UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

SERGIO ROBERTO CHAVES LEAL JÚNIOR

VALIDAÇÃO DA ANÁLISE DE AMETOCTRADINA EM MÉTODO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA PERFORMANCE E ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (UPLC-MS/MS)

Recife
2023

SERGIO ROBERTO CHAVES LEAL JÚNIOR

VALIDAÇÃO DA ANÁLISE DE AMETOCTRADINA EM MÉTODO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA PERFORMANCE E ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (UPLC-MS/MS)

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do curso de Química Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química Industrial.

Orientador (a): Jorge Vinicius Fernandes Lima Cavalcanti

Recife

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Leal Júnior, Sergio Roberto Chaves.
Validação da análise de ametoctradina em método multirresíduo de agrotóxicos por cromatografia líquida de ultra performance e espectrometria de massas em tandem (UPLC-MS/MS) / Sergio Roberto Chaves Leal Júnior. - Recife, 2023.
28 : il., tab.

Orientador(a): Jorge Vinicius Fernandes Lima Cavalcanti
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Química Industrial - Bacharelado, 2023.

1. ametoctradina. 2. cromatografia. 3. espectrometria-de-massas. 4. LC-MS/MS. 5. fungicidas. I. Cavalcanti, Jorge Vinicius Fernandes Lima. (Orientação). II. Título.

540 CDD (22.ed.)

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
COORDENAÇÃO DA GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

MAPA DE NOTAS

NOME DO EXAMINANDO: **Sérgio Roberto Chaves Leal Júnior**

CURSO: **BACHARELADO EM QUÍMICA INDUSTRIAL**

DISCIPLINA: **EQ642-TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

TEMA: **"VALIDAÇÃO DA ANÁLISE DE AMETOCTRADINA EM MÉTODO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA PERFORMANCE E ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (UPLC-MS/MS)".**

DATA: 28/09/2023.

HORÁRIO: 16:00h

Examinador	Redação	Apres. Oral	Defesa	Média
Orientador	**9,0**	**10,0**	**9,0**	**9,33**
1º Examinador	**9,0**	**10,0**	**9,0**	
2º Examinador	**9,0**	**10,0**	**9,0**	

_____

Orientador: Prof.º Dr.º Jorge Vinicius Fernandes Lima Cavalcanti

_____

1º Examinador: Prof.º Dr.º Antônio Demóstenes de Sobral

_____

2ºExaminador: Dr.º Ronald Keverson da Silva Santos

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente aos meus pais, Maria Luiza Correia Barbosa e Sergio Roberto Chaves Leal, pelo apoio incondicional sem o qual não teria alcançados as conquistas que tenho hoje.

Aos meus colegas de turma, que com a amizade fizeram esta longa e jornada pela graduação ser menos trabalhosa e mais recompensante. Em especial aos meus companheiros de turma, Maria Júlia Costa, Júlia Silvestre, Maria Eduarda Oliveira, Gabriel Reis, Aldo Henrique, Paulo Roberto, José Lucas e João Luiz.

Ao Laboratório de Agrotóxicos de Contaminantes em Alimentos e Bebidas Alcoólicas (LABTOX) e ao Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP) pela oportunidade que fez possível a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho no LABTOX, em especial Henrique Marinho, Cassiel Ruan e Jonas Oliveira, que com o conhecimento compartilhado me ajudaram imensamente neste trabalho.

RESUMO

Um dos maiores desafios da agricultura atual são os fungos. Eles são capazes de causar diversas doenças na grande maioria das culturas atuais que, quando não matam a planta, reduzem sua produtividade. Esse é um grande problema já que a população mundial vem aumentando cada vez mais. Por este motivo, o uso de fungicidas tem se tornado quase que obrigatório. Por outro lado, os cuidados com o uso de defensivos agrícolas devem ser tomados, pois vários estudos já atrelaram seu uso a riscos para a saúde humana. Geralmente esse contato se faz pela exposição crônica da população com os resíduos de agrotóxicos nos alimentos. Nesse sentido, a cada dia novos defensivos menos agressivos são desenvolvidos pelos cientistas. Assim surgiu a Ametoctradina, um fungicida de uso foliar desenvolvido pela empresa BASF em 2010. Este trabalho tratou da validação da análise da Ametoctradina dentro de um método multirresíduo de agrotóxicos de acordo com as diretrizes do SANTE/12682/2019 no Laboratório de Agrotóxicos e Contaminantes em Alimentos e Bebidas Alcoólicas (LABTOX) do Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP). A fragmentação do padrão analítico de ametoctradina foi realizado com sucesso e o par de massas 276.2>176,0 foi escolhido como transição de quantificação e o par 276.2>149,0 como transição de confirmação. As amostras fortificadas no nível de 0,01 $mg \cdot Kg^{-1}$ das 3 matrizes representativas utilizadas se mantiveram dentro das especificações de validação, apresentando uma concentração média de 0,0088 $mg \cdot Kg^{-1}$, 0,0087 $mg \cdot Kg^{-1}$ e 0,0082 $mg \cdot Kg^{-1}$ para a uva, manga e feijão, respectivamente. Estes resultados de cada matriz não apresentaram variação maior que 20% entre eles, garantindo assim a validação da análise. Durante o período de estudo, 40 amostras vindas de Petrolina, em Pernambuco, foram positivas para a ametoctradina. Elas foram, em sua grande maioria, amostras de uva e apresentaram uma concentração média de 0,13 $mg \cdot Kg^{-1}$. Outros fungicidas também foram analisados, mas somente o Dimetomorfe apareceu em 100% das amostras, indicando que ele faz parte da formulação utilizada em Petrolina. A presença de outros fungicidas foi atrelada à crescente resistência dos fungos para os defensivos agrícolas.

Palavras-chave: ametoctradina, cromatografia, espectrometria-de-massas, LC-MS/MS, fungicidas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Fluxograma do método QuEChERS.	17
Figura 2 –	Estudo de recuperação de amostra fortificada em matriz de uva.	21
Figura 3 –	Estudo de recuperação de amostra fortificada em matriz de manga.	21
Figura 4 –	Estudo de recuperação de amostra fortificada em matriz de feijão.	22
Figura 5 –	Gráfico de frequência de fungicidas em amostras positivas para Ametoctradina.	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil gradiente de fases móveis. 18
Tabela 2 – Transições otimizadas da ametoctradina. 20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCM	Curva de Calibração em Matiz
CCS	Curva de Calibração em Solvente
CG-ECD	Cromatografia Gasosa com Detector de Captura de Elétrons
CG-MS/MS	Cromatografia Gasosa com Detector de espectrometria de massa em tandem
EURL	Laboratório de Referência da União Europeia
FDA	*Food and Drug Administration*
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
LC-MS/MS	Cromatografia líquida com detector de espectrometria de massas em tandem
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MRM	Método de Múltiplas Reações
MS/MS	Espectrômetro de Massas em Tandem
QC	Amostra de matriz fortificada
TM	Amostra testemunha
TR	Tempo de Retenção

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**9**
2	**FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**	**11**
2.1	MÉTODO QUECHERS	11
2.2	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA	12
2.3	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	13
2.4	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS	13
2.5	AMETOCTRADINA	16
3	**MATERIAL E MÉTODOS**	16
3.1	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO	16
3.2	CROMATOGRAFIA	18
3.3	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	19
4	**RESULTADOS E DISCUSSÃO**	**19**
5	**CONCLUSÃO**	**24**
	REFERÊNCIAS	**25**

1 INTRODUÇÃO

Atualmente os fungos são um grande desafio para a agricultura. Eles são a causa de várias doenças em plantas que levam a perdas econômicas e consequentemente afetam a segurança alimentar mundial (Savary *et al*., 2019).

