

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CERRO LARGO
CURSO DE QUÍMICA LICENCIATURA

RAFAELA BIEGER MUENCHEN

**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETECÇÃO
DE AGROTÓXICOS NO LEITE PRODUZIDO EM SALVADOR DAS MISSÕES/RS**

CERRO LARGO

2023

RAFAELA BIEGER MUENCHEN

**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETECÇÃO
DE AGROTÓXICOS NO LEITE PRODUZIDO EM SALVADOR DAS MISSÕES/RS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química Licenciatura da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de licenciada em Química

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Liziara da Costa Cabrera

CERRO LARGO

2023

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Muenchen, Rafaela Bieger

VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETECÇÃO DE AGROTÓXICOS NO LEITE PRODUZIDO EM SALVADOR
DAS MISSÕES-RS / Rafaela Bieger Muenchen. -- 2023.

33 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Licenciatura em Química, Cerro Largo, RS, 2023.

1. Química analítica Agrotóxicos. Leite. I
Liziara da Costa Cabrera, orient. II

Universidade Federal da Fronteira Sul. III

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).


RAFAELA BIEGER MUENCHEN

**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETECÇÃO
DE AGROTÓXICOS NO LEITE PRODUZIDO EM SALVADOR DAS MISSÕES-RS**

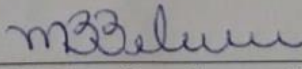
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química Licenciatura da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Licenciada em Química.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 28/02/2023

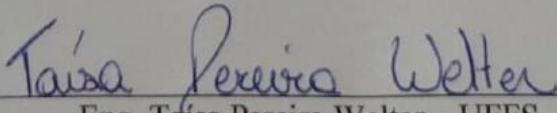
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Liziara da Costa Cabrera – UFFS
Orientadora



Profª Drª Mariana Boneberger Behm – UFFS
Avaliador



Eng. Taísa Pereira Welter – UFFS
Avaliador

Dedico esse trabalho a minha família
que sempre esteve comigo
em todos os momentos.
Meu alicerce, meu ponto de paz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar e iluminar sempre, e ao universo por toda energia depositada em mim durante todo esse processo de formação acadêmica.

Sou grata a minha família por estar em todos os momentos comigo me apoiando e sendo o suporte necessário e imprescindível para seguir em frente e enfrentar os obstáculos da vida.

Agradeço ao meu companheiro de vida Alex pelo crescimento e cuidado diário. Pelos momentos de paciência e também pelo carinho nos momentos que mais preciso.

Um agradecimento aos amigos que foram muito importantes nos momentos de lazer e descontração, em especial a minha amiga e cunhada Márcia pela ajuda nas coletas de todas as amostras utilizadas na aplicação do método validado no presente trabalho.

Aos colegas e técnicos do laboratório 107 da UFFS pela ajuda e ensinamentos necessários para a realização do procedimento experimental.

A professora orientadora Liziara da Costa Cabrera por toda paciência e tempo dedicado a mim, bem como por aceitar desenvolver esse trabalho junto comigo e na minha cidade natal. Agradeço também pelas explicações e ensinamentos necessários para o desenvolvimento do trabalho como um todo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Limites aceitos estabelecidos pela PLNQ	18
Tabela 3-Propriedades dos agrotóxicos	23
Tabela 4-Gradiente de eluição da fase móvel.....	24
Tabela 5- Testes de otimização método	27
Tabela 6-Dados de exatidão (em % recuperação) e precisão (em termos de desvio padrão relativo- RSD) do método dia 01	28
Tabela 7-Dados de exatidão (em % recuperação) e precisão (em termos de desvio padrão relativo- RSD) do método dia 02.....	28
Tabela 8- Efeito matriz e lineariedade do método.....	29

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Trabalhos que investigaram agrotóxicos no leite.....	19
--	----

LISTA DE SIGLAS

EMATER	Empresa de assistência técnica
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrometria de massas, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
Koc	Coefficiente de Partição de Adsorção
Kow	Coefficiente de Partição Octanol-Água
LC-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de massas, do inglês <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i>
LQm	Limite de Quantificação do Método
<LOQ	Inferior ao Limite de Quantificação do Método
PNLQ	Plano Nacional de Qualidade do Leite
RS	Rio Grande do Sul
REC	Recuperação
RSD	Desvio padrão relativo
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mapa ilustrativo do município de Salvador das Missões	22
Figura 2- Curvas de calibração na Matriz (vermelho) e no solvente (azul)	29

