERS citrato</i>	26
3.5 Avaliação dos parâmetros analíticos do método	26
3.5.1 <i>Construção da curva analítica por calibração na matriz</i>	26
3.5.2 <i>Linearidade</i>	27
3.5.3 <i>Limites de detecção e de quantificação</i>	27
3.5.4 <i>Precisão</i>	27
3.5.4.1 Repetibilidade	27
3.5.4.2 Reprodutibilidade em laboratório	28
3.5.5 <i>Exatidão (Ensaio de Recuperação)</i>	28
3.5.6 <i>Robustez</i>	28

3.6 Análise dos extratos por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (CG-FID)	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Otimização das condições de extração dos agrotóxicos da polpa de cajá-manga	31
4.2 Estudo de validação do método QuEChERS para extração de resíduos de agrotóxicos de polpa de cajá-manga	32
4.2.1 Seletividade	32
4.2.2 Curva Analítica, linearidade e faixa de trabalho	33
4.2.3 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)	34
4.2.4 Precisão do método	35
4.2.4.1 Repetibilidade	35
4.2.4.2 Reprodutibilidade dentro do laboratório	36
4.2.5 Exatidão (Ensaio de recuperação)	37
5 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Cerrado e suas espécies vegetais

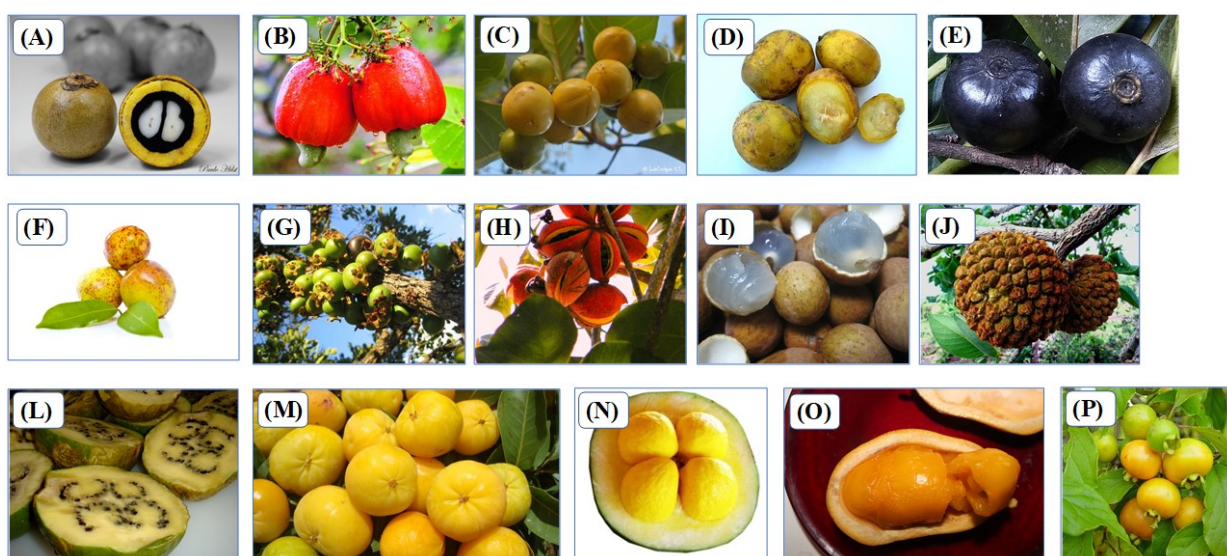
O Cerrado ocupa uma área de aproximadamente 25% de todo território brasileiro, cerca de 204 milhões de hectares, sendo esse o segundo maior bioma da América do Sul, menor apenas que a Amazônia em área. Aproximadamente 90% do Cerrado brasileiro estão situados nos estados do Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás e Bahia. Essas regiões possuem uma diversidade de fauna e flora, com grande variabilidade no clima e solo, possibilitando o desenvolvimento de algumas espécies de alto valor alimentício, medicinal, madeireiro, tintorial, forrageiro e ornamental [1,2]. A flora existente no Cerrado é riquíssima, possuindo mais de 1000 espécies arbóreas, cerca de 3000 espécies de ervas e quase 500 tipos diferentes de trepadeiras. Nas últimas décadas, com a ampliação de lavouras de grãos e a consequente necessidade de limpar e adubar a terra, tem se percebido que a vegetação nativa passa por uma contínua e acelerada devastação que tem contribuído para o desmatamento de aproximadamente 40% de todo o bioma [3,4].

Estando entre as mais belas e ricas savanas no mundo em diversidade de fauna e flora, o bioma cerrado é formado por um enorme patrimônio de recursos naturais renováveis, com destaque principal para suas variadas espécies de plantas frutíferas exóticas. Essas espécies frutíferas produzem frutos de sabores marcantes, com características sensoriais peculiares e intensas, que garantem aos frutos um potencial nutricional, medicinal e ornamental que tem estimulado o seu consumo tanto à nível nacional quanto internacional e levado, cada vez mais, à inovações de produtos com cor, aroma e sabor único. Estas plantas nativas podem ser consumidas como alimento de forma *in natura* ou processada [1]. Já são encontrados frutos do Cerrado na forma de licores, geleias, doces, sucos, sorvetes, pães e bolos, principalmente nas regiões centro-oeste do país, local de maior predominância do bioma. Os frutos do Cerrado possuem várias propriedades nutricionais e funcionais, como: elevados teores de açúcares, proteínas, sais minerais, ácidos graxos, vitaminas do complexo B e carotenóides, entre outras. Por esses frutos possuírem ricas propriedades nutricionais e potenciais propriedades medicinais, as indústrias farmacêutica e alimentícia têm sido estimuladas a desenvolver novos produtos a partir dos frutos do Cerrado, nos últimos anos [1,2].

Dentre as várias espécies que são de grande importância alimentícia de frutos do cerrado existentes, destacam-se: *Acrocomia aculeata* (macaúba), *Anacardium othonianum* (caju-do-cerrado), *Byrsonima verbascifolia* (murici), *Spondias dulcis* (cajá-manga), *Compomanesia*

cambessedearana (gabioba), *Hancornia speciosa* (mangaba), *Mouriri pusa* (puçá), *Psidium araca* (araçá), *Sterculia striata* (chichá), *Talisia esculenta* (pitomba), *Annoma crassiflora* (araticum), *Solanum lycocarpum* (lobeira), *Eugenia dysenterica* (cagaita), *Caryocar brasiliense* (Pequi), *Swartzia langsdorfii* (banha de galinha), *Alibertia sessilis* (marmelada-de-cachorro) [2,3,4]. A Figura 1 apresenta as imagens dos principais frutos do Cerrado já previamente identificados e registrados.

Figura 1. Frutas típicas do cerrado brasileiro. (a) macaúba, (b) caju do cerrado, (c) murici, (d) cajá-manga, (e) marmelada de cachorro, (f) mangaba, (g) puçá, (h) chichá, (i) pitomba, (j) araticum, (l) lobeira, (m) cagaita, (n) pequi, (o) banha de galinha e (p) gabioba.



Fonte: Pesquisa de imagens no www.google.com.br, assunto pesquisado: nome do fruto.

1.2 O Cajá-manga

O cajá-manga (*Spondias dulcis*) é uma das frutas mais comuns no Nordeste e Centro-Oeste brasileiro. A cajaraneira é uma árvore que possui muitas folhas e ramos, cujo seus frutos são de semente única, com espinhos irregulares e com grande quantidade de polpa, com formato ovóide, medindo aproximadamente de 6 a 10 cm de comprimento, 5 a 10 cm de largura, podendo pesar até 380 g. O fruto possui casca com cor amarelo ouro e no seu interior contém um endocarpo espinhoso, com espinhos longos e encurvados que penetram na polpa. Por possuir altos teores de glicídios e vitamina C, o cajá-manga vem sendo cultivado em variadas áreas de plantios no Cerrado brasileiro. É um fruto com grandes características voltadas para a industrialização, isso devido ao seu sabor e aroma típico, podendo ser consumido *in natura* como também de forma

processada. A polpa do fruto é suculenta, de sabor agridoce e aromática, sendo atualmente encontrada na forma de sucos, geleias, sorvetes, polpas congeladas e outros [5,6,7].

O gênero *Spondias* pertence à família *anacardiaceae* e nesta se encontra a cajarana, mais conhecida como cajá-manga, naturalmente originária da Polinésia. A cajarana se encontra distribuída nas áreas tropicais da América Latina onde tem sido cultivada e exportada para a comunidade Europeia [8].

Na América tropical assim como em todo território brasileiro, todo o processo de obtenção do cajá-manga ainda se dá principalmente através do extrativismo [9]. A árvore do cajá-manga cresce atingindo uma altura de aproximadamente 18 m. Ela tem uma madeira extremamente rígida e seu caule é verticalizado simetricamente, possui características ornamentais imponentes, com folhas decíduas, pinadas com 8-24 cm de comprimento, composta de 9-25 folíolos brilhantes. A porção terminal dos galhos é elíptica medindo aproximadamente 10-25 cm de comprimento, finamente denteadas em direção ao ápice. No verão, o clima seco e fresco faz com que as folhas amarelo-brilhante caiam das árvores que permanecem poucas semanas nuas. Os frutos se encontram na forma de cachos com uma dúzia ou mais [9,10]. No início da estação chuvosa plantam-se mudas obtidas por sementes. É cultivada com compasso de 8 por 8 metros, de preferência em solos profundos, sílico-argilosos, em climas quentes e úmidos ou semiáridos [10]. No Brasil, os frutos de cajá-manga, graças a seu aroma característico, é a matéria prima de produtos cuja demanda tem se tornado cada vez mais crescente. Explorada de forma extrativa ou em pomares domésticos, não faz parte das estatísticas oficiais, mas, mesmo assim, tem grande importância socioeconômica para as regiões Central, Norte e Nordeste do Brasil. Seus frutos são consumidos na forma *in natura* ou processados, obtendo grande número de produtos saborosos, de excelente qualidade e alto valor comercial, o que torna viável a exploração. Os frutos, por serem perecíveis e deteriorarem em poucos dias, têm comercialização *in natura* dificultada se for necessário o transporte para longas distâncias. Além disso, pode ser estimado que perdas de frutos pós-colheita variam de 15 a 50%, dependendo de como são conservados ou transportados [11].