As doenças fúngicas podem afetar todas as culturas atuais como cereais , frutas , vegetais e até mesmo plantas ornamentais (Hu *et al.*, 2015). Atualmente existem cerca de 19 mil fungos com potencial para causar doenças em plantas. Estas infecções podem se espalhar facilmente nos campos e mesmo nos casos em que não causam a morte da planta elas podem causar uma redução na qualidade do produto. As plantas infectadas podem sofrer de crescimento atrofiado, redução na frutificação, e redução no valor nutricional de forma geral, impactando não somente na renda do produtor como na disponibilidade de alimento para a população (Steinberg; Gurr, 2020). Justamente por estes motivos estima-se que cerca de um terço da produção agrícola seja perdida por causa das doenças fúngicas (Fisher *et al.*, 2012).

Como já comentado antes, os fungos são uma preocupação global, pois podem se desenvolver em diversas regiões e climas, apesar de apreciar climas moderados e alta umidade. Os fungos se espalham na plantação através de seus esporos que podem ter como veículos o vento, a água, os insetos e até mesmo o equipamento agrícola (Bebber *et al.*, 2013). Nesse contexto, o uso de fungicidas na agricultura se tornou essencial, pois eles desempenham um papel crucial na proteção das culturas e na garantia da produção sustentável de alimentos. Prevenindo ou controlando as infecções por fungos, esses defensivos ajudam a manter a saúde da cultura e manter o seu vigor. Consequentemente, as plantas são capazes de produzir frutos, vegetais e grãos de maior qualidade. Tudo isso é crucial para manter a saúde alimentar global e atender a necessidade da população crescente (Hu *et al.*, 2015).

Outro benefício do uso de fungicidas está no fato deles terem como alvo específico os patógenos fúngicos, reduzindo a necessidade do uso excessivo de pesticidas. Esta abordagem direcionada pode reduzir o efeito não desejado em insetos e outros organismos benéficos para a cultura. Atualmente, entretanto, o impacto em alvos não específicos de muitos fungicidas ainda vem sendo estudado (Patel *et al.*, 2014; Steinberg; Gurr, 2020).

O uso de pesticidas, entretanto, vem atrelado a certa preocupação devido ao seu risco potencial para o meio ambiente e para a saúde da população. Os pesticidas podem permanecer nas plantações por certo tempo após a aplicação e o consumo excessivo de seus resíduos em alimentos podem ter efeitos adversos, especialmente com a exposição prolongada (Hergueta *et al.*, 2022; Yadav; Devi, 2017).

O envenenamento por pesticidas pode acontecer de forma aguda, quando o indivíduo é exposto a uma concentração muito alta do defensivo. Mas estes casos estão mais atrelados aos agricultores, já que podem ter um contato direto com o pesticida. A preocupação principal está na exposição crônica, quando o indivíduo é exposto a baixos níveis de resíduo do pesticida por um longo período de tempo. Nesses casos as pequenas doses quando acumuladas podem causar efeitos adversos para a saúde. Crianças, idosos e grávidas por terem um sistema imunológico mais comprometido podem ser mais vulneráveis a estes efeitos na saúde (Yadav; Devi, 2017).

Justamente por estes motivos diversos órgãos reguladores no mundo todo estabeleceram limites máximos de resíduos (LMR) para os pesticidas em alimentos. Estes limites foram desenvolvidos com base em estudos que apontam um nível seguro para o consumo dos resíduos. No Brasil não é diferente e a ANVISA regula o LMR para todos os agrotóxicos que têm seu uso permitido na agricultura (Brasil, 2022).

Por estes motivos os cientistas vêm a cada dia tentando desenvolver novos defensivos agrícolas que apresentem baixa toxicidade para os seres humanos. Neste contexto surgiu a ametoctradina, um novo fungicida de uso foliar que quando em conjunto com outros ingredientes ativos, como o Dimetomorfe, conseguem promover o controle do desenvolvimento fúngico em todos os seus estágios. Ela faz parte de uma nova classe química chamada de triazolo-pirimidilaminas desenvolvida pela empresa BASF em 2010. No Brasil, entretanto, foi anunciada ao mercado na 27ª edição da Hortitec em 2022 e seu uso regulamentado pela ANVISA (Brasil, 2022; Merk *et al.*, 2011). A ametoctradina funciona inibindo o transporte de elétrons e consequentemente a produção de ATP dentro da mitocôndria das células dos fungos (Hu *et al.*, 2015).

Por ser uma molécula de uso relativamente novo no Brasil, poucos são os estudos envolvendo a análise de resíduos da ametoctradina em alimentos no país. Fora do Brasil, entretanto, a análise da ametoctradina pode ser facilmente encontrada dentro do contexto de análise de resíduos, como nos trabalhos de (Balkan; Karaagaçli, 2023; Lee *et al*., 2018; Park *et al*., 2021; Tarifa *et al*., 2020).

É importante apontar que muitos dos trabalhos comentados já incorporam a ametoctradina em métodos de multiresíduo o que indica uma facilidade no seu estudo junto a outros pesticidas. O fato de não haver muitos trabalhos no Brasil traz uma segunda relevância ao estudo, já que não se tem muitos dados sobre o uso da ametoctradina no país.

Este trabalho tem como o objetivo validar a análise da ametoctradina em diferentes matrizes dentro de um método de multirresíduo de agrotóxicos previamente validado através de uma validação *on-going* dentro da rotina de trabalho do laboratório de contaminantes em alimentos e bebidas alcoólicas (LABTOX) dentro do Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP). Como objetivos específicos teremos a aquisição de dados do uso de ametoctradina no Brasil, assim como a identificação dos outros fungicidas utilizados em conjunto com a ametoctradina.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A análise de resíduos de contaminantes em alimentos é feita em sua grande maioria por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS). A cromatografia gasosa também é utilizada para certos analitos que não apresentam boa sensibilidade para o LC-MS/MS, nestes casos podem ser utilizados detectores como os de espectrometria de massas em tandem (GC-MS/MS) assim como o de captura de elétrons (GC-ECD) (Balkan; Karaagaçli, 2023).

Em todos os casos a amostra também deve passar por uma etapa de preparação. É nesta etapa em que os resíduos de agrotóxicos são extraídos de modo que sua análise cromatográfica seja possível. O método mais utilizado para extração e purificação de amostras de alimento hoje em dia é o método *QuEChERS* (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*). Como seu nome já diz, este método foi desenvolvido com o objetivo de fornecer uma forma eficiente, econômica e segura de extração e purificação de um grande número de analitos nas mais diversas matrizes de alimentos. Somente quando o *QuEChERS* não é eficiente é que outros métodos de extração são testados como o método de pesticidas polares rápidos (*QuPPe*) desenvolvido pelos laboratórios de referência da união européia (EURL, 2023; Sánchez *et al*., 2023).