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE QUADROS	8
LISTA DE SIGLAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
1.2 Objetivos	16
1.2.1 Geral	16
1.2.2 Específicos	16
1.2.3 Justificativa	16
2 REVISÃO	17
2.1 Produção leiteira no estado do RS e no município de Salvador das Missões	17
2.2 Controle de qualidade e os agrotóxicos	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Área de estudo	22
3.2 Padrões de agrotóxicos	22
3.3 Coleta do leite	23
3.4 Preparo de amostra	23
3.5 Otimização do método	24
3.6 Método cromatográfico	24
3.7.1 Seletividade	25
3.7.2 Linearidade	25
3.7.3 Exatidão	25

3.7.4 Precisão.....	25
3.7.5 Limites de Quantificação.....	26
3.7.6 Efeito de matriz	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Otimização do método.....	27
4.2 Validação do método.....	27
4.4 Aplicação do método.....	30
5 CONCLUSÃO.....	31
6 REFERÊNCIAS	32

RESUMO

O leite é um alimento que aparece em dietas de todas as idades e é por isso que o controle de contaminação é muito importante para garantir sua qualidade. O seguinte trabalho tem como objetivo otimizar, validar e aplicar um método QuEChERS e LC-MS para determinação de resíduos de sete agrotóxicos em nove amostras de propriedades leiteiras da cidade de Salvador das Missões no noroeste do estado do Rio Grande do Sul. Sendo a pecuária leiteira e a agricultura os pilares da economia do município, esse trabalho inédito foi muito importante para determinar a qualidade do leite produzido na cidade. Primeiramente, foi realizada a otimização do método utilizando C18 na fase de limpeza e limpeza a baixa temperatura. Como não ocorreu diferença entre os processos. Se optou pelo método de limpeza com C18, afim de minimizar as etapas do processo. Na validação do método se obteve exatidão em termos de recuperação de 70 a 118% e precisão intermediária em termos de desvio padrão relativo (RSD) menores que 20 %. O resultado das amostras mostrou que em relação aos compostos monitorados, não houve contaminação. Isso pode indicar o cuidado dos agricultores com a contaminação. No entanto, salienta-se a necessidade de continuidade do trabalho, aumentando o número de amostras e ampliando o escopo de produtos monitorados.

Palavras Chave: Leite; Agrotóxicos; QuEChERS; LC-MS

ABSTRACT

Milk is a food that appears in diets of all ages and that is why contamination control is very important to guarantee its quality. The following work aims to optimize, validate and apply a QuEChERS and LC-MS method for the determination of residues of seven pesticides in nine samples from dairy farms in the city of Salvador das Missões in the northwest of the state of Rio Grande do Sul. Since dairy farming and agriculture are the pillars of the municipality's economy, this unprecedented work was very important to determine the quality of the milk produced in the city. First, the optimization of the method was carried out using C18 in the cleaning and low temperature cleaning phase. As there was no difference between the processes. The cleaning method with C18 was chosen in order to minimize the process steps. In the validation of the method, accuracy was obtained in terms of recovery from 70 to 118% and intermediate precision in terms of relative standard deviation (RSD) lower than 20%. The result of the samples showed that in relation to the monitored compounds, there was no contamination. This may indicate how careful farmers are with contamination. However, the need for work continuity is highlighted, increasing the number of samples and expanding the scope of monitored products

Keywords: Milk. Pesticides. QueChERS. LC-MS

1 INTRODUÇÃO

O leite bovino é o produto da ordenha realizada em vacas de várias raças e é uma grande fonte de proteína utilizado na alimentação de grande parte dos brasileiros. Este é um alimento muito importante na dieta humana. Seus derivados são consumidos por todos os países do mundo. A Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição ressalta que o leite e seus derivados, merecem destaque por constituírem um grupo de alimentos de grande valor nutricional, uma vez que são fontes consideráveis de proteínas de alto valor biológico, além de conterem vitaminas e minerais (NUTRIÇÃO, 2015). Assim, compreende-se a preocupação com a contaminação desse alimento é tão grande nas autoridades de saúde. Além disso, soma-se ao fato de ser um alimento muito consumido por crianças que podem ser mais suscetíveis a efeitos da contaminação.

Diversos autores têm desenvolvido trabalhos em que são monitorados agrotóxicos em leite bovino no Brasil como Silva (2016) e Bandeira (2014) e no exterior como Nemati (2022) e Hasan (2022). Esses monitoramentos detectaram em mais de 10 compostos diferentes nas amostras, como bifentrina, aldrin e imidacloprido, entre outros. Por outro lado, Rameza (2022), Nemati(2022) e Bandeira (2014) não detectaram nenhum composto. Apesar de diversos estudos encontrados na literatura da área, na região de estudo, até o momento nenhum monitoramento no leite não tinha sido desenvolvido.