Em plantas do gênero *Spondias*, a resinose, causada pelo fungo *Lasioidiplodia theobromae* é um problema sério. A resinose caracteriza-se pelo aparecimento de cancrios escuros, salientes, às vezes exibindo rachaduras, com abundante liberação de goma. Mesmo infectada, a planta sobrevive por longos períodos. Entretanto, quando a lesão circunda todo o diâmetro do caule, aprofundando-se no lenho, surgem os sintomas reflexos de amarelecimento, murcha e seca do ramo ou de toda a planta, em virtude do bloqueio dos tecidos condutores [12,13]. A cajaraneira (*Spondias cytherea* Sonn.) é a espécie mais suscetível à resinose dentro do gênero *Spondias*.

1.3 Agrotóxicos

Desde a década de 1950, época em que se iniciou a “revolução verde”, foram observadas algumas mudanças no processo tradicional relacionado ao trabalho na agricultura, bem como em seus impactos sobre o ambiente e a saúde humana. Novas tecnologias, muitas delas baseadas no uso extensivo de agentes químicos, foram disponibilizadas para o controle de doenças, aumento da produtividade e proteção contra insetos e outras pragas. De fato, essas novas facilidades não foram acompanhadas da implementação de programas de qualificação da força de trabalho, expondo as comunidades rurais a um conjunto de riscos até então desconhecidos, originado pelo uso extensivo de um grande número de substâncias químicas perigosas. Ao mesmo tempo, o aumento na produção agrícola e os índices de exportação de produtos agropecuários, cada vez mais significativo na balança comercial brasileira, incentivavam o crescente uso de substâncias químicas como principal forma de manejo da agricultura brasileira [14].

Dentre as principais substâncias químicas empregadas na agricultura brasileira, podemos destacar os agrotóxicos. Os agrotóxicos que são também denominados de defensivos químicos, pesticidas, praguicidas, remédios de plantas e/ou venenos, compõem um grupo de substâncias químicas que podem ser utilizadas no controle de pragas (animais e vegetais) e doenças de plantas, possuindo também aplicações em florestas nativas e plantadas, assim como nos ambientes hídricos, urbanos e industriais. Essas substâncias podem ser classificadas quanto à sua ação, como inseticidas (controle de insetos), fungicidas (controle de fungos), herbicidas (controle de plantas e ervas daninhas), desfolhantes (controle de folhas indesejadas), fumigantes (controle de bactérias do solo), rodenticidas ou raticidas (controle de roedores/ratos), nematicidas (controle de nematoides) e acaricidas (controle de ácaros). De acordo com as normas legislativas, é função do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento realizar a avaliação de eficácia agrônômica do uso de agrotóxicos; do Ministério da Saúde de executar a avaliação e classificação toxicológica, e; do Ministério do Meio Ambiente de avaliar e classificar o potencial de periculosidade ambiental [15].

A classificação do potencial de periculosidade ambiental, assim como a avaliação do potencial toxicológico de um agrotóxico são baseadas em estudos físico-químicos, toxicológicos e ecotoxicológicos. Dessa forma, um agrotóxico pode ser classificado de acordo com sua periculosidade ambiental, em classes que variam de I a IV: (classe I) são produtos altamente perigosos para o meio ambiente, (classe II) produtos muito perigosos ao meio ambiente, (classe III) produtos perigosos ao meio ambiente e (classe IV) produtos pouco perigosos ao meio ambiente. A classificação dos agrotóxicos em função dos seus efeitos à saúde, em decorrência da

exposição humana a esses agentes, pode resultar em diferentes classes toxicológicas. Essa classificação obedece a testes realizados em laboratório que tentam estabelecer a dosagem letal (DL) do agrotóxico em 50 % dos animais utilizados naquela concentração [15]. A Tabela 1 apresenta a classificação toxicológica à saúde humana dos agrotóxicos.

Tabela 1. Classificação dos agrotóxicos de acordo com a toxicidade à saúde humana.

Classe toxicológica	Toxicidade	DL₅₀ (mg kg⁻¹)	Faixa colorida
I	Extremamente tóxico	≤ 5	Vermelha
II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50	Amarela
III	Medianamente tóxico	Entre 50 e 500	Azul
IV	Pouco tóxico	Entre 500 e 5000	Verde
-	Muito pouco tóxico	> 5000	-

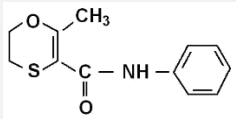
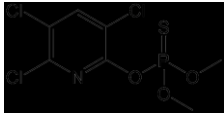
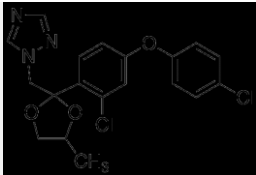
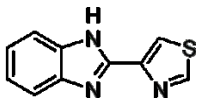
Fonte: Próprio autor.

Dentre todo arsenal tecnológico oferecido, os agrotóxicos sem dúvida destacam-se como a alternativa mais acessível para o aumento da produção agrícola, ou mesmo para a garantia da produtividade. O Brasil está classificado como o maior consumidor de agrotóxicos no mundo. Estima-se que dois terços da população de todo país estão expostos a algum tipo de agrotóxico, em diferentes níveis, aos efeitos nocivos desses agentes químicos, seja em função do consumo de alimentos contaminados, seja do uso de agrotóxicos para o combate de vetores de doenças infectocontagiosas ou pela atividade laboral [32].

É importante ressaltar que as frutas nativas do Cerrado, que não são cultivadas, normalmente não empregam qualquer tipo de manejo da produção dos frutos. No entanto, com o crescente interesse comercial por essas frutas, a necessidade de produção em maior escala exigirá um aumento da produção dos frutos, sem a perda pela proliferação de doenças e pragas. Assim, a forma de combate às pragas e doenças que atacam as cajaraneiras provavelmente será por meio do uso de agrotóxicos, tendo em vista a rapidez e eficiência dos resultados e, também, o histórico do manejo agrícola no Brasil.

A Tabela 2 apresenta as informações básicas sobre os agrotóxicos escolhidos para estudo neste trabalho.

Tabela 2. Informações físicas e químicas dos agrotóxicos estudados.

Agrotóxico	Fórmula estrutural	Grupo químico	Classe	Massa molar (g mol ⁻¹)	Classificação toxicológica
Carboxina (<i>carboxin</i>)		Carboxamida	Fungicida	235,30	Classe III
Clorpirifós (<i>chlorpyrifos</i>)		Organofosforado	Acaricida Formicida Inseticida	350,58	Classe II
Difenoconazol (<i>difenoconazole</i>)		Triazol	Fungicida	406,26	Classe I
Tiabendazol (<i>thiabendazole</i>)		Benzimidazol	Fungicida	201,25	Classe IV

Fonte: próprio autor.

1.4 Técnicas de extração

A utilização frequente e em larga escala de agrotóxicos na agricultura garante de forma rápida e eficiente o controle de pragas, bem como o aumento na produtividade agrícola. No entanto, resíduos desses compostos geralmente permanecem nos alimentos, nos solos, na água, etc., o que se torna um enorme problema ambiental e, principalmente, de saúde do ser humano. Assim, é necessário seu monitoramento nas diversas matrizes alimentícias e ambientais, para avaliar os riscos de contaminação do ambiente e de intoxicação do ser humano [16]. A análise de resíduos de agrotóxicos consiste em cinco etapas básicas: extração do(s) analito(s) da matriz, remoção dos co-extrativos (limpeza), separação, identificação e quantificação do(s) composto(s) [16].

A extração do resíduo de agrotóxico de uma matriz alimentícia se dá por diferentes técnicas e metodologias. Métodos de preparo de amostras sólidas, como os alimentos, tradicionalmente existentes, tais como a extração com solventes (SLE - *solid-liquid extraction*), utilizam grandes volumes de solventes orgânicos, apresentam custo altamente elevado e é de difícil automação. Assim, novas técnicas que consomem menos tempo, requerem uma menor quantidade de solventes e são eficientes na extração dos resíduos de alimentos, vêm sendo

desenvolvidas e aplicadas para extração de agrotóxicos. Dentre essas técnicas, destaca-se a (SLE-LTP – *solid-liquid extraction with low-temperature partition*) [17] e, mais recentemente, o método denominado QuEChERS (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged and **S**afe) [18-19].

As normas estabelecidas para procedimentos analíticos com alta eficiência e que gerem o mínimo de resíduos para descarte vinha sendo até então um desafio constante para análise de contaminantes em amostras de matrizes sólidas ou semi-sólidas. De forma a atender esta demanda, foi proposta uma metodologia para extração denominado de QuEChERS [18], que se caracteriza pela extração rápida, fácil, econômica, efetiva, robusta e segura, sendo assim destinada para a extração de agrotóxicos em matrizes alimentícias, como frutas e vegetais. Este método tem sido adaptado para aplicação em matrizes mais complexas, contendo alto teor de lipídios e proteínas, como ovo, abacate, chocolate, café e cereais, alimento para bebês, sementes de linhaça e amendoim, azeitonas e azeite de oliva, tecido animal e leite [20,21].