2.1 MÉTODO *QuEChERS*

No método QuEChERS consiste inicialmente de uma etapa de trituração e pesagem da amostra. É introduzido então o solvente de extração, que pode ser acetonitrila, metanol, água, ou uma mistura destes. Após uma etapa de agitação, para garantir o contato do solvente com a amostra, é adicionada uma mistura de sais (geralmente cloreto de sódio e sulfato de magnésio). Estes sais realizam a etapa de limpeza e purificação, pois ajudam na separação da fase orgânica da fase aquosa. Por fim, a amostra é centrifugada para separar a suspensão da

fase sólida. O método pode sofrer diversas modificações para atender as necessidades de certos analitos (Hu *et al*., 2015; Sánchez *et al*., 2023).

2.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

A cromatografia líquida é uma técnica de separação usada para separar, identificar e quantificar diferentes componentes através de suas diferentes interações com uma fase estacionária e uma fase móvel. Neste tipo de metodologia, a amostra previamente preparada é dissolvida em um líquido (a fase móvel) e então passa por uma coluna contendo um material sólido (a fase estacionária). Os diferentes componentes da amostra vão interagir de forma diferente com as fases, fazendo com que eles levem tempos diferentes para passar na coluna (Dong, 2016).

Ao passo que a fase móvel flui na coluna, os diferentes componentes são seletivamente retidos pela fase estacionária de forma única. Isso faz com que ocorra uma separação dos componentes conforme eles levam tempos diferentes para passar pela coluna. Os componentes podem então ser detectados e quantificados por vários métodos diferentes. Na área de análise de resíduos de pesticidas a espectrometria de massas em tandem é a principal forma de detecção utilizada (Snyder; Kirkland, 2009).

A cromatografia líquida é uma escolha versátil e amplamente utilizada em diferentes campos da ciência, como na química, farmacologia, biologia e, em especial, na análise de matrizes de alimento. A cromatografia líquida tem vários subtipos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *HPLC*). No entanto, a cada momento novas versões mais avançadas da cromatografia líquida são desenvolvidas como a cromatografia líquida de ultra eficiência (do inglês *UPLC*). Este tipo de tecnologia utiliza partículas de tamanho ainda menor na fase estacionária, além de trabalhar com maiores pressões, alcançar separações mais rápidas e uma melhor resolução dos resultados. O UPLC foi certamente um grande avanço, especialmente na área de análise de resíduos, por conseguir maior sensibilidade, velocidade e eficiência comparado ao HPLC (Castro *et al.*, 2021).

No contexto do estudo, a ametoctradina é separada dos outros resíduos possivelmente presentes na amostra assim como os outros diversos componentes da matriz. Isso faz com que sua análise no espectrômetro de massas seja possível sem grandes interferentes. Apesar de ser possível a análise de dois compostos com o mesmo tempo de retenção, isso não é algo recomendado, pois o MS/MS terá menos sensibilidade para ambos os analitos (Greaves;

Roboz, 2013). Dessa forma, a cromatografia é feita para que se obtenha a ametoctradina da forma mais pura possível.

2.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Após a separação cromatográfica, a ametoctradina entra no espectrômetro de massa, que consiste em um analisador de massa e um detector. No caso de espectrômetro de massa em tandem (MS/MS) ele é capaz de realizar a seleção e fragmentação dos íons de ametoctradina em diferentes fragmentos específicos, garantindo sensibilidade e a seletividade da análise. Por fim, o MS/MS detecta e quantifica a ametoctradina com base nos sinais dos fragmentos específicos gerados pela sua fragmentação. O instrumento compara os sinais obtidos com os padrões de referência da ametoctradina, permitindo a quantificação precisa dos resíduos na amostra (Hoffmann; Stroobant, 2013).

Os dados obtidos pelo LC-MS/MS são processados e analisados por meio do software específico do equipamento. As concentrações de ametoctradina na amostra são calculadas com base nas curvas de calibração estabelecidas a partir dos padrões de referência. A análise por LC-MS/MS é uma técnica altamente sensível e seletiva, capaz de detectar e quantificar com precisão os resíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos de uma forma geral. Essa análise desempenha um papel fundamental na garantia da segurança alimentar e no cumprimento das regulamentações relacionadas aos níveis de resíduos de agrotóxicos (Greaves; Roboz, 2013).

As amostras são geralmente analisadas inicialmente em um método de *Screening*, também conhecido como método de triagem. Esse método é uma abordagem analítica usada para realizar uma avaliação rápida e preliminar de um grande número de amostras ou substâncias em busca de determinados componentes, como contaminantes ou compostos de interesse. Os métodos de screening são projetados para identificar rapidamente a presença ou ausência de compostos-alvo, sem necessariamente fornecer informações detalhadas sobre a concentração ou a identidade exata dos componentes detectados. Eles são especialmente úteis quando é necessário analisar grandes volumes de amostras ou quando há uma ampla gama de compostos a serem pesquisados, como é o caso de análises de multirresíduos. A partir do resultado parte-se para o método de quantificação (Merone *et al.*, 2022).

2.4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS

A validação de métodos analíticos na análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos segue diretrizes e protocolos estabelecidos por órgãos reguladores, como a Food and Drug Administration (FDA) e o EU reference laboratories for residue of pesticides (EURL). Embora os detalhes específicos possam variar, geralmente existem etapas comuns envolvidas no processo de validação.

Um dos parâmetros a serem analisados em uma validação é a seletividade, que avalia se o método é capaz de distinguir o analito de interesse dos demais componentes da amostra, como interferentes ou outros compostos presentes nos alimentos responsáveis por efeito de matriz. O efeito matriz em cromatografia é a interferência causada pelos componentes da amostra que não são o analito de interesse. Essa interferência pode resultar em distorções nos resultados da análise, afetando a separação e a detecção do analito. Essa interferência pode levar a supressão ou aumento do sinal do analito, deslocamento do tempo de retenção e causando distorção do pico cromatográfico. Para um método ser validado ele deve levar em consideração este efeito e conseguir provar que o resultado é verdadeiro, apesar dos interferentes da amostra (Balkan; Karaagaçli, 2023; Damale *et al*., 2023).

Outro parâmetro da validação é a linearidade, que verifica se existe uma relação linear entre a concentração do analito e o sinal analítico obtido, garantindo que o método seja capaz de quantificar com precisão diferentes níveis de concentração. Atrelados a este temos o limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), que determinam a menor concentração do analito que pode ser detectada e quantificada pelo método de forma confiável. E para avaliar os efeitos estatísticos temos a precisão, que avalia a variação dos resultados quando a análise é repetida várias vezes, tanto dentro de um mesmo dia (repetibilidade) quanto em diferentes dias (reprodutibilidade). Geralmente é expressa em termos de desvio padrão e coeficiente de variação (USP, 2020).