Para o monitoramento dos agrotóxicos em leite, alguns autores utilizaram métodos cromatográficos de análise, como cromatografia líquida (Ramezani, *et al.*2022; Nemati, *et al.* 2022) e gasosa acoplada (Lobato, 2021; Hasan, *et al.* 2022; Yasien , *et al* 2022) a diferentes detectores dos agrotóxicos. Mas especialmente o detector de massas tem sido uma importante ferramenta (Granella, 2013). Para uma eficiência na detecção são necessários métodos de preparo de amostra, entre os vários disponíveis na literatura o método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) tem obtido destaque para amostras de alimentos, incluindo o leite como demonstrado nos trabalhos de Silva (2016) e Jeong (2012).

O presente trabalho teve como objetivo otimizar parâmetros de preparo de amostra e validar um método para monitorar agrotóxicos em leite bovino, utilizando QuEChERS acetato e determinação por LC-MS. O método foi validado para sete agrotóxicos e aplicado no leite bovino produzido em Salvador das Missões na região Missioneira do RS. Nesse município a produção leiteira é uma das principais fontes de renda, o que ressalta a importância desse tipo de estudo para a região.

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

Avaliar a qualidade do leite bovino produzido em Salvador das Missões quanto a presença de agrotóxicos, utilizando um método QuEChERS acetato e LC-MS.

1.2.2 Específicos

- Otimizar parâmetros de extração do método QuEChERS acetato;
- Validar um método cromatográfico para a determinação de sete agrotóxicos usados nas culturas locais;
- Aplicar o método em uma região para obter análises de qualidade do leite.
- Determinar o grau de contaminação das propriedades leiteiras de Salvador das Missões;
- Oferecer um retorno a comunidade de Salvador das Missões.

1.2.3 Justificativa

O município de Salvador das Missões possui muitas lavouras de plantio e tem sua economia baseada na agricultura, por isso, se faz necessário o controle de agrotóxicos presentes no leite produzido na cidade. Isso justifica o desenvolvimento do método e sua aplicação nas propriedades deste local.

2 REVISÃO

2.1 Produção leiteira no estado do RS e no município de Salvador das Missões

A produção leiteira é uma fonte de renda bastante significativa e vem crescendo com o passar dos anos. O estado do Rio Grande do Sul é o 3º maior produtor do país, contendo cerca de 13% da produção anual. A Emater destaca que, o rebanho do estado conta com 1,3 milhões de vacas, onde predomina as raças puras holandesa e Jersey, que puras ou cruzadas entre si correspondem a 93,6% da genética presente nas propriedades leiteiras. (EMATER, acesso em jun de 2022)

O município de Salvador das Missões tem como uma das principais fontes de renda a pecuária leiteira, estando presente em mais de 25 famílias. A produção diária de aproximadamente 3.100 cabeças de gado em lactação ultrapassa os cinquenta e quatro mil litros. Sendo a produção média anual de 19.710.000.000 milhões de litros de leite dentro das propriedades do município. Este número é surpreendente, tendo em vista, a população da cidade ser pequena com menos de três mil habitantes. (INSPEÇÃO, 2022)

A cidade de Salvador das Missões tem uma grande área de extensão rural, onde as atividades agrícolas como suinocultura, bovinocultura, vitivinicultura e pecuária leiteira são os pilares da economia do município. Mais de 60% do leite produzido dentro da cidade em questão não é consumido no mesmo, sendo transportado para centrais de recolhimento da região onde entra no mercado para produção de derivados e industrializados. (INSPEÇÃO, 2022)

Na economia do município, a produção leiteira é muito importante, uma vez que uma grande quantidade de famílias depende desse trabalho para seu sustento. Atualmente, dentre as propriedades desse território pelo menos 3 têm grandes estruturas e altas produções diárias onde são produzidos em torno de 5.000 mil litros de leite por dia em 3 ordenhas (madrugada, tarde e noite) em uma só propriedade. Para isso, a demanda de funcionários acaba sendo maior que os proprietários envolvendo mais munícipes que têm sua arrecadação mensal dependente da pecuária leiteira. (INSPEÇÃO,2022).