Para o processo de extração, o método QuEChERS baseia-se na utilização da acetonitrila como solvente extrator, seguida de uma etapa de partição obtida pela adição de sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio. A limpeza do extrato é uma etapa embutida na metodologia que emprega o processo de extração em fase sólida dispersiva, com adição de sais como o próprio sulfato de magnésio anidro e o PSA (*primary secondary amines*). O sorvente PSA auxilia no processo de troca aniônica, com a habilidade em remover ácidos graxos, açúcares, alguns pigmentos e outros coextrativos da matriz que formam ligações de hidrogênio. Para realizar a análise de resíduos de contaminantes na presença de matrizes contendo substâncias apolares, normalmente utiliza-se o sorvente C₁₈ na remoção desses interferentes. A utilização do C₁₈ na etapa de limpeza do método QuEChERS tem sido demonstrada com sucesso na preparação de amostras contendo teores de gordura maiores que 2 % como, por exemplo, arroz, peixe, trigo, leite, entre outras [22]. Os excelentes resultados obtidos com o método QuEChERS despertou grande interesse por parte de Lehotay em aplicá-lo para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos com alto teor de lipídeos, até 20 % de gordura (leite, ovos e abacate) [22].

Neste trabalho utilizou-se para a extração de agrotóxicos em alimentos, a técnica QuEChERS, baseada na minimização do uso de solventes orgânicos para a extração de resíduos de agrotóxicos em polpa de cajá-manga. Os agrotóxicos escolhidos para tal estudo foram: carboxina, clorpirifós, difenoconazol e tiabendazol.

1.5 Técnicas de análise dos resíduos de agrotóxicos em alimentos

A análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos requer técnicas analíticas com capacidade de determinar simultaneamente uma vasta gama de substâncias, haja vista o grande número de compostos autorizados pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para aplicação nas mais diversas culturas agrícolas [23]. Além disso, as técnicas de extração dos resíduos não são seletivas o suficiente para que haja a remoção apenas dos analitos de amostras complexas como os alimentos, quase sempre são coextraídos componentes da matriz, o que leva a necessidade de uma técnica analítica capaz de discriminar os sinais dos analitos e dos coextrativos. Dessa forma, as técnicas de separação, em especial as cromatográficas, se destacam como as principais técnicas instrumentais empregadas na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em diversas matrizes. Tanto a cromatografia gasosa (CG) quanto a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) vem sendo empregadas na quantificação de contaminantes orgânicos em amostras de alimentos [33]. Neste trabalho optou-se pelo uso da CG por esta técnica se apresentar como uma técnica ambientalmente limpa, sem geração de resíduos orgânicos tóxicos após as análises. Além disso, foi empregado um detector de ionização em chama (DIC) por fornecer uma configuração instrumental de baixo custo da análise e por ser capaz de analisar os resíduos dos agrotóxicos alvos deste estudo, apesar da perda de sensibilidade para algumas das substâncias estudadas.

1.6 Validação de métodos

Atualmente, o cenário mundial da produção de alimentos, revela um grande interesse da sociedade quanto à inocuidade do produto final a ser consumido. Este quadro tem forçado os países a estabelecerem normas legislativas rígidas que garantam o consumo de alimentos seguros por parte da população [24]. Para determinação de resíduos de contaminantes em alimentos, métodos analíticos têm sido desenvolvidos como ferramentas principais para garantir que os produtos estejam enquadrados nas determinações legais com relação ao limite máximo residual.

Com o objetivo de assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos, alguns procedimentos de validação do processo analítico empregado são delineados, como garantia da qualidade das medições químicas, através da sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade [24]. Para validação de métodos analíticos, o procedimento deve incluir todas as etapas necessárias para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis. Uma questão de suma importância no delineamento das etapas a comporem o procedimento de

validação de um método analítico está justamente no estabelecimento dessas etapas. Protocolos de validação estabelecidos por agências de regulação como a ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária) [25] no Brasil, da USFDA (United States Food and Drug Administration) [26] e o Guia SANTE [27] na Comunidade Europeia, além de estabelecer as etapas (Figuras de Mérito) a serem avaliadas no método proposto definem também os critérios de aceitação desses métodos. Em especial, o Guia SANTE regulamentado pela Comunidade Europeia é um documento específico para validação de métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos, se diferenciando dos demais que foram estabelecidos para validação de métodos de determinação de fármacos e medicamentos.

Um guia de validação deve apresentar um conjunto de procedimentos que podem ser seguidos para avaliação da qualidade do método analítico. Em um método, sua qualidade pode ser determinada de forma a avaliar suas figuras de mérito. As figuras de mérito que podem ser analisadas e avaliadas em um guia de validação são: seletividade, linearidade, precisão (precisão intermediária, repetibilidade e reprodutibilidade), exatidão, faixa de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação e robustez [24,28].

Seletividade: A seletividade compreende a capacidade de avaliar o sinal de um determinado analito na presença de sinais associados a componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade garante que o sinal ou pico cromatográfico seja exclusivamente do analito. Caso a seletividade não seja assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas [24,28].

Precisão: A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos em uma mesma amostra sob condições previamente estabelecidas. A avaliação da precisão pode ocorrer pela estimativa do desvio padrão absoluto(s) para um certo número de determinações (Equação 1). A precisão pode ser expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) (Equação 2), também conhecido como coeficiente de variação (CV) [24,28].

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Eq. 1}$$

Em que: x_i = uma medida individual, $\bar{x}$ = média aritmética das medidas, n = número de medidas.

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

A precisão pode ser considerada como: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

Repetibilidade: A repetibilidade pode ser representada como a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo. A repetibilidade pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) [24,28].

Precisão Intermediária ou Reprodutibilidade dentro do laboratório: A precisão intermediária, também conhecida como reprodutibilidade dentro do laboratório, indica o efeito entre as variações em um ou mais parâmetro experimental do método dentro do laboratório em diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores [24,28].

Reprodutibilidade: A reprodutibilidade avalia o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos, etc.). A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos na lista de métodos oficiais [24,28].

Exatidão: A exatidão ou acurácia representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos e ensaios de recuperação [24,28].

Ensaio de Recuperação: A recuperação é definida como a proporção da quantidade de analito adicionada na matriz da amostra que é extraída e quantificada de acordo com a equação 3.

Linearidade: A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais e lineares à concentração do analito, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a concentração do analito raramente é conhecida. Uma relação matemática entre o sinal e a concentração do analito pode ser determinada a partir dos sinais medidos para concentrações conhecidas do analito. Essa relação matemática é normalmente expressa como a equação de reta dada pela curva analítica. O grau de linearidade da resposta fornecida pelo método pode ser medido pelo coeficiente de regressão linear (r) [24,28].

Faixa de aplicação ou faixa dinâmica linear: A faixa dinâmica linear corresponde ao intervalo de concentrações entre o valor de maior concentração e de menor concentração do analito, que atenda aos requisitos de precisão e exatidão. A concentração mais baixa do analito na faixa dinâmica linear, para a análise de resíduos, é o limite de quantificação do método proposto [24,28].

Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ): O LOD é representado como a menor concentração do analito que pode ser detectada, utilizando um determinado procedimento experimental, enquanto que o LOQ representa a menor concentração do analito que pode ser medida e quantificada, com precisão e exatidão, utilizando um determinado procedimento experimental. O LOD e o LOQ podem ser calculados de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica [24,28]. Neste trabalho, foi empregado o método baseado na curva analítica. Por este método, o limite de detecção pode ser obtido através da Equação 3:

$$LOD = 3,3 \times \frac{sb}{S} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde: sb é a estimativa do desvio padrão da resposta do branco ou a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação da reta, e; S é o coeficiente angular da curva analítica. O LOQ pode ser obtido pela Equação 4:

$$LOQ = 10 \times \frac{sb}{S} \quad \text{Eq. 4}$$

Robustez: A robustez mede a capacidade de um método suportar pequenas variações, sem afetar a sua exatidão e precisão. Quando a resposta é praticamente constante, diz-se que o método é robusto mesmo quando sujeito a pequenas modificações das condições experimentais. Essas pequenas modificações das condições experimentais podem ser: mudança de operador durante a análise; troca de marca ou lotes de reagentes durante o processo analítico; pequena variação nas concentrações dos reagentes ($0,01000 \text{ mol L}^{-1}$ para $0,00995 \text{ mol L}^{-1}$); pequena variação no pH da solução; (pH 7,30 para pH 7,32, por exemplo); tempo total de execução da metodologia; variação da temperatura do ambiente em que se desenvolve a metodologia, etc. Como estas variações ocorrem continuamente ao longo do processo de validação, a variação das respostas, RSD, dentro dos limites máximos sugeridos para a precisão, indica a robustez do método, mesmo sem a aplicação de um teste específico para a determinação do parâmetro [24,28].

Neste trabalho utilizou-se para a validação da metodologia, o protocolo recomendado pela Comissão Europeia para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos, denominado de Guia SANTE [27].

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia baseada no método QuEChERS para determinação do teor de resíduos dos agrotóxicos: carboxina, clorpirifós, tiabendazol e difenoconal em polpa de cajá-manga, empregando análise por cromatografia gasosa e detecção por ionização em chama (CG-DIC).