O parâmetro de exatidão verifica a proximidade dos resultados obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro, geralmente por meio de análises de amostras de referência certificadas. E dentro deste mesmo tópico temos também a recuperação, que determina a eficiência do método em extrair o analito de interesse a partir da amostra de alimento, esta análise de faz geralmente por meio da fortificação do analito em amostras limpas em certa concentração conhecida. Por fim, pode-se avaliar também a estabilidade, onde analisa-se a estabilidade do analito em diferentes condições, como durante o armazenamento e processamento da amostra (USP, 2020).

Além destes outros parâmetros também podem ser analisados como a robustez, especificidade, efeito matriz e linearidade do detector. Isso depende bastante da literatura de referência utilizada para a validação. No caso do EURL, as recomendações para validação da análise de pesticidas podem ser encontradas em seu guia para controle de qualidade e validação de métodos em análises de alimentos "SANTE/12682/2019" (EURL, 2021) e é um dos principais materiais de referência na área de estudo.

Segundo a EURL a sensibilidade e linearidade podem ser analisadas juntas por meio dos pontos de curva, onde não se pode ter uma variação maior que 20% da concentração verdadeira. O efeito matriz pode ter um impacto muito grande no resultado e portanto deve ser analisado por meio de uma curva de calibração em matriz (CCM). Neste caso uma amostra testemunha (TM), que seja isenta do analito de interesse, é adicionada junto ao padrão de referência. Caso CCM não varie mais que 20% da concentração confirma-se que a matriz não influencia significativamente o resultado. O Limite de quantificação (LQ) é analisado através de amostra TM fortificada na concentração do LQ onde sua variação não deve ultrapassar 40% da concentração de referência. A especificidade é analisada através da TM, onde seu sinal não deve superar 30% do limite de detecção. A recuperação é outro ponto importante, onde as amostras fortificadas devem apresentar um valor entre 70-120% da concentração de referência (Mozzaquatro, 2022; Shinde *et al.*, 2021).

Os métodos de validação on-going são especialmente importantes na verificação da reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados. Pode-se, portanto, avaliar a precisão e robustez do método através da análise de uma amostra controle cuja concentração é verificada em cada batelada de amostras. A variação entre os resultados não deve variar mais que 20% entre elas (EURL, 2021).

Existem, também, parâmetros que são especificidades do LC-MS/MS como a razão de íons e o tempo de retenção. A razão de íons é um parâmetro utilizado na espectrometria de massas para confirmar a identidade de um analito específico. Ela é calculada comparando as áreas geradas pelos íons do analito na amostra com a área gerada pelos íons do padrão de referência, que são fragmentos específicos gerados pela decomposição do analito na fonte de ionização. Esses íons de referência são selecionados previamente como marcadores característicos do analito de interesse. A razão de íons é calculada dividindo a área gerada pelo íon de transição alvo pela área gerada do íon de referência correspondente. Essa razão é comparada com um valor de referência pré-estabelecido para o analito. Se a razão de íons medida estiver dentro de um intervalo aceitável em relação ao valor de referência, isso indica

que o analito está presente na amostra, fornecendo uma confirmação adicional da identidade. O SANTE indica que se tenha uma variação máxima de 30% entre a amostra e o padrão de referência (Bibi *et al.*, 2022).

O tempo de retenção (TR) também é uma informação valiosa, pois auxilia na identificação dos componentes presentes na amostra. Ele é especialmente importante em métodos de triagem onde somente uma transição é utilizada e por consequência não se pode confirmar o analito pela razão de íons. Entretanto, mesmo na validação de métodos quantitativos o TR é um parâmetro a ser considerado e não deve variar mais que ±0,1 min (Shinde *et al.*, 2021).

Os métodos de triagem, apesar de serem utilizados em paralelo com os métodos de quantificação não entram nos parâmetros de validação, já que não são responsáveis diretamente pelo resultado reportado.

2.5 AMETOCTRADINA

A ametoctradina é um ingrediente ativo de fungicida relativamente novo, desenvolvido pela empresa BASF. Essa molécula pertence a uma nova classe de compostos chamados de triazolo-pirimidilaminas. A ametoctradina funciona como um inibidor de respiração mitocondrial e consequentemente a produção de ATP no patógeno. O uso da ametoctradina é basicamente foliar onde após sua aplicação ela é absorvida com certa afinidade formando uma película protetora contra os fungos. Para garantir uma atuação abrangente e sustentável a ametoctradina é utilizada em conjunto com outros fungicidas como o Dimetomorfe. Estes dois compostos foram uma boa dupla, pois tem seu funcionamento de formas diferentes garantindo o completo controle dos patógenos (Hu *et al.*, 2015; Merk *et al.*, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

A primeira etapa envolvendo a análise de resíduos em alimentos é a preparação da amostra. Nesta etapa o alimento é triturado com o auxílio de um processador elétrico. Esta análise é feita no alimento como um todo (casca, polpa e outras partes). O processo de extração e purificação utilizado na análise de multirresíduo do LABTOX segue o método *QuEChERS*. Este método tem suas variações dependendo do tipo de matriz analisada e pode ser dividido no *QuEChERS* citrato, para amostras de frutas, vegetais, água e alimentos

líquidos, e o *QuEChERS* acetato, para amostras de grãos, oleaginosas, sementes, solos e alimentos secos.

Para o *QuEChERS* citrato pesou-se 10g da amostra previamente triturada em um tubo de centrífuga. Adicionou-se então 50µL de solução de propoxur a $2\mu g \cdot L^{-1}$ e Trimethoprim $20\mu g \cdot L^{-1}$. Os analitos desta solução foram utilizados como controladores da extração. Adicionou-se ao tubo 10 mL de acetonitrila grau HPLC. Após agitar vigorosamente adicionou-se 4g de Sulfato de magnésio, 1g de cloreto de sódio, 1g de citrato trissódico dihidratado e 0,5g de hidrogenocitrato dissódico sesqui-hidratado. Após uma segunda agitação, o tubo é levado à centrífuga por 3 min em 5000 rpm. Por fim transferiu-se uma alíquota de 50µL do sobrenadante para um vial juntamente com 950µL de solução de Quinalfos 2 $ng \cdot mL^{-1}$ e ácido fórmico a 0,1% v/v em metanol grau HPLC. O Quinalfos também foi utilizado como controlador, para identificar qualquer problema na injeção ou com o detector.

O método *QuEChERS* acetato segue a mesma metodologia, mas pesou-se apenas 5g da amostra. Há uma alteração, também, nos sais utilizados. Neste caso foram utilizados 6g de sulfato de magnésio e 2,5g de acetato de sódio. Na última etapa a alíquota final foi compensada para 100µL. Um fluxograma com as etapas do método pode ser observado na figura 1.

Figura 1 - Fluxograma do método *QuEChERS*.

Fonte: O autor (2023).