2.2 Controle de qualidade e os agrotóxicos

Para uma produção alimentícia segura é necessário um controle de qualidade do leite feito pelo Programa Nacional de Qualidade do Leite-PNLQ criado pelo Ministério da Agricultura e Pecuária-MAPA. Este fiscaliza e avalia as características químicas, físico-químicas, controle de bactérias e contaminação por antibiótico de todo o leite entregue nos

postos de recebimento. O PNLQ garante que a legislação estabeleça a obrigação da análise do leite cru de todos os produtores rurais que forneçam leite a estabelecimentos registrados na inspeção oficial, em frequência mínima mensal, na Rede Brasileira de Laboratórios da Qualidade do Leite - RBQL, credenciada ao MAPA. Ou seja, todo o leite é avaliado antes de ser vendido e/ou usado para alguma produção alimentícia. A conservação do mesmo é feita em refrigeradores que alcançam 7 °C na propriedade rural e 10 °C no estabelecimento de recebimento de leite (BRASIL,2017). Os critérios e limites aceitos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Limites aceitos estabelecidos pela PLNQ

Características físico-químicas	Limites aceitos	Frequência de avaliação
Gordura g/100 g	No mínimo 3,0	Diário
Lactose g/100 g	Acima de 4,30	Diário
Densidade	1,028 a 1,034	Diário
Acidez	0,14 a 0,18	Diário
Proteínas g/100 g	No mínimo 2,9	Diário

Fonte: Normativa nº 76 do decreto 9.013.

A qualidade do leite também é colocada à prova quando falamos sobre os agrotóxicos, esses contaminantes podem ser facilmente encontrados no alimento por conta da alta probabilidade de contaminação existente nas fazendas e propriedades leiteiras. A contaminação pode ocorrer de diversas maneiras. O consumo de pastagem contaminada, uso de medicamentos veterinários, uso de produtos de limpeza nos currais e salas de ordenha e a contaminação do meio ambiente em geral são algumas delas. Existem muitas possibilidades de contaminação do leite e por isso, é preciso ficar muito atento a essa contaminação que ocorre muito facilmente. A fiscalização deve ser rigorosa uma vez que o próprio uso de produtos de limpeza no curral pode ser uma fonte de contaminação. A água contaminada de rios e poços que é consumida pelo gado e o uso de medicamentos são outros fatores que devem ser levados em consideração.

Isso é um fato que preocupa os habitantes da região e principalmente da cidade de Salvador das Missões uma vez que, as propriedades leiteiras estão bem próximas nas lavouras de plantio de soja, milho e trigo muito vistas nessa região e outra fonte de renda que é um pilar da economia local. Alguns produtores de leite são também agricultores acarretando em lavouras e salas de ordenha dentro da mesma propriedade.

A partir da revisão na literatura da área, percebe-se que para análise do leite são encontrados uma variedade de técnicas de preparo e determinação. Entretanto, o método

QuEChERS tem destaque, e as determinações se dividem entre Cromatografia Líquida (LC) e Cromatografia Gasosa (GC), tendo somente um trabalho, entre os pesquisados, que usou a determinação qualitativa por Cromatografia em Camada Delgada (Quadro 1).

Alguns trabalhos (Lobato, *et al.* 2021; Fagnani, *et al.* 2011) não foi especificado qual o preparo de amostra utilizado. Já o método QuEChERS foi citado por 53,8% dos trabalhos pesquisados. No entanto, ainda foi encontrado o uso da extração líquido-líquido (15,4%) e da extração sólido-líquido (7,7%) (Quadro 1). Os trabalhos foram analisados a partir do ano de 2010 conforme o quadro abaixo.

Quadro 1- Trabalhos que investigaram agrotóxicos no leite

Local	Autor, ano	Preparo de amostra	Técnica de detecção	Agrotóxico detectados	Limite de quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Bangladesh	Hasan, <i>et al.</i> 2022.	QuEChERS	GC-MS/MS	19 resíduos detectados	0,049 a 0,087	79 a 99
Paquistão	Yasien , <i>et al.</i> 2022.	Método de extração líquida	GC-MS	10 resíduos encontrados	0,01	90 a 105
Irã	Nemati, <i>et al.</i> 2022.	Extração sólido-líquido	LC-MS/MS	Nenhum	0,031 a 0,093	87 a 102
Irã	Ramezani, <i>et al.</i> 2022.	QuEChERS	LC-MS/MS e GC-ECD	Nenhum resíduo de pesticida foi determinado em todas as 36 amostras de leite pasteurizado e 8 amostras de leite em pó.	0,005 a 0,03	74 a 120
República da Coreia	Jeong, <i>et al.</i> 2012.	QuEChERS	GC-MS/MS	Detectados bifentrina, cialotrina, 2,40-DDE, 4,40-DDE, dieldrin, sulfato de endosulfan e permetrina.	0,00172 a 0,021	72 a 98
Portugal	Lobato, <i>et al.</i> 2021.		GC-ECD e GC-MS	Foi encontrado ALDRIN em uma das amostras analisadas mas abaixo dos limites máximos de resíduos.	0,012 a 0,016	77 a 99
Brasil -RS	Bandeira <i>et al.</i> 2014.	QuEChERS	GC-MS/MS	Nenhum	0,01 a 0,025	71 a 117
Brasil- RO	Pereira,	Método de	LC – MS/MS	Das 30 amostras	0,02 a 0,04	70 a 120