Como objetivos secundários, foi definido o método QuEChERS mais adequado para a extração dos resíduos dos agrotóxicos da polpa do cajá-manga e determinação dos parâmetros analíticos do método como: precisão (repetibilidade e reprodutibilidade em laboratório), exatidão (ensaios de recuperação), linearidade, limites de detecção e de quantificação, faixa de trabalho e robustez.

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais, equipamentos e reagentes

As soluções de trabalho foram preparadas com acetonitrila grau cromatográfico 99,9% e metanol grau cromatográfico 99,9% (J.T. BAKER, São Paulo, Brasil), Multiprocessador (MALLORY, Oggi Black).

Para o preparo das soluções foram utilizados: balança eletrônica com precisão 0,0001 g (Acculab, Bradford, MA, EUA); balão volumétrico de 10 mL; barcas de polipropileno; micropipetas; frasco Eppendorff de 2 mL; pipeta de 5 mL; pipeta de Pasteur; tubo Falcon para centrifuga com tampa rosqueável de 15 mL; agitador vórtex ARSEC modelo TS200 (São Paulo, Brasil). Os reagentes utilizados foram sulfato de Magnésio anidro, 98% (Vetec); PSA supelclean SPE bulking pack, partículas de 50 µm e 8,4% de carbono (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil); Cloreto de Sódio (Proquímios, Rio de Janeiro, Brasil); Acetato de Sódio P.A (Proquímios, Rio de Janeiro, Brasil); Ácido Acético P.A (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil); Citrato de Sódio P.A (Synth).

3.2 Preparo de soluções e fortificação da polpa de cajá-manga

3.2.1 Processamento das amostras de polpa de cajá-manga

Para realização do trabalho, os frutos de cajá-manga foram adquiridos no comércio local da cidade de Ituiutaba-MG. Em seguida, os frutos foram lavados, descascados e cortados em pedaços pequenos. A polpa do cajá-manga foi triturada em um multiprocessador doméstico (MALLORY, modelo Oggi Black) até a total homogeneização. Posteriormente, em frascos de vidros, adicionou-se certa quantidade da polpa e armazenou-os em um *freezer* a -4 °C até o momento de sua utilização.

3.2.2 Preparo das soluções estoque dos resíduos de agrotóxicos

Inicialmente selecionaram-se os padrões dos agrotóxicos a serem utilizados na pesquisa para determinação de resíduos de agrotóxicos em cajá-manga, empregando-se o método QuEChERS-GC-FID. Os padrões dos agrotóxicos selecionados foram: carboxina (99,9 %,

Pestanal), clorpirifós (99,9 %, Pestanal), difenoconazol (99,9 %, Pestanal) e tiabendazol (99,9 %, Pestanal). Com auxílio de uma balança analítica com precisão de 0,0001 g pesou-se separadamente em uma barca de polipropileno 0,0100 g de cada padrão de agrotóxico. Após as pesagens separaram-se quatro balões volumétricos de 10 mL e em cada balão adicionaram-se a massa pesada de cada padrão de agrotóxico. As barcas contendo cada padrão de agrotóxico foram lavadas com metanol e transferidos para cada balão volumétrico. Em seguida, completaram-se os volumes de cada balão com metanol. O volume de cada balão foi transferido para frascos de 10 mL, identificados como soluções estoque de concentração final de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, que foram armazenados em refrigerador a -4°C até o momento do uso.

3.2.3 Preparo das soluções de trabalho dos resíduos de agrotóxicos

A partir das soluções estoques, prepararam-se soluções individuais dos agrotóxicos numa concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para isso, com auxílio de uma micropipeta retirou-se de cada frasco de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ um volume referente a $500 \mu\text{L}$ que, em seguida, foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL. O volume de cada balão foi completado com metanol e transferido para frascos de 10 mL, sendo injetados no cromatógrafo a gás para definição dos tempos de retenção de cada composto e consequentemente para otimização da metodologia de análise. Foi retirado de cada frasco $1 \mu\text{L}$ da solução e injetado no cromatógrafo, obtendo assim um pico relativo aquele composto no cromatograma.

3.2.4 Fortificação da polpa de cajá-manga com solução padrão dos agrotóxicos

Mediu-se a massa referente a 2,000 g da polpa do cajá-manga em tubos de centrífuga (Falcon) de 15 mL. A essa polpa adicionou-se $100 \mu\text{L}$ de uma solução padrão da mistura dos agrotóxicos na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.3 Otimização da separação cromatográfica da mistura de agrotóxicos

A partir das soluções de trabalho de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e após ter definido os tempos de retenção de cada composto individualmente, preparou-se uma mistura de todos os resíduos de agrotóxicos numa concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. A partir dessa solução, foi injetado no cromatógrafo $1 \mu\text{L}$ obtendo um cromatograma com a presença de todos os compostos. A separação completa dos agrotóxicos foi otimizada ajustando alguns parâmetros cromatográficos como: temperatura do

forno, o modo de operação do forno, temperatura do injetor, tipo de injetor, vazão do gás de arraste e temperatura do detector.

3.4 Extração QuEChERS dos resíduos de agrotóxicos da polpa de cajá-manga

Três métodos QuEChERS [18,19] propostos para extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos foram avaliados neste trabalho para determinar qual o mais adequado para a extração dos compostos estudados na polpa de cajá manga.

3.4.1 Método QuEChERS original

Em tubos de centrifuga (Falcon) adicionou-se 2,000 g de polpa de cajá-manga. Em seguida, fortificou-se essa polpa com a mistura dos agrotóxicos a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e adicionou-se 4 mL de acetonitrila ao tubo, agitando-o por 1 min em agitador vórtex. Após agitação, retirou-se o tubo do agitador vórtex e adicionaram-se 0,8 g de MgSO_4 e 0,2 g de NaCl, agitou-se por mais 1 min em agitador vórtex, centrifugando em seguida por 5 min a 2500 rpm. Com auxílio de uma pipeta retirou-se aproximadamente 500 μL da fase orgânica e transferiu-se esse volume para um frasco Eppendorff de 2 mL. Posteriormente, adicionaram-se ao frasco Eppendorff 10 mg de PSA e 30 mg de MgSO_4 . Agitou-se o frasco no agitador vórtex por 30 segundos. Retirou-se uma alíquota de 1,0 μL da solução e injetou-se no cromatógrafo a gás.

3.4.2 Método QuEChERS acetato

Em um balão volumétrico de 50 mL adicionaram-se 30 mL de acetonitrila e cerca de 500 μL de ácido acético glacial. Agitou-se manualmente o balão volumétrico por cerca de 30 segundos. Completou-se o volume do balão com acetonitrila e agitou-se novamente por 30 segundos para homogeneização completa da solução, produzindo uma solução de acetonitrila acidificada com CH_3COOH a 1 % v/v. Armazenou-se a solução a -4°C até o momento do uso. Em tubos de centrifuga (Falcon) foram adicionados 2,000 g de polpa de cajá-manga. Em seguida, fortificou-se essa polpa com a mistura dos agrotóxicos a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e adicionou-se 4 mL da solução de acetonitrila acidificada com solução de CH_3COOH a 1 % (v/v) foram adicionados ao tubo, agitando-o por 1 min em agitador vórtex. Após agitação, retirou-se o tubo do agitador e adicionaram-se 0,8 g de MgSO_4 e 0,2 g de CH_3COONa . Agitou-se a mistura por mais 1 min em agitador vórtex e, em seguida, centrifugou-a por 5 min a 2500 rpm. Com auxílio de uma

micropipeta retirou-se 500 μL da fase orgânica e transferiu-a para um frasco Eppendorff de 2 mL. Adicionaram-se ao frasco Eppendorff 10 mg de PSA e 30 mg de MgSO_4 . Agitou-se o frasco no agitador vórtex por 30 segundos. Retirou-se uma alíquota de 1,0 μL da solução e injetou-a no cromatógrafo a gás.

3.4.3 Método *QuEChERS* citrato

Em tubos de centrifuga (Falcon) adicionou-se 2,000 g de polpa de cajá-manga. Em seguida, fortificou-se essa polpa com a mistura dos agrotóxicos a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e adicionou-se 4 mL de acetonitrila ao tubo, agitando-o por 1 min em agitador vórtex. Após agitação, retirou-se o tubo do agitador vórtex e adicionaram-se 0,8 g de MgSO_4 , 0,2 g de NaCl e uma mistura de 0,2 g de $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ com 0,1 g de $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$. Agitou-se por mais 1 min em agitador vórtex, centrifugando-se em seguida por 5 min a 2500 rpm. Retirou-se 500 μL da fase orgânica, transferindo-os para um frasco Eppendorff de 2 mL. Adicionaram-se ao frasco Eppendorff 10 mg de PSA e 30 mg de MgSO_4 . Agitou-se o frasco no agitador vórtex por 30 segundos. Retirou-se uma alíquota de 1,0 μL da solução e injetou-se no cromatógrafo a gás.

3.5 Avaliação dos parâmetros analíticos do método

3.5.1 Construção da curva analítica por calibração na matriz

Para construção da curva analítica, mediram-se porções de 0,500 g de polpa de cajá-manga em tubos de centrifuga (Falcon) de 15 mL. Em seguida, fortificou-se essa polpa com a mistura dos agrotóxicos com concentrações específicas e adicionaram-se 4 mL de acetonitrila em cada tubo e agitou-se por 1 minuto em agitador vórtex. Após agitação, adicionaram-se 0,4 g de MgSO_4 e 0,1 g de NaCl. Agitaram-se os tubos por 1 minuto em agitador vórtex e, logo em seguida, centrifugou-se por 5 min a 2500 rpm. Após centrifugação, transferiu-se 500 μL da fase acetonitrila para frascos Eppendorff de 2 mL. Adicionaram-se a esses frascos, 10 mg de PSA e 30 mg de sulfato de magnésio. Em seguida, adicionaram-se em cada tubo os volumes de 10, 25, 55, 90, 125 e 165 μL da mistura de agrotóxicos a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Agitaram-se os frascos em agitador vórtex por 30 segundos. As concentrações dos agrotóxicos para a construção da curva analítica foram 3,90; 9,50; 19,80; 30,50; 40,00 e 49,60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada um dos agrotóxicos estudados.