Foram extraídos algumas amostras que serviram como controle de qualidade na validação *on-going*. O primeiro foi o branco de matriz, ou amostra testemunha, onde uma

amostra reconhecidamente isenta do analito estudado foi extraída pelo método *QuEChERS* respectivo. Foi utilizada, também, uma amostra de matriz fortificada (QC), onde em uma amostra reconhecidamente isenta de resíduos foi fortificada com uma solução previamente preparada com o padrão de referência do analito de modo a obter uma concentração final de 0,01 $mg \cdot Kg^{-1}$. Estimou-se repetir a extração da amostra QC pelo menos três vezes durante o período do estudo.

Em cada batelada de amostra novas alíquotas foram retiradas do mesmo tubo de extração, que foi armazenado em freezer. A validação da adição da ametoctradina dentro do método multirresíduo se voltou ao estudo de recuperação das amostras QC, assim como a variação da concentração observada nas diversas injeções.

3.2 CROMATOGRAFIA

O presente estudo foi realizado utilizando um sistema de cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) da marca Waters Acquity. Sistema este que consiste em alguns módulos como o gerenciador de amostras, gerenciador de solventes binário, organizador de amostras e aquecedor de coluna. O sistema foi utilizado com uma coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (2.1 × 100 mm 1.7-µ) e pré-coluna Waters Acquity UPLC BEH C18 (2.1 × 5 mm 1.7-µ). Foram utilizadas duas fases móveis, sendo a primeira (Fase A) consistindo em água ultrapura com 5 mM de formiato de amônio e 0,1% v/v de ácido fórmico. A segunda (Fase B) consistiu de 0,1% v/v de ácido fórmico em metanol grau HPLC. O gradiente de fases utilizado teve o seguinte perfil apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Perfil gradiente de fases móveis.

Tempo (min)	Fase A	Fase B
0	90%	10%
0,25	90%	10%
8,75	0%	100%
9,50	0%	100%
9,51	90%	10%
11	90%	10%

Fonte: O autor (2023).

3.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A análise da ametoctradina foi realizada em um espectrômetro de massas modelo Xevo TQ-S da marca Waters Technologies, utilizando uma fonte de ionização de electrospray em modo positivo. A voltagem do capilar foi mantida em 0,5 kV e foi utilizado um método de múltiplas reações (Do inglês MRM) para a análise das massas. A temperatura na fonte foi de 150°C e o gás do cone foi nitrogênio em um fluxo de 150 $L \cdot h^{-1}$. Foi utilizada uma temperatura de dessolvatação de 500-550°C e gás de dessolvatação em um fluxo de 800-1000L/h de nitrogênio. O gás de colisão foi argônio com uma pressão de $\pm\ 3,5{\times}10^{-3}\ mbar$.

A fragmentação da molécula de ametoctradina foi otimizada no espectrômetro de massas a partir das transições apresentadas por (Hu *et al*., 2015). Dentre as transições analisadas, toma-se a de maior sinal como par de massas de quantificação. A segunda com maior sinal toma-se como par de massas de confirmação.

O padrão de ametoctradina analítico foi inserido na mistura utilizada na curva de calibração em solvente (CCS) da rotina. Amostras TM de cada matriz foram fortificadas no nível do limite de quantificação. A validação da adição da molécula dentro do método foi feita analisando a recuperação deste QC observada no resultado, que não deve superar uma variação de 40% do nível fortificado.

A quantificação foi realizada através de curva de calibração em solvente nos níveis de 0,01; 0,1 e 0,2 $mg \cdot Kg^{-1}$. Como o método multirresíduo já foi previamente validado para uma quantidade maior de pontos, 3 níveis de concentração são suficientes. O solvente utilizado foi metanol grau HPLC.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O padrão analítico da ametoctradina foi infundido no espectrômetro de massas e 2 transições foram otimizadas com sucesso. Elas estão apresentadas na tabela 2 onde o par de massas 276.2>176,0 (m/z) foi escolhido como transição de quantificação e o par de massas 276.2>149,0 (m/z) como transição de confirmação.

Tabela 2 - Transições otimizadas da ametoctradina.

Íon pai	Íon filho	Energia no cone	Energia de colisão
276,2	149,0	15	35
276,2	176,0	15	35

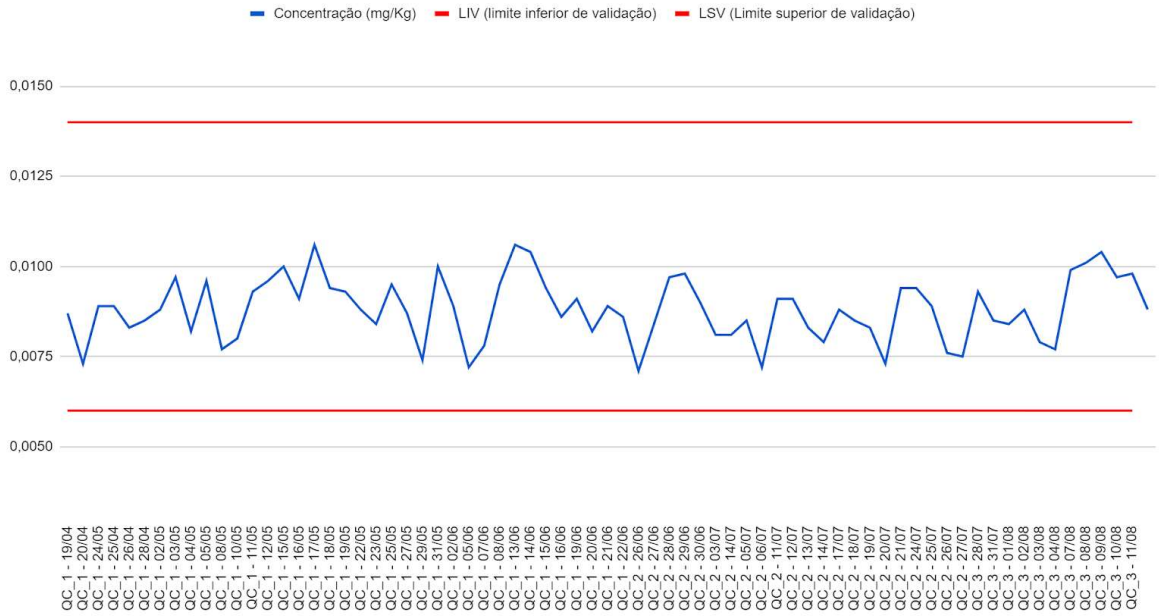
Fonte: O autor (2023).

As amostras de testemunha fortificada de cada matriz foram analisadas durante a rotina do laboratório em cada batelada de amostras. Durante o período de estudo foram extraídas e analisadas 3 amostras QC diferentes para cada matriz. Os resultados das concentrações obtidas podem ser observados nos gráficos de carta controle apresentados nas figuras 2,3 e 4 para uva, manga e feijão, respectivamente.

Pode-se notar que a recuperação das amostras controle das três matrizes não saíram da especificação em nenhum momento durante o período de estudo. A matriz que se mostrou em média mais próxima do valor real de 0,01 $mg \cdot Kg^{-1}$ foi o QC de uva, com uma concentração média de 0,0088 $mg \cdot Kg^{-1}$. Este resultado é especialmente relevante pois, por apresentar o maior LMR, a uva foi a matriz onde mais se esperava observar a ametoctradina durante o período de estudo.