Local	Autor, ano	Preparo de amostra	Técnica de detecção	Agrotóxico detectados	Limite de quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
	2018.	extração líquido – líquido		analisadas, duas (6,66%) foram positivas para pelo menos um agrotóxico.		
Brasil-MG	Oliveira, 2011.	QuEChERS-acetato	LC-MS/MS	Encontrados resíduos de agrotóxicos em 347 amostras das 827 analisadas, o que representa 41,95% de contaminação.	0,01	68 a 105
Brasil-PR	Silva, 2016.	QuEChERS acetato	LC-MS/MS	Das 15 amostras de leite cru analisadas, 12 (80%) apresentaram alguma contaminação.	0,01 a 0,2	70 a 120
Brasil - RS	Granello, <i>et al.</i> 2013.	QuEChERS	LC-MS/MS	Das 56 amostras obtidas, cinco (8,9%) continham resíduos de agrotóxicos, sendo que destas, três eram amostras de leite orgânico (duas foram positivas para clomazone e uma para clorpirifós).	0,1 a 0,2	70 a 120
Brasil-PR	Fagnani, <i>et al.</i> 2011.		GC-MS	Das 30 amostras de leite analisadas, seis (20%) estavam contaminadas por resíduos de OF, cinco (16,7%) por resíduos de CB e uma amostra por ambos	*	*
Brasil- MG, PR, RS, SP	Nero, <i>et al.</i> 2007.		CCD.	De 209 amostras, em 196 foi encontrado algum resíduo.	*	*

Fonte: autora (2023)

Legenda: * Parâmetros de validação ausente; GC- cromatografia gasosa; LC-cromatografia líquida; MS- espectrometria de massas, ECD- detector por captura de elétrons; CCD-cromatografia em camada delgada. LQM- Limite de quantificação do método.

As técnicas cromatográficas, demonstradas na literatura para a determinação dos agrotóxicos em leite, apresentaram resultados satisfatórios com exatidão e precisão analítica e baixos limites de detecção (Quadro 1). Tanto a GC quando a LC, foram em sua grande maioria usadas acopladas a espectrometria de massas. A espectrometria de massas é usada com o objetivo de confirmar os resultados encontrados por cromatografia e é a técnica que melhor fornece as informações estruturais necessárias. (LANÇAS, 2009)

A importância da determinação desses contaminantes é alta pois o leite é um alimento muito consumido por todas as idades. Os níveis encontrados devem ser regulados para que o alimento não perca suas propriedades nutritivas. A recorrente presença de agrotóxicos no leite bovino, é uma preocupação constante das autoridades de saúde pública. Esse é o motivo para grande parte dos países ter leis que limitam o nível de resíduos de agrotóxicos no leite. (PRASSAD; CHHABRA, 2001)

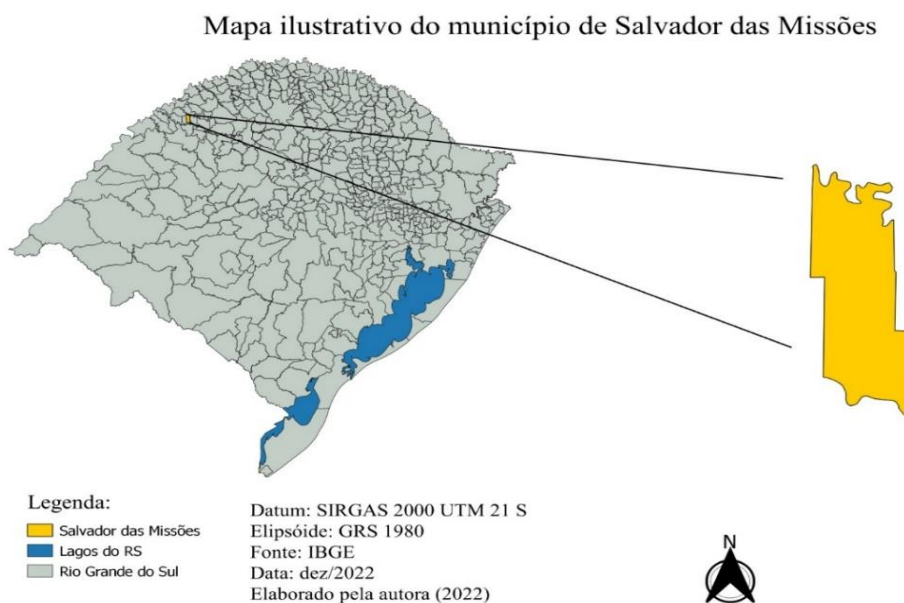
Os agrotóxicos mais encontrados e descritos nos trabalhos foram, principalmente, organoclorados, organofosforados, carbamatos entre outras classes. Alguns dos mais encontrados foram: bifentrina, cialotrina, 2,40-DDE, 4,40-DDE, dieldrin, sulfato de endosulfan, permetrina, 2,40-DDT, 4,40-DDT, aldrin, profenofos, triazophos dimetoato, clomazone, monocrotofós, clorpirifós, carbofuran, cipermetrina, nicarbazin e trimetoprima (Tabela 2). Alguns trabalhos como Fagnani (2011) também citaram somente as classes de organofosforados e carbamatos como encontradas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