3.5.2 Linearidade

A linearidade do método foi estudada a partir da injeção de soluções dos padrões dos agrotóxicos preparados no extrato da matriz da polpa de cajá-manga, em diferentes concentrações no CG-DIC, empregando o método QuEChERS original. A partir das áreas de picos obtidas para cada um dos agrotóxicos estudados nos diferentes níveis de concentração, foram construídas curvas de calibração que, após a regressão linear, o coeficiente de correlação (r) foi determinado para todos os compostos. A linearidade foi considerada aceitável quando o r obtido foi maior que 0,990.

3.5.3 Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) e de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) são, respectivamente, o menor nível de concentração dos compostos que seja distinguível do ruído e o menor nível de concentração dos resíduos de agrotóxicos encontrados na polpa do cajá-manga que atende aos critérios de desempenho do método quanto à exatidão e precisão. Isto é, o LOD é a menor concentração dos resíduos detectável pelo método na polpa de cajá-manga, enquanto que o LOQ é a menor concentração determinada pelo método com exatidão na faixa de 60-140 % e com desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) inferior a 20 %. Para a determinação do LOD do método e do LOQ do método foram consideradas as Equações 1 e 2, que levam em consideração parâmetros das curvas analíticas.

3.5.4 Precisão

3.5.4.1 Repetibilidade

Mediu-se a massa de 0,500 g de polpa de cajá-manga fortificada em três níveis de concentração (3, 4,5 e 6 x LOQ) em tubos de centrífuga (Falcon) de 15 mL. Em seguida, adicionaram-se em cada tubo, 4 mL de acetonitrila e agitaram-se os tubos por 1 minuto em agitador vórtex. Após agitação, adicionaram-se 0,8 g de MgSO_4 e 0,2 g de NaCl e agitou-se por mais 1 minuto. Centrifugaram-se os tubos por 5 minutos a 2500 rpm. Com auxílio de uma micropipeta retirou-se da fase orgânica 500 μL de extrato e transferiu-se esse volume para tubos Eppendorff de 2,0 mL. Adicionaram-se aos tubos 10 mg de PSA e 30 mg de MgSO_4 . Agitaram-

se os tubos em agitador vórtex por 30 segundos. Com auxílio de uma seringa para cromatografia, retirou-se uma alíquota de 1,0 µL do sobrenadante e injetou-se no cromatógrafo. Para o estudo de repetibilidade todas as amostras foram preparadas no mesmo dia. O estudo foi realizado em triplicata.

3.5.4.2 Reprodutibilidade em laboratório

O estudo de reprodutibilidade em laboratório foi realizado de forma similar ao procedimento experimental adotado para o estudo da repetibilidade. No entanto, os experimentos foram realizados em três dias diferentes, mantendo todas as demais condições idênticas. Apenas uma concentração dos agrotóxicos foi estudada, a referente a 6 x LOQ. O estudo foi realizado em triplicata.

3.5.5 Exatidão (Ensaio de Recuperação)

A exatidão do método QuEChERS para a extração dos resíduos de agrotóxicos da polpa de cajá-manga foi avaliada de acordo com o Guia SANTE [27], a partir de ensaios de recuperação. Para isso, três diferentes níveis de fortificação de agrotóxicos na polpa de cajá-manga foram analisados de acordo com o procedimento de extração do método QuEChERS: 3; 4,5 e 6 x LOQ. Os extratos obtidos foram analisados no CG-DIC e a porcentagem de recuperação calculada de acordo com a Equação 5.

$$\%REC = \frac{[agrotóxico]_{determinada}}{[agrotóxico]_{adicionada}} \times 100 \quad \text{Eq. 5}$$

3.5.6 Robustez

A robustez é a capacidade do método em responder de forma precisa e exata após variações sutis nas condições experimentais. A robustez foi avaliada a partir da recuperação média e do RSD de todas as medidas realizadas ao longo do estudo de validação da metodologia analítica para a determinação dos resíduos de agrotóxicos na polpa de cajá-manga. O método é aceito como robusto quando a recuperação média está na faixa de 60 a 140 % e o RSD inferior a 20 % [27]. Estes resultados foram obtidos a partir da análise de todas as extrações realizadas ao longo do estudo.

3.6 Análise dos extratos por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (CG-FID)

As análises dos extratos orgânicos e soluções dos padrões foram realizadas em um cromatógrafo a gás da marca Thermo, modelo Focus GC, equipado com sistema de injeção manual Split/Splitless Reodhyne e detector por ionização em chama. A identificação dos compostos nos cromatogramas foi feita pela comparação dos tempos de retenção dos picos dos analitos nos extratos das amostras com o tempo de retenção dos picos individuais dos agrotóxicos, após análises das soluções padrão de carboxina, clorpirifós, difenoconazol e tiabendazol. A coluna e fase estacionária usada e as condições empregadas para as análises dos quatro agrotóxicos são descritas a seguir:

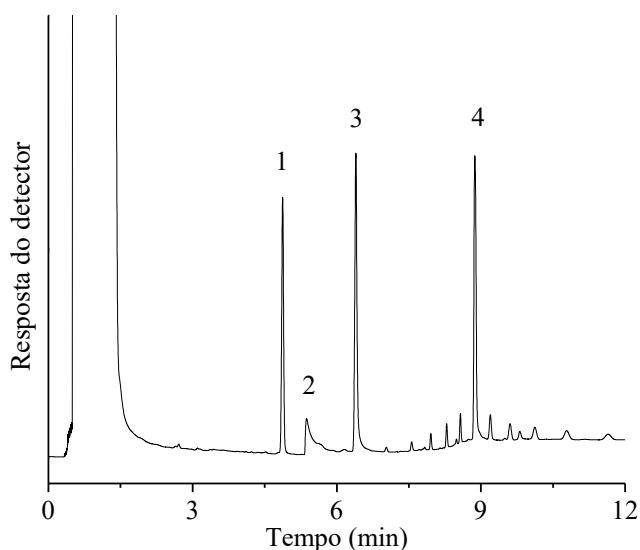
- Coluna capilar NST-05 com fase estacionária 5 % de polifenilsiloxano e 95% de polidimetilsiloxano, 30 m de comprimento, 0,25 mm diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme;
- Programação de temperatura do forno: 100 °C (1 min) com aquecimento de 25 °C min^{-1} até 200 °C, aquecimento de 40 °C min^{-1} até 300 °C (4,50 min);
- Tempo total de análise: 12 min;
- Temperatura do injetor: 280 °C;
- Volume injetado: 1,0 μL ;
- Injeção Split, com divisão de fluxo de 1:5;
- Detecção por ionização em chama (DIC);
- Temperatura do detector: 300 °C;
- Gás de arraste: Nitrogênio;
- Vazão do gás de arraste: 1,5 mL min^{-1} .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre vários métodos de análise, a cromatografia é um método de grande importância que permite separar os componentes de misturas complexas. Na cromatografia gasosa, a identificação dos compostos de interesse geralmente é realizada comparando-se o tempo de retenção (t_r) do composto na amostra com o tempo de retenção do composto puro (solução padrão). Neste trabalho foi utilizada a cromatografia gasosa por ser uma técnica que não resulta na geração de resíduos de solventes orgânicos como a cromatografia líquida e por permitir a separação e quantificação adequada dos agrotóxicos em estudo. As condições do método de análise foram otimizadas para a obtenção dos picos dos agrotóxicos separados no cromatograma a fim de possibilitar, com precisão e exatidão, a quantificação dos mesmos nos extratos de cajá-manga.

A Figura 2 apresenta o cromatograma obtido da separação dos agrotóxicos estudados, empregando o método de análise desenvolvido.

Figura 2. Cromatograma da separação de uma solução padrão dos agrotóxicos estudados, empregando cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama. Condições cromatográficas: Coluna capilar 30 m $\times$ 0,32 mm d.i. $\times$ 0,25 μ m, fase estacionária poli(5%-fenilmetilsiloxano-95%-dimetilsiloxano), injeção split 1:5, volume injetado de 1 μ L, temperatura do injetor de 280 $^{\circ}$ C, detecção por ionização em chama a 300 $^{\circ}$ C, gás de arraste N_2 a 1,5 mL min^{-1} , programação de temperatura do forno: 100 $^{\circ}$ C (1 min), 25 $^{\circ}$ C min^{-1} , 200 $^{\circ}$ C, 40 $^{\circ}$ C min^{-1} , 300 $^{\circ}$ C (4,5 min). Identificação dos compostos: (1) clorpirifós, (2) tiabendazol, (3) carboxina, e (4) difenoconazol.