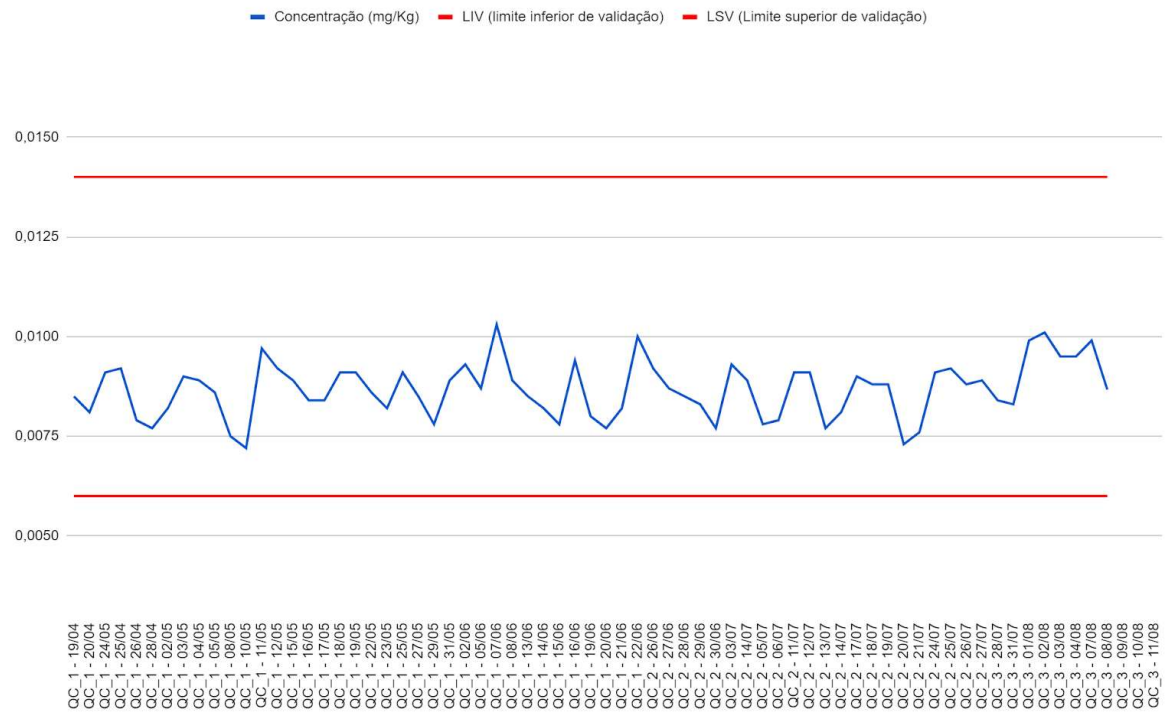
Por outro lado, o QC de feijão foi o que mais se afastou da concentração real, com uma média de 0,0082 $mg \cdot Kg^{-1}$, mas ainda se mantendo, entretanto, dentro das especificações da validação.

Figura 2 - Estudo de recuperação de amostra fortificada em matriz de uva.



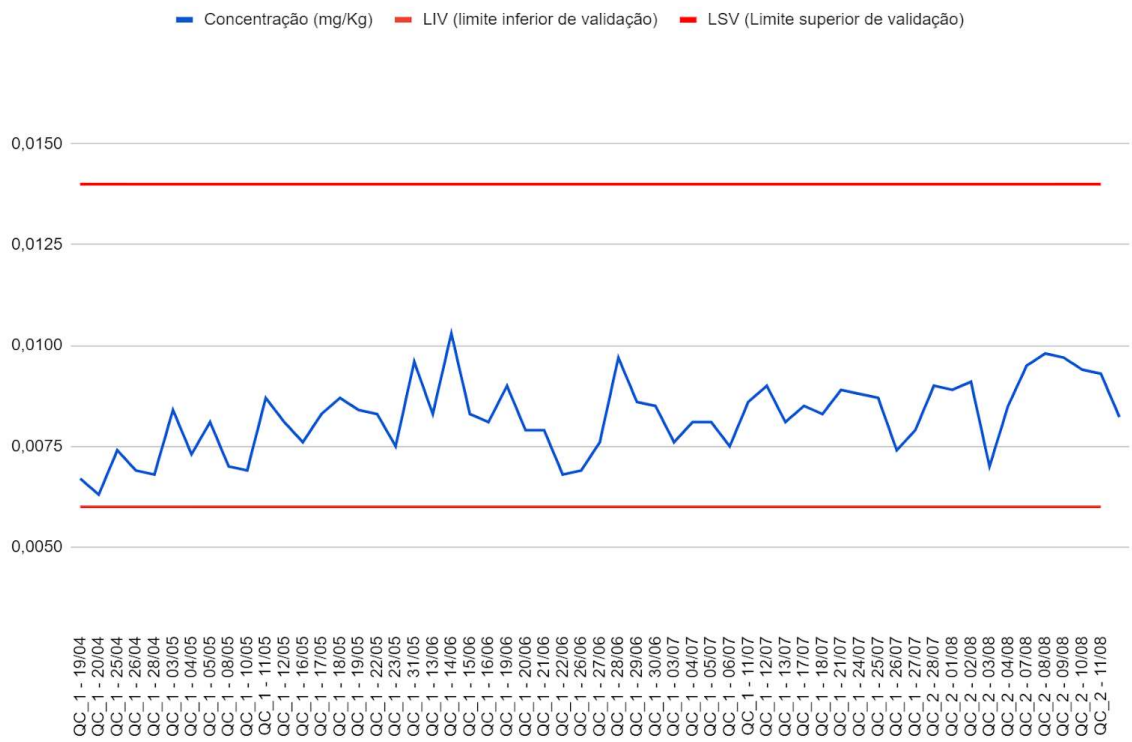
Fonte: O autor (2023).

Figura 3 - Estudo de recuperação de amostra fortificada em matriz de manga.



Fonte: O autor (2023).

Figura 4 - Estudo de recuperação de amostra fortificada em matriz de feijão.



Fonte: O autor (2023).

Tomando todos os dados de recuperação para cada matriz pode-se afirmar que não há variação maior que 20% entre os resultados analisados. Estes resultados demonstram que a adição da ametoctradina dentro do método multirresíduo do LABTOX foi validada com sucesso segundo o SANTE/12682/2019 (EURL, 2021).

É importante apontar novamente que este estudo de validação é mais reduzido apenas pois o método multirresíduo do LABTOX já é validado. Como a Ametoctradina é apenas mais uma molécula dentre quase 500, este trabalho comprovou que sua análise pode ser feita apesar da grande abrangência do método.

Apesar de não ser o foco do estudo, entretanto, os outros parâmetros de validação também foram analisados. A curva de calibração não apresentou variação maior que 10% em nenhuma das bateladas de amostras, garantindo a sensibilidade e linearidade da ametoctradina dentro do método. A partir de um ponto de calibração em matriz foi possível verificar que não há efeito matriz para a Uva, pois o ponto não apresentou variação maior que 20% da concentração real analisada na CCS. A amostra TM confirmou a seletividade da análise, pois não apresentou área maior que 30% do menor ponto de curva.