As coletas de amostra foram realizadas em 9 propriedades leiteiras localizadas na zona rural de Salvador das Missões. A quantidade de cabeças de gado em lactação e a produção diária tem uma variedade muito grande sendo coletadas amostras de vários tamanhos de propriedades e diferentes infraestruturas para a ordenha. Esse município situado na região das Missões tem sua economia local baseada na pecuária leiteira e na atividade agrícola com a produção de grãos, sediando uma das cooperativas mais sólidas da região que faz o recolhimento de ambos.

Figura 1- Mapa ilustrativo do município de Salvador das Missões



Fonte: autora (2023)

3.2 Padrões de agrotóxicos

Foram monitorados s7 agrotóxicos no leite (Tabela 2): atrazina, piraclostrobina, epoxiconazol, ciproconazol, trifloxistrobina, tebuconazol e propiconazol. Destes, a maioria dos escolhidos foram fungicidas pelo período de coleta ter sido na safra do milho onde os mesmos

são os mais usados, além da atrazina que também tem um uso muito grande na região. Dentre os mais usados no município, foram selecionados os que possuíam constante água ultra pura (A) e Metanol (B) positiva e estavam disponíveis no laboratório da universidade (Tabela 2).

Tabela 2-Propriedades dos agrotóxicos

Agrotóxico	Classe	Log K _{ow}	m/z modo +	tr
Atrazina	Herbicida	2,7	216	7,78
Piraclostrobina	Fungicida	3,9	388	9,58
Trifloxistrobina	Fungicida	4,5	409	9,78
Epoxiconazol	Fungicida	3,3	330	9,00
Tebuconazol	Fungicida	3,7	308	9,38
Propiconazol	Fungicida	3,7	342	9,45
Ciproconazol	Fungicida	3,9	292	8,85

Legenda: K_{ow} – constante octanol-água, m/z -razão massa-carga; tr-tempo de retenção

3.3 Coleta do leite

Para a validação e otimização do método foi utilizado leite comercial tipo UHT de mesma marca em todos os testes e a aplicação do método se deu nas nove coletas realizadas nas propriedades de Salvador das Missões. Todas as amostras foram coletadas na tarde do dia 12 de dezembro de 2022 e guardadas na geladeira até o dia 13 pela manhã, quando foram preparadas pelo método QuEChERS e logo na sequência analisadas no LC-MS.

3.4 Preparo de amostra

O preparo de amostra do foi realizado através do método QuEChERS acetato. Seguindo as seguintes etapas: Em tubos falcon foram pesados 10 g de leite comercial e foi feita a fortificação adicionando 100 µL do mix de padrões (M7) com concentração de 0,1 mg L⁻¹ preparado anteriormente. Após foi adicionado 10 mL do solvente acetonitrila acidificado a 1% com ácido acético e feita a agitação manual por 1 minuto. Em seguida, foi adicionado a mistura de sais com 4g de sulfato de magnésio (MgSO₄) e 1,7 g de acetato de sódio (C₂H₃NaO₂) e novamente agitado manualmente por 1 minuto e após em chapa de agitação por 1 minuto. A amostra foi centrifugada 8 minutos a 5 °C em rotação 1590. Para a etapa de limpeza (*clean up*) foi transferido 3 mL do sobrenadante para um tubo falcon de 15 mL que já continha 200 mg de C18 e 300 mg de MgSO₄ previamente pesado, novamente houve agitação manual e em chapa

de agitação e centrifugado as mesmas condições. O extrato final foi filtrado com membrana de 0,25 µm e transferida para tubos vials que foram injetados no LC-MS disponível no laboratório.