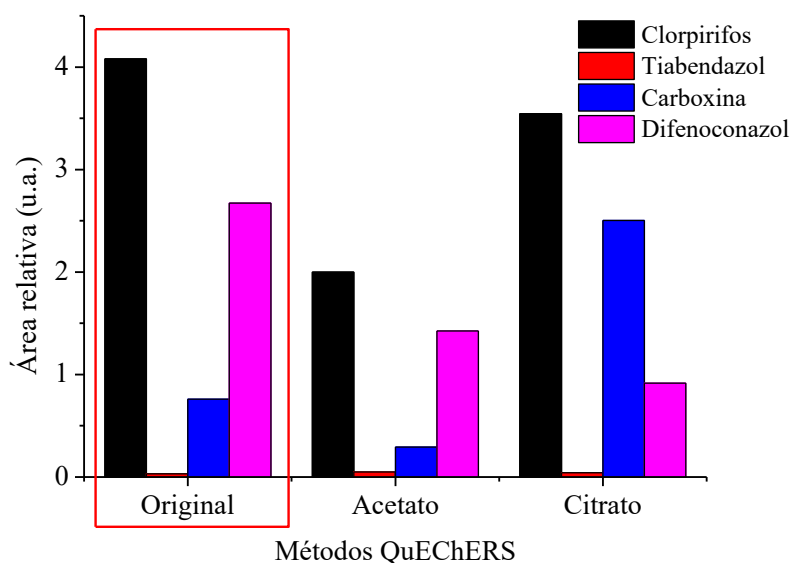


Fonte: Próprio autor.

4.1 Otimização das condições de extração dos agrotóxicos da polpa de cajá-manga

O método QuEChERS é um método que atualmente pode ser aplicado em diversos tipos de amostras. No entanto, três variações do método são relatadas na literatura para se adaptar às características distintas e peculiares de cada matriz alimentícia. Os métodos QuEChERS disponíveis atualmente são: o original e os modificados: acetato e citrato. Neste trabalho foi avaliado qual método QuEChERS seria o mais adequado para a extração de resíduos dos agrotóxicos da polpa de cajá-manga. Os resultados foram avaliados em termos da quantidade recuperada dos agrotóxicos, após a fortificação da polpa com quantidades controladas dos padrões dos agrotóxicos. A Figura 3 apresenta a quantidade extraída dos agrotóxicos em cada um dos métodos QuEChERS avaliados.

Figura 3. Quantidade extraída de resíduos dos agrotóxicos (A) clorpirifós, (B) carboxina, (C) difenoconazol e (D) tiabendazol da polpa de cajá-manga, empregando os métodos QuEChERS original, acetato e citrato.



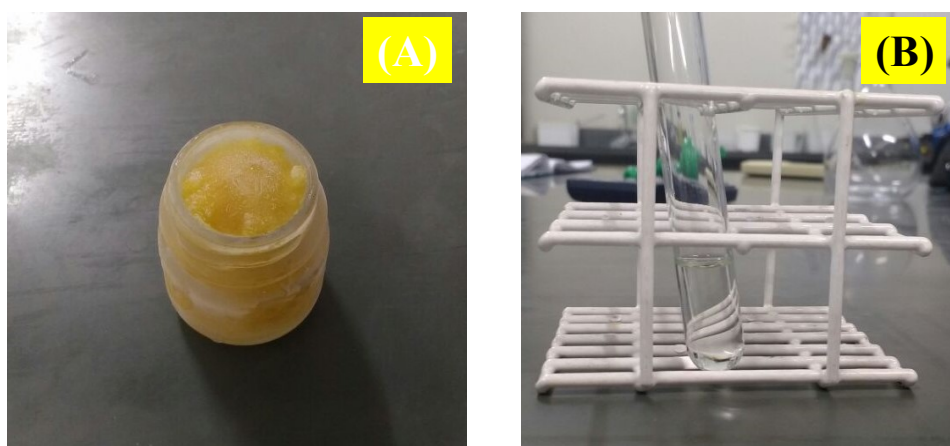
Fonte: Próprio autor.

De acordo com o gráfico da Figura 3, observa-se que o método original foi o mais eficiente para a extração de dois dos quatro agrotóxicos: clorpirifós e difenoconazol, sendo o segundo melhor para a extração da carboxina e o pior para a extração do tiabendazol, porém com valores recuperados próximos e dentro do desvio padrão experimental dos métodos modificados. Desta forma, o método escolhido para a realização do estudo de validação da metodologia proposta foi

o método QuEChERS original, pois apresentou de uma forma geral os melhores resultados de recuperação para os agrotóxicos.

É importante mencionar que não foram realizados outros estudos de otimização do método QuEChERS original, pois o mesmo apresentou excelente isolamento dos resíduos de agrotóxicos dos compostos da matriz do cajá-manga, como pode ser visto pela descoloração do extrato final obtido pelo método na Figura 4(B), em comparação com a coloração amarela da polpa, Figura 4(A).

Figura 4. (A) Imagem da polpa de cajá-manga. (B) Imagem ilustrativa de um extrato obtido pelo Método QuEChERS original na extração dos resíduos de agrotóxicos da polpa de cajá-manga.



Fonte: Próprio autor.

4.2 Estudo de validação do método QuEChERS para extração de resíduos de agrotóxicos de polpa de cajá-manga

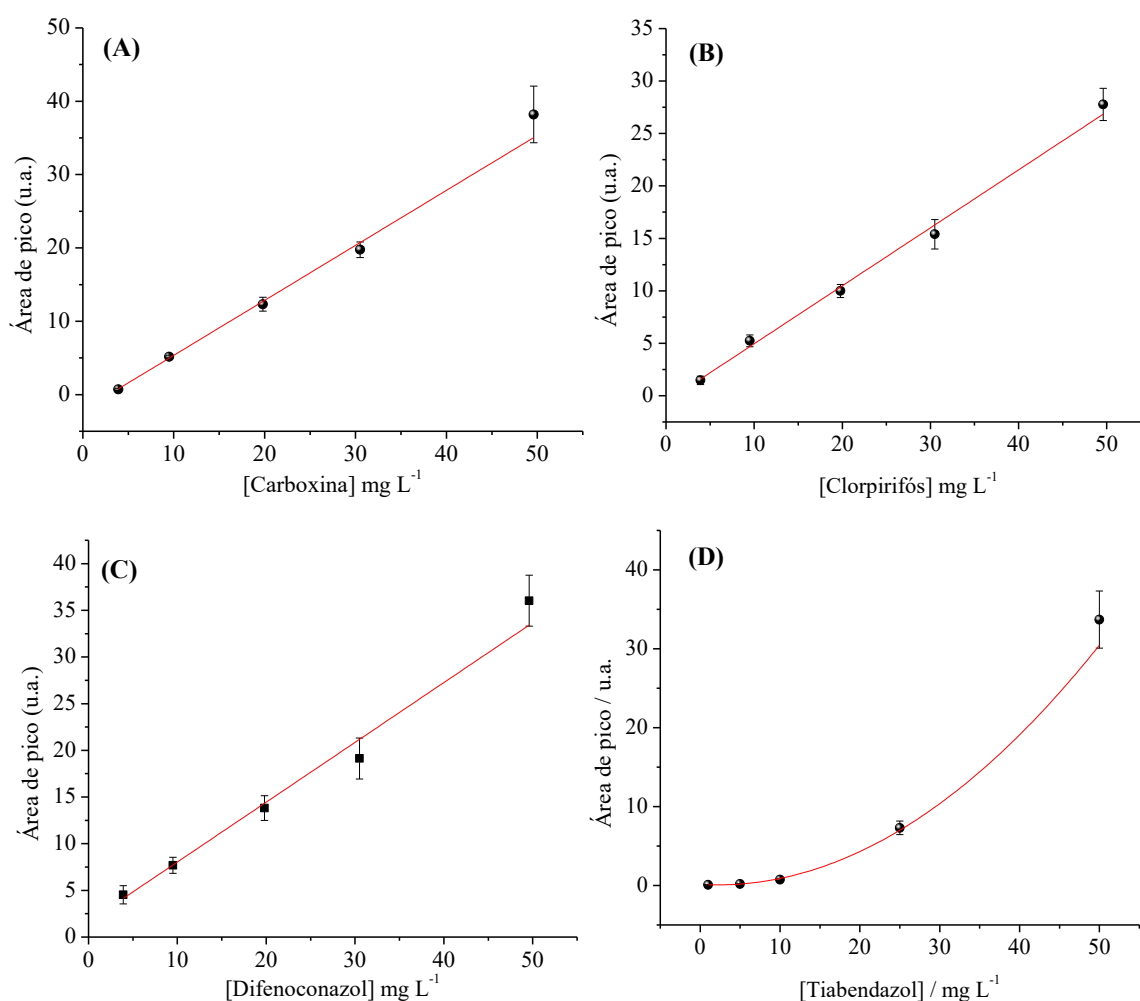
4.2.1 Seletividade

Neste trabalho a seletividade do método foi determinada a partir do sinal detectável de cada um dos quatro agrotóxicos na matriz do cajá-manga mesmo na presença de picos estranhos no cromatograma. Os picos dos agrotóxicos foram identificados no CG, por comparação dos tempos de retenção com padrões dos compostos, de forma que os mesmos não sofreram interferências, ou seja, nenhuma substância foi co-eluída com área maior que 30 % da área referente ao pico de um agrotóxico nos tempos de retenção estudados [27]. No cromatograma do extrato de cajá-manga fortificado com a solução padrão dos compostos os tempos de retenção foram: (1) clorpirifós, $t_R = 4,8$ min; (2) tiabendazol, $t_R = 5,3$ min; (3) carboxina, $t_R = 6,3$ min, e; (4) difenoconazol, $t_R = 8,8$ min.