A validação *on-going* também é capaz de garantir outros pontos de interesse, como a reprodutibilidade, repetibilidade e robustez. Isso pois, ao obter uma variação menor que 20% entre os resultados da amostra fortificada em vários dias diferentes garante-se que os resultados obtidos no método podem ser reprodutíveis dentro e fora do laboratório.

Não foi observada flutuação no tempo de retenção da ametoctradina, seja nos pontos de curva ou nas amostras analisadas. As transições escolhidas apresentaram sensibilidade suficiente para confirmar o analito em amostras reais a partir da razão de íons, que manteve-se constante em todos os níveis da curva.

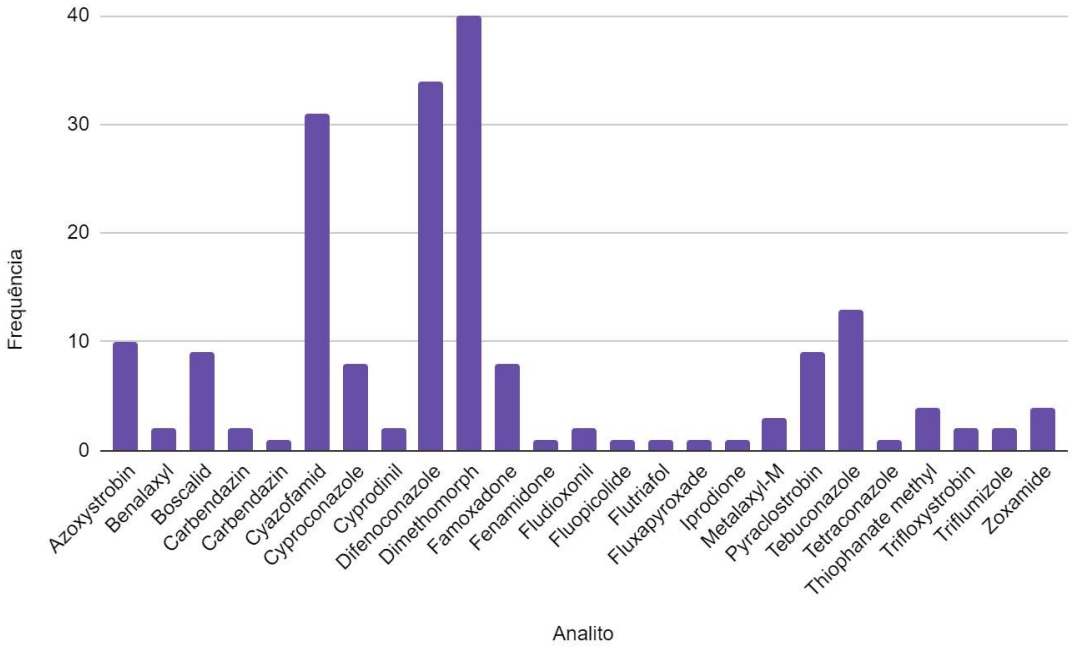
Durante o período dos estudos, 40 amostras foram positivas para a ametoctradina. Elas foram em sua grande maioria amostras de uva vindas de Petrolina, município do interior de Pernambuco. A ametoctradina também foi detectada em uma amostra de manga e outra de repolho, onde o uso é proibido. Porém, a ametoctradina só foi quantificável na amostra de repolho, onde apresentou uma concentração de 0,05 $mg \cdot Kg^{-1}$. Para as amostras de uva foi observado uma concentração média de 0,13 $mg \cdot Kg^{-1}$, que apesar de ser um número alto, condiz com o limite máximo de 5 $mg \cdot Kg^{-1}$ imposto para a matriz uva. De fato, nenhuma das amostras chegou a violar o LMR da Anvisa.

Foi feita a análise dos outros fungicidas que também foram detectados em conjunto com a ametoctradina, e os resultados de frequência podem ser vistos na figura 5. O dimetomorfe foi o analito mais observado nas amostras, estando presente em todas elas. Esse resultado é bastante coerente, já que o dimetomorfe faz parte da formulação original do defensivo desenvolvido pela empresa BASF (Merk *et al*., 2011).

Os outros dois fungicidas mais utilizados foram a Ciazofamida e o Difenoconazol, aparecendo em mais de 75% das amostras. Azoxistrobina, Boscalida, Ciproconazol, Famoxadona, Piraclostrobina e Tebuconazol também apareceram com certa frequência, o que não é surpresa, visto que são fungicidas bastante utilizados na agricultura em geral (Ding *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2022). Outros fungicidas também foram detectados, mas em uma frequência bem menor, sendo detectados em menos de 10% dos casos. Para as amostras de manga e repolho apenas a ametoctradina e o dimetomorfe foram observados.

Com esses dados foi possível notar que, na maioria das vezes, um grande número de fungicidas são utilizados em uma mesma área de plantação, indicando que os produtores se utilizam de mais de uma formulação de defensivos. Acredita-se que isso está atrelado ao fato de que os fungos estão se mostrando cada vez mais resistentes aos defensivos, demandando uma estratégia mais ampla para seu controle (Fisher *et al.*, 2018).

Figura 5 - Gráfico de frequência de fungicidas em amostras positivas para Ametoctradina.



Fonte:

O autor (2023).

5 CONCLUSÕES

A adição da ametoctradina dentro do método multirresíduo foi validada com sucesso segundo o SANTE/12682/2019. O par de massas 276.2>176,0 (m/z) foi escolhido como transição de quantificação e o par 276.2>149,0 (m/z) como transição de confirmação. Os QCs das 3 matrizes representativas utilizadas se mantiveram dentro da especificação durante todo período de estudo apresentando uma média de 0,0088 $mg \cdot Kg^{-1}$, 0,0087 $mg \cdot Kg^{-1}$ e 0,0082 $mg \cdot Kg^{-1}$ para a uva, manga e feijão, respectivamente. Além disso, a variação entre os resultados não foi maior que 20%, garantindo assim a validação.

Foi possível obter um número considerável de amostras durante o período de estudo, onde pode-se monitorar o uso da ametoctradina em Pernambuco. A ametoctradina foi encontrada em sua maioria em amostras de uva numa concentração média de 0,13 $mg \cdot Kg^{-1}$. O dimetomorfe foi observado em 100% das amostras, indicando que ele faz parte da formulação que os produtores usam na região de Petrolina. Diversos outros fungicidas também foram observados, muitas vezes vários na mesma amostra. Esses resultados apontam para uma certa resistência dos fungos, fazendo que o uso combinado de vários defensivos se torne necessário.

REFERÊNCIAS

BALKAN, T.; KARAAGAÇLI, H. **Determination of 301 pesticide residues in tropical fruits imported to Turkey using LC–MS/MS and GC-MS**. Food Control, v. 147, 2023.

BEBBER, D. P.; RAMOTOWSKI, M. A. T.; GURR, S. J. **Crop pests and pathogens move polewards in a warming world.** Nature climate change, v. 1, p. 985-988, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Instrução Normativa-IN n° 173**, Agosto de 2022.