3.5 Otimização do método

O método foi otimizado através de três testes (T1, T2 e T3). Em T1, as amostras do leite UHT passaram pelo método QuEChERS acetato sem etapa de limpeza com C18 e foram congeladas por 12 horas (*overnight*). Em T2 foi usado o mesmo procedimento (QuEChERS acetato), e foi usado C18 combinado com o sulfato de magnésio sem congelamento. Por fim, no terceiro teste (T3) foi realizado além de todo o procedimento anterior (C18+sulfato de magnésio) o congelamento *overnight*.

3.6 Método cromatográfico

Utilizou-se o Cromatógrafo Líquido Shimadzu LC-MS 2020, que possui uma fonte de Ionização por Electrosprav (ESI), um analisador de massa do tipo quádruplo e um sistema de aquisição de dados LabSolutions®. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna analítica InfiniyLab Poroshell 120 EC-C18 3 x 50mm, 2.7 µm (Agilent®). Estabilizou-se em 30 °C o forno da coluna, e a fase móvel foi composta por água ultrapura (A) e metanol (B), ambos foram acidificados com ácido fórmico grau HPLC a 0,1% e formiato de amônio de 5 mmol L⁻¹, com eluição gradiente conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 3-Gradiente de eluição da fase móvel

Tempo de análise (min)	%A	%B
0,01	90	10
0,25	90	10
2	52	48
8	0	100
9	0	100
11	90	10
13	Parada	

Fonte: autora (2022)

3.7 Validação do método

Para a validação do método foi repetido o processo de otimização para seis concentrações diferentes do padrão: 0,05, 0,025, 0,01, 0,005 e 0,0025 mg L⁻¹.

3.7.1 Seletividade

Para avaliar a seletividade do método foram utilizadas amostras brancas durante todos os processos de quantificação.

3.7.2 Linearidade

Para garantir a linearidade do método, foi construída uma curva de calibração em solvente metanol com pelo menos cinco pontos distintos, onde o eixo x corresponde a diferentes concentrações do padrão e o eixo y representa o sinal resultante de cada concentração em unidades de área. Através das curvas de calibração foram calculados os coeficientes de correlação e de determinação (Re R²).

3.7.3 Exatidão

Referente à exatidão, foram realizadas fortificações das amostras em 5 níveis de concentração de 2,5-100 µg kg⁻¹ e empregado o método proposto, comparando com concentração obtida nos padrões. Os valores obtidos devem estar na faixa de 70 a 120%, para o método ser aceito como exato. A recuperação é calculada conforme a equação 1.

$$\text{Equação 1} - R(\%) = C1 - \frac{C2}{C3} \times 100$$

Onde: C1 = concentração determinada após a fortificação

C2 = concentração determinada na amostra não fortificada (branco)

C3 = concentração esperada para o nível de fortificação

3.7.4 Precisão

A precisão do método foi obtida através da repetibilidade dos experimentos e expresso em Desvio Padrão Relativo - RSD, que corresponde a repetibilidade do experimento no mesmo dia e em dois dias seguidos. A precisão é calculada conforme a equação 2.

$$\text{Equação 2} - RSD (\%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

Onde: s = estimativa do desvio padrão absoluto;
 X_m = média de uma série de medidas (replicatas).

3.7.5 Limites de Quantificação

Como os agrotóxicos estão presentes a níveis de traços, ou seja, ng ou μg , para verificar quais níveis mínimos de concentração o método foi capaz de quantificar, foram preparadas amostras com fortificações em diferentes concentrações em (2,5; 5; 10; 25 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Foi considerado limite de quantificação quando a relação sinal ruído é maior 10 vezes e a recuperação entre 70-120% e RSD menor que 20.

3.7.6 Efeito de matriz

Para efeito de matriz foram construídas duas curvas de calibração para cada composto. Uma curva construída através da diluição sucessiva do padrão no solvente (acetonitrila) e outra no extrato do leite, obtido através do método QuEChERS.