4.2.2 Curva Analítica, linearidade e faixa de trabalho

A faixa de trabalho é o intervalo entre as concentrações dos compostos que pode ser determinada a partir de uma curva analítica linear em que a resposta instrumental é diretamente proporcional a quantidade do composto na amostra. Esta faixa é o intervalo de concentrações, nas quais normalmente se encontram os analitos na amostra. A linearidade da curva analítica é obtida a partir do coeficiente de correlação (r) da equação da reta, proveniente da regressão linear dos dados. A partir da construção da curva analítica, são definidas a faixa de trabalho e a linearidade da metodologia proposta para cada um dos quatro agrotóxicos, realizando as medidas em duplicatas em cada ponto da curva analítica. A Figura 5 apresenta as curvas analíticas, obtidas pela calibração na matriz de cajá-manga, para os 4 agrotóxicos estudados neste trabalho.

Figura 5. Curvas analíticas obtidas para os agrotóxicos (A) Carboxina, (B) Clorpirifós, (C) difenoconazol e (D) Tiabendazol.



Fonte: Próprio autor

De acordo com a Figura 5, as curvas analíticas para os agrotóxicos apresentaram ajustes adequados dos dados para os modelos linear (carboxina, clorpirifós e difenoconazol) e quadrático de segunda ordem para o tiabendazol. Esse comportamento não linear entre a resposta do equipamento e a concentração de tiabendazol foi observado também por Santana [29]. Os dados obtidos com as curvas analíticas preparadas na própria matriz de cajá-manga, a partir da fortificação destas com os agrotóxicos em diferentes concentrações, são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros obtidos das curvas analíticas para os agrotóxicos em matriz de cajá-manga.

Compostos	Equação da Reta	Linearidade (r) ou (R²)	Faixa de trabalho (mg kg⁻¹)
Carboxina	$A = 0,808 \cdot C_{\text{Carb}} - 3,093$	0,997	0,43-16,50
Clorpirifós	$A = 0,563 \cdot C_{\text{Clor}} - 0,792$	0,998	0,36-16,50
Difenoconazol	$A = 0,678 \cdot C_{\text{Dife}} + 0,879$	0,992	0,72-16,50
Tiabendazol	$A = 0,015 \cdot C_{\text{Tiab}}^2 - 0,102 \cdot C_{\text{Tiab}} + 0,236$	0,999	0,43-16,50

De acordo com a ANVISA, para que haja um ajuste adequado e aceitável dos dados da curva analítica a um modelo de regressão, o valor de coeficiente de regressão deve ser superior a 0,990 [25], como pode ser visto na Tabela 3 as curvas analíticas apresentaram coeficiente de determinação superiores a 0,992, atendendo as exigências mais rigorosas das principais agências de regulamentação. Para o tiabendazol o ajuste de um modelo quadrático para a curva analítica foi o mais adequado. É importante ressaltar que o ajuste quadrático obtido para o tiabendazol não é um fato exclusivo deste método, curvas de calibração melhor ajustadas por polinômios de segundo grau são comuns em determinações diversas [30].

4.2.3 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

A determinação do limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do método foi realizada através dos dados da curva analítica, empregando as Equações 1 e 2, respectivamente. Os valores obtidos para os limites de detecção e quantificação do método para cada agrotóxico são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Limites de detecção e de quantificação para cada agrotóxico estudado, empregando o método QuEChERS-CG-DIC.

Compostos	LOD (mg kg⁻¹)	LOQ (mg kg⁻¹)
Carboxina	0,14	0,43
Clorpirifós	0,12	0,36
Difenoconazol	0,22	0,72
Tiabendazol	0,13	0,43

Os valores obtidos para os limites de quantificação para os agrotóxicos na polpa de cajá-manga pelo método QuEChERS ficaram na faixa de 0,36-0,72 mg kg⁻¹. Essa faixa é superior à obtida por Santana [29], que empregou o método ESL-PBT para a extração dos mesmos agrotóxicos na polpa de cajá-manga, indicando uma menor detectabilidade dos agrotóxicos quando empregado o método QuEChERS. Em parte, essa detectabilidade inferior do método QuEChERS pode estar associada a sua incapacidade de concentrar o resíduo de agrotóxico no extrato final, ou seja, aumentar a relação analito/solvente no extrato obtido após a aplicação da metodologia. Como o cajá-manga não está na lista de frutos e/ou hortaliças publicados pelo PARA (Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos) [31] da ANVISA e não há registro dos limites máximos residuais (LMR) dos agrotóxicos estudados, os valores de LOQ para cada agrotóxico foram comparados com os LMR para os agrotóxicos em outros frutos. Assim, os LMR para a carboxina ficaram na faixa de 0,05-0,20 mg kg⁻¹; para o clorpirifós na faixa de 0,01-2,00 mg kg⁻¹; 0,01-1,00 mg kg⁻¹ para o difenoconazol, e; 0,01-10 mg kg⁻¹ para o tiabendazol [31]. Portanto, observa-se que os valores de LOQ encontrados para os agrotóxicos no método proposto encontram-se dentro da faixa de LMR para diferentes tipos de alimentos monitorados pela ANVISA, apesar da cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama não possuir uma detectabilidade elevada para estes agrotóxicos.

4.2.4 Precisão do método

4.2.4.1 Repetibilidade

Para a avaliação da precisão da metodologia de acordo com sua repetibilidade, foram efetuadas extrações dos resíduos dos agrotóxicos fortificados nas amostras de cajá-manga nas concentrações de 2, 3 e 4 vezes o LOQ, de acordo com o preconizado pelo Guia SANTE de Validação da Comunidade Europeia para resíduos de agrotóxicos em alimentos [27]. Todas as

condições experimentais do método foram mantidas constantes para este estudo, sendo realizadas triplicatas dos níveis de concentrações para os agrotóxicos.

Tabela 5. Repetibilidade do método QuEChERS-CG-DIC para a extração de resíduos de agrotóxicos da polpa de cajá-manga.

RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS	4 X LOQ		3 X LOQ		2 X LOQ	
	% REC	RSD	% REC	RSD	% REC	RSD
CLORPIRIFÓS	89,2	5,9	94,7	13,1	95,7	22,4
TIABENDAZOL	117,1	6,1	128,8	7,2	188,2	13,5
CARBOXINA	82,2	11,1	77,9	7,6	68,8	25,8
DIFENOCONAZOL	108,8	9,4	90,2	3,5	79,6	12,6

Para que o método seja considerado repetitivo, ou de boa repetibilidade, o Guia SANTE recomenda que amostras complexas tenham um máximo de dispersão das réplicas de 20%, em termos de RSD. De acordo com a Tabela 5, observa-se que a variação das respostas em torno da média, ficaram abaixo de 20% de RSD, excetuando-se para níveis mais baixos de fortificação do clorpirifós e da carboxina na polpa de cajá-manga, que apresentaram valores acima deste limite. Estes resultados indicam que a carboxina e clorpirifós devem sofrer interferência da matriz quando as concentrações se aproximam do limite de detecção instrumental. Apesar dessa variação, para teores ligeiramente maiores o desvio padrão relativo para as extrações dos quatro agrotóxicos se apresentou adequado, conferindo ao método boa repetibilidade.

4.2.4.2 Reprodutibilidade dentro do laboratório

A precisão da metodologia foi avaliada também quanto à sua reprodutibilidade em laboratório (ou precisão intermediária), conforme preconizado pelo Guia SANTE [27]. A reprodutibilidade em laboratório é um parâmetro de precisão que leva em consideração a manutenção das condições experimentais do método, porém variando uma única das condições experimentais. Neste trabalho, a reprodutibilidade em laboratório do método foi avaliada pela realização de triplicatas da extração dos resíduos de agrotóxicos em polpa de cajá-manga pelo método QuEChERS-CG-FID em três dias distintos (condição variada). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Reprodutibilidade em laboratório para o método QuEChERS-CG-DIC na extração de resíduos de agrotóxicos de polpa de cajá-manga.

RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS	4 X LOQ			
	% REC	% REC	% REC	RSD (%)
CLORPIRIFÓS	89,2	87,5	86,5	1,6
TIABENDAZOL	117,1	106,4	108,3	5,2
CARBOXINA	82,2	73,7	72,9	6,8
DIFENOCONAZOL	108,8	97,2	101,3	5,7

O estudo realizado para avaliação da reprodutibilidade em laboratório na extração de resíduos de agrotóxicos de polpa de cajá-manga indicou baixa dispersão dos resultados realizados em replicatas. De acordo com a Tabela 6, o desvio padrão relativo obtido para nove replicatas (três replicatas em cada dia) da extração de cada agrotóxico na polpa do cajá-manga foi inferior aos 20%, preconizados pelo Guia SANTE. Este resultado significa que não há variação significativa da resposta fornecida pelo método proposto quando este é aplicado, por exemplo, em dias diferentes de realização do procedimento experimental. Logo, o método apresenta boa reprodutibilidade de laboratório na extração dos resíduos de agrotóxicos.

4.2.5 Exatidão (Ensaio de recuperação)

A exatidão do método QuEChERS-CG-DIC foi investigada a partir do estudo da recuperação dos resíduos de agrotóxicos, que foram previamente fortificados em concentrações conhecidas, da polpa de cajá-manga. Três níveis de fortificação foram avaliados 2, 3 e 4 vezes o LOQ do método para cada agrotóxico. A exatidão é medida pela porcentagem de recuperação obtida de cada agrotóxico da polpa de cajá-manga pelo método proposto. Os resultados foram apresentados nas Tabelas 5 e 6.