BIBI, A.; RAFIQUE, N.; KHALID, S.; SAMAD, A.; AHAD, K.; MEHBOOB, F. **Method optimization and validation for the routine analysis of multi-class pesticide residues in Kinnow Mandarin and fruit quality evaluation.** Food Chemistry, v. 369, 2022.

CASTRO, A. E. A.; GUSMÃO, R. S.; SOUZA, D. A. G.; SA, H. P. A.; PEREIRA, R. M. S.; SANTOS, M. L. . **Surgimento e Evolução do Cromatógrafo Líquido de Ultra Alta Eficiência (UPLC), sua Aplicabilidade, Vantagens e Desvantagens**. UNICIÊNCIAS, v. 25, n. 2, p. 86–92, 2021.

DAMALE, R. D.; DUTTA, A.; SHAIKH, N.; PARDESHI, A.; SHINDE, R.; BABU, K. D.; GAIKWAD, N. N.; BANERJEE, K. **Multiresidue analysis of pesticides in four different pomegranate cultivars: Investigating matrix effect variability by GC-MS/MS and LC-MS/MS**. Food Chemistry, v. 407, p. 1-8, 2023.

DING, G.; SUN, P.; REN, D.; ZHAO, Y.; GAO, T.; FANG, Y.; GAP, X.; MA, H.; LI, W.; JIN, Z. **Terminal residue of fungicides in agro-products from north China: Assessment of human exposure potential.** Journal of Food Composition and Analysis, v. 117, 2023.

DONG, M. W. **Modern HPLC for Practicing Scientists.** John Wiley & Sons, 2016.

EURL, EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides. **Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed.** 2021.

EURL-EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides. **Quick Method for the Analysis of Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC- or IC-MS/MS Measurement.** 2023.

FISHER, M. C.; HAWKINS, N. J.; SANGLARD, D.; GURR, S. J. **Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security.** Science, v. 360, p. 6390, 2018.

FISHER, M. C.; HENK, D. A.; BRIGGS, C. J.; BROWNTEIN, J. S.; MADOFF, L. C.; MCCRAW, S. L.; GURR, S. J. **Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health.** Nature, v. 484, p. 186-194, 2012.

GREAVES, J.; ROBOZ, J.; **Mass Spectrometry for the Novice.** 1. ed., CRC Press, 2013.

HERGUETA, M. E. C.; RODRÍGUEZ, E. L.; RUIZ, R. L.; GONZÁLEZ, R. R.; FRENICH, A. G. **Targeted and untargeted analysis of triazole fungicides and their metabolites in fruits and vegetables by UHPLC-orbitrap-MS.** Food Chemistry, v. 368, 2022.

HOFFMANN, E. De; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications.** 3. ed., Wiley-Interscience, 2013.

HU, M.; LIU, X.; DONG, F.; XU, J.; LI, S.; XU, H.; ZHENG, Y. **Determination of ametoctradin residue in fruits and vegetables by modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry**. Food Chemistry. v. 175, p. 395-400, 2015.

LEE, J.; SHIN, Y.; LEE, J.; LEE, J.; LEE, J.; KIM, B. J.; KIM, J. H. **Simultaneous analysis of 310 pesticide multiresidues using UHPLC-MS/MS in brown rice, orange, and spinach**. Chemosphere, v. 207, p. 519-526, 2018.

MERK, M; GOLD, R.E; SCHIFFER, H; LEVY, T; FRECHEN, T; SARAMAGO, J. **INITIUM (R): A New Innovative Fungicide of a New Chemical Class for the Control of Late Blight and Downy Mildew Diseases**. XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on Plant Protection, v. 917, p. 143–148, 2011.

MERONE, G. M.; TARTAGLIA, A.; ROSSI, S.; SANTAVENERE, F.; BASSOTTI, E.; D'OVIDIO, C.; ROSATO, E.; GRAZIA, U.; LOCATELLI, M.; BOCCIO, P.; SAVINI, F. **Fast LC–MS/MS screening method for the evaluation of drugs, illicit drugs, and other compounds in biological matrices.** Talanta Open, v. 5, 2022.

MOZZAQUATRO, J. O.; CÉSAR, I. A.; PINHEIRO, A. E. B.; CALDAS, E. D. **Pesticide residues analysis in passion fruit and its processed products by LC–MS/MS and GC–MS/MS: Method validation, processing factors and dietary risk assessment**. Food Chemistry, v. 375, 2022.

PARK, E.; LEE, J.; LEE, J.; LEE, J.; LEE, H. S.; SHIN, Y.; KIM, J. H. **Method for the simultaneous analysis of 300 pesticide residues in hair by LC-MS/MS and GC-MS/MS, and its application to biomonitoring of agricultural workers**. Chemosphere, v. 277, 2021.

PATEL, N.; DESAI, P.; PATEL, N.; JHA, A.; GAUTAM, H. K. **Agronanotechnology for Plant Fungal Disease Management: A Review.** International journal of current microbiology and applied sciences. v. 3, p. 71-84, 2014.

SÁNCHEZ, L. M.; JESÚS, F.; FERRER, C.; RAMOS, M. M. G.; ALBA, A. F. **Evaluation of automated clean-up for large scope pesticide multiresidue analysis by liquid chromatography coupled to mass spectrometry**. Journal of Chromatography A, v. 1694, 2023.

SAVARY, S.; WILLOCQUET, L.; PETHYBRIDGE, S. J.; ESKER, P.; MCROBERTS, N.; NELSON, A. **The global burden of pathogens and pests on major food crops.** Nature ecology & evolution, v. 3, p. 430-439, 2019.

SHINDE, R.; PARDESHI, A.; DHANSHETTY, M.; ANASTASSIADES, M.; BANERJEE, K. **Development and validation of an analytical method for the multiresidue analysis of pesticides in sesame seeds using liquid- and gas chromatography with tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1652, 2021.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND. J. J. **Introduction to Modern Liquid Chromatography.** 3. ed., John Wiley & Sons Inc., 2009.

STEINBERG, G.; GURR, S. J. **Fungi, fungicide discovery and global food security.** Fungal Genetics and Biology, v. 144, 2020.

United States Pharmacopeia (USP). **Validation of Compendial Methods**. Capítulo 1225, 2020.

TARIFA, N, M. V.; VALVERDE, R. S.; TORRES, E. H.; VIDAL, J. L. M.; FRENICH, A G.. **Development and full validation of a multiresidue method for the analysis of a wide range of pesticides in processed fruit by UHPLC-MS/MS**. Food Chemistry, v. 315, 2020.

YADAV, I. C.; DEVI, N. L. **Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment.** v. 6, p. 140-158, 2017.

ZHAO, H.; LI, M.; LIU, X.; YANG, J.; LI, X.; CHEN, J.; DAI, X.; GANDARA, J. S.; KONG, Z.; LI, Z. **Simultaneous determination of succinate-dehydrogenase-inhibitor fungicide traces in cereals by QuEChERS preparation and UPLC-MS/MS analysis.** Food and chemistry**.** v. 396, 2022.