As duas curvas foram plotadas no Excel e comparados os coeficientes lineares conforme a equação 3.

$$\text{Equação 3} - EM (\%) = X^1 - \frac{x^2}{x^1} \times 100$$

Onde: κ_1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em extrato do leite (matriz);

κ_2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em acetonitrila (solvente).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do método

Tabela 4- Testes de otimização método

Agrotóxicos	Teste 1- Overnight		Teste 2- C18		Teste 3- C18+overnight	
	REC	RSD	REC	RSD	REC	RSD
Atrazina	95	0,4	107	11,3	104	3,5
Ciproconazol	86	3,3	98	11,2	94	3,7
Propiconazol	94	1,3	95	11,5	89	1,4
Epoxiconazol	67	1,3	70	8,5	78	4,5
Tebuconazol	94	6,6	97	12,8	90	5,3
Piraclostrobina	87	1,4	100	13,9	89	1,3
Trifloxistrobina	73	3,1	84	14,1	73	1,2

Fonte: autora (2023)

As três variações testadas (T1, T2 e T3) apresentaram recuperação e RSD dentro do estabelecido para validação de métodos em termos de exatidão e precisão relativa, ou seja de 70-120% de recuperação e RSD menor que 15%, conforme pode ser observado na Tabela 4. A única exceção foi no T1 para epoxiconazol, que foi de 67% de recuperação. Assim optou-se pelas condições testadas em T2, pois este contém menor número de etapas, uma vez que o congelamento não demonstrou vantagem na limpeza da amostra (Tabela 4).

4.2 Validação do método

O método apresentou boa seletividade aparecendo somente o analito no tempo de retenção sem outros interferentes e a curva de calibração confirmou a linearidade do método 7 apresentando coeficiente de correlação (r) e determinação (r^2) acima de 0,99 para os compostos.

Tabela 5-Dados de exatidão (em % recuperação) e precisão (em termos de desvio padrão relativo- RSD) do método dia 01

Agrotóxico	5 $\mu\text{g kg}^{-1}$		10 $\mu\text{g kg}^{-1}$		25 $\mu\text{g kg}^{-1}$		50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
	REC	RSD	REC	RSD	REC	RSD	REC	RSD
Atrazina	93	10	93	7	94	9	108	6
Ciproconazol	72	11	75	14	71	3	86	7
Propiconazol	81	3	87	5	90	3	97	9
Epoxiconazol	50	19	79	17	89	8	106	3
Tebuconazol	118	16	92	12	95	7	97	4
Piraclostrobina	70	2	75	4	83	4	100	3
Trifloxistrobina	91	9	71	6	77	9	91	4

Fonte: autora (2023)

Tabela 6-Dados de exatidão (em % recuperação) e precisão (em termos de desvio padrão relativo- RSD) do método dia 02.

Agrotóxico	5 $\mu\text{g kg}^{-1}$		10 $\mu\text{g kg}^{-1}$		25 $\mu\text{g kg}^{-1}$		50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
	REC	RSD	REC	RSD	REC	RSD	REC	RSD
Atrazina	88	7	76	10	83	13	77	7
Ciproconazol	62	14	73	19	106	12	79	9
Propiconazol	71	2	73	0,1	90	11	90	8
Epoxiconazol	71	13	82	12	73	12	71	7
Tebuconazol	71	3	95	0,1	103	9	94	12
Piraclostrobina	70	5	70	7	85	7	80	4
Trifloxistrobina	71	8	70	14	75	13	71	6

Fonte: autora (2023)

A exatidão medida em termos de recuperação (%) obteve valores de 70-120% para maioria dos compostos, nos 4 níveis testados. Assim também foi demonstrado para o desvio padrão relativo medido *intraday* e *interdays* (todos menores que 20%). A exceção foi o epoxiconazol no dia 01, o qual apresentou uma baixa recuperação (50%) e o ciproconazol no dia 02 com recuperação de 62% (Tabela 5). Assim o limite de quantificação do método ficou igual a 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para 6 compostos e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para epoxiconazol e ciproconazol.

4.3 Efeito matriz

Para os sete compostos foi observado efeito matriz nulo a médio com 33% de supressão (Tabela 7) (Economou, 2009). No entanto, se observado a figura 1, pode ser verificado que nas concentrações mais altas não sobreposição das retas. Os valores de coeficiente angular

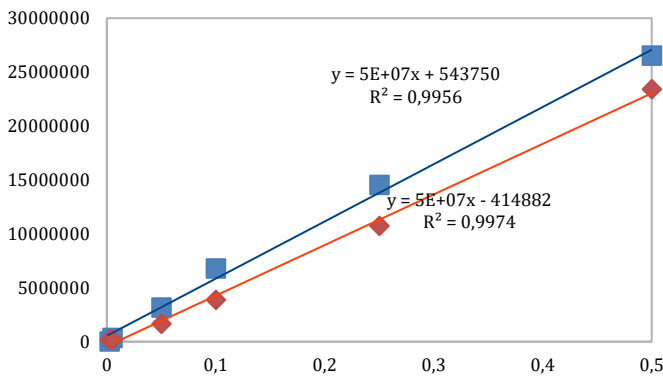
provavelmente sofreram um arredondamento