De acordo com o Guia Sante, uma metodologia com boa exatidão na determinação de resíduos de agrotóxicos de alimentos deve apresentar uma porcentagem de recuperação na faixa de 70-120%, sendo também aceitável, para alguns casos e que a matriz seja complexa (altas concentração e diversidade de componentes em sua constituição), uma faixa um pouco mais ampla, de 60-140% [27]. Os resultados de recuperação neste trabalho, apresentados nas Tabelas 5 e 6, indicam que o método proposto apresenta boa exatidão para a extração de clorpirifós, carboxina, difenoconazol e tiabendazol da polpa de cajá-manga. As recuperações dos agrotóxicos ficaram, em sua grande maioria, dentro da faixa preconizada pelo Guia, exceto para o composto

tiabendazol no menor nível de fortificação, em que a porcentagem de recuperação foi de 188,2%. Por ser uma matriz complexa possuindo vários componentes em sua matriz, pode ter ocorrido o efeito de matriz, gerando assim um valor mais alto para a porcentagem de recuperação do tiabendazol quando a sua concentração de fortificação estava mais próxima do limite de detecção instrumental.

De acordo com Pinho *et al.* [16], esse efeito de matriz, também conhecido como “aumento da resposta cromatográfica induzida pela matriz”, é usado para explicar as taxas de recuperação de agrotóxicos que excedem 100%. Os próprios autores chegaram a taxas de recuperação de agrotóxicos em alimentos tão altas quanto 250%, em alguns casos em que a matriz apresentava alta coloração da polpa como pimentão e tomate.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho um procedimento de extração de resíduos de agrotóxicos de polpa de cajá-manga foi desenvolvido a partir do método QuEChERS e análise por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama. O método foi validado de acordo com o Guia SANTE, recomendado para metodologias de extração de resíduos de agrotóxicos de alimentos. Dentre as variantes do método QuEChERS avaliadas neste trabalho, a variante original foi a que proporcionou, de uma forma geral, a maior porcentagem de remoção dos resíduos de agrotóxicos da polpa de cajá-manga. Os extratos obtidos pelo método QuEChERS se apresentaram límpidos e transparentes ao final do processo, indicando a eficácia da limpeza do extrato pelo método, uma vez que a polpa do fruto apresenta uma coloração amarelada típica. No processo de validação, o método apresentou boa repetibilidade, reprodutibilidade em laboratório e exatidão, dentro do preconizado pelo Guia SANTE. A detectabilidade e o limite de quantificação foram os pontos mais frágeis do método. A detectabilidade não foi tão atrativa devido ao uso da cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama, que não possui sensibilidade adequada para análise de agrotóxicos. O limite de quantificação do método, apesar de apresentar uma faixa maior de concentrações mínimas quantificáveis que outros métodos, resultou em valores dentro da faixa de limites máximos residuais para os agrotóxicos, definidas para outras matrizes alimentícias. Diante das pequenas variações experimentais ao longo de todo estudo das extrações dos resíduos de agrotóxicos em cajá-manga e da baixa dispersão das porcentagens de recuperação obtidas destas extrações, o método QuEChERS-CG-DIC pode ser considerado robusto. Desta forma, pode-se concluir que o método proposto neste trabalho trata-se de um procedimento analítico eficiente e robusto para a determinação de resíduos de agrotóxicos em cajá-manga, empregando o método QuEChERS original e a cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MORZELLE, M. C.; BACHEGA, P.; SOUZA, E. C. D.; BOAS, E. V. D. B.; LAMOUNIER, M. L. Caracterização química e física de frutos de curriola, gabirola e murici provenientes do cerrado brasileiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 37, p. 096-103, **2015**.
- [2] SILVA, M. R.; LACERDA, D. B. C. L.; SANTOS, G. G.; MARTINS, D. M. D. O. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. *Ciência Rural*, v. 38, n. 6, p. 1790-1793, **2008**.
- [3] ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia Alimentar*, v. 27, p. 53-60, **2007**.
- [4] SILVA, T. L. L. E.; BECKER, F. S.; TOGUCHI, M. Y.; BOAS, E. V. D. B. V.; DAMIANI, C. Aplicabilidade tecnológica da marmelada-de-Cachorro. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 15, n. 3, p. 263-271, **2013**.
- [5] RODRIGUES, F. F. G.; NASCIMENTO, E. M. M. D.; FURTADO, C. A. N.; COSTA, J. G. M. D. Análise físico-química de espécies de spondias oriundas do cariri cearense. *Cadernos de Cultura*, v. 1, p. 44-52, **2010**.
- [6] DAMIANI, C.; SILVA, F. A. D.; AMORIM, C. C. D. M.; SILVA, S. T. P.; BASTOS, I. M.; ASQUIERI, E. R.; VERA, R. Néctar misto de cajá-manga com hortelã: caracterização química, microbiológica e sensorial. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 13, n. 3, p. 299-307, **2011**.
- [7] KOHATSU, D. S.; ZUCARELI, V.; BRAMBILLA, W. P.; EVANGELISTA, R. M. Qualidade de frutos de cajá-manga armazenados sob diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. especial, p. 344-349, **2011**.
- [8] SOUZA, F. X. D.; SOUSA, F. H. L.; MELO, F. I. O. Aspectos morfológicos de endocarpos de cajarana. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 20, n. 2, p. 379-384, **1998**.
- [9] JANICK, J.; PAULL, R. E. **The Encyclopedia of Fruit e Nuts**. London: British Library, UK, 2008, p. 29-31.

- [10] FRANQUIN, S.; MARCELIN, O.; AURORE, G.; REYNES, M.; BRILLQUET, J. M. Physicochemical characterisation of the mature-green Golden apple (*Spondias cytherea* Sonnerat). *Fruits*, v. 60, p. 203-210, **2005**.
- [11] CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de Frutos e Hortaliças. Fisiologia e Manuseio**. 2 ed. Lavras: FAEPE, p. 889-894, **2005**.
- [12] FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E. **Doenças das anonáceas**. In: SÃO JOSÉ, A.R. Anonáceas: produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimólia). Vitória da conquista: UESB, 1997. p. 196-213.
- [13] SACRAMENTO, C. K.; SOUZA, F. X. **Cajá**. In: SANTOS-SEREJO, J. A.; DANTAS, J. L. L.; SAMPAIO, C. V.; COELHO, Y. S. Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 83-105, **2009**.
- [14] MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; PERES, F.; LIMA, J. S.; MEYER, A. SILVA, J. J. O.; SARCINELLI, P. N.; BATISTA, D. F.; EGLER, M.; FARIA, M. V. C.; ARAÚJO, A. J. D.; KUBOTA, A. H.; SOARES, M. D. O.; ALVES, S. R.; MOURA, C. M.; CURI, R. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo-RJ. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 7(2), p. 299-311, **2002**.
- [15] RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. *Revista Liberato*, v. 10, n. 14, p. 149-158, **2009**.
- [16] PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 987-995, **2009**.
- [17] CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostras para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, **2011**.
- [18] ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, v. 86, p. 412-431, **2003**.

- [19] LEHOTAY, S.J.; SON, K. A.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U.; FU, W.; MASTOVSKA, K.; HOH, E.; LEEPIPATPIBOON, N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 16, p. 2548-2560, **2010**.
- [20] BRONDI, S. H. G.; SOUZA, G. B. D.; NOGUEIRA, A. R. A.; CAMARGO, L. A. D.; MAJARON, R. F. Desenvolvimento e validação do método QuEChERS na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite e carne de búfalo. *Química Nova*, v. 36, n. 1, p. 153-158, **2013**.
- [21] BEMVENUTI, R. H.; HACKBART, H. C. D. S.; SOUZA, M. M. D.; FURLONG, E. B.; DORS, G. C.; FAGUNDES, C. A. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando QuEChERS e HPLC/UV-FL. *Química Nova*, v. 35, n.6, p. 1244-1249, **2012**.
- [22] BANDEIRA, D. D.; MUNARETO, J. S.; RIZZETTI, T. M.; FERRONATO, G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA R.; ADAIME, M. B. Determinação de resíduos de agrotóxicos em leite bovino empregando método QuEChERS modificado e GC-MS/MS. *Química Nova*, v. 37, n. 5, p. 900-907, **2014**.
- [23] MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>. Acessado em: Setembro de **2017**.
- [24] PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. D. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, **2008**.
- [25] BRASIL. ANVISA, Resolução nº 899, de 29 de maio 2008. Dispõe sobre Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 junho de **2003**. Seção 1, p.56.
- [26] United States Food and Drug Administration (US-FDA); Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, **2001**.
- [27] SANTE, EUROPEAN COMISSION. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Document N°. SANTE/12571/2013, **2016**.

- [28] 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**.
- [29] SANTANA, E.T.D. Desenvolvimento e otimização de um método de determinação de resíduos de agrotóxicos em cajá-manga (*Spondias dulcis*), empregando ESL-PBT e CG-DIC. Monografia de Conclusão de Curso, Faculdade de Ciências Integradas do Pontal, Universidade Federal Uberlândia, **2017**.
- [30] OLIVEIRA, E.C.; AGUIAR, P.F. Validação da metodologia da avaliação de incerteza em curvas de calibração melhor ajustadas por polinômios de segundo grau. *Química Nova*, v. 32, p. 1571-1575, **2009**.
- [31] ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>. Acessado em: agosto de **2017**.
- [32] PERES, F.; ROZEMBERG, B.; LUCCA, S. R. Percepção de riscos no trabalho rural em uma região agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil: agrotóxicos, saúde e ambiente. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 21(6):1836-1844, nov-dez, **2005**.
- [33] OSHITA, D.; JARDIM, I. C. F. Comparação de métodos por cromatografia líquida na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em morangos. *Quim. Nova*, v. 38, No. 10, p. 1273-1281, **2015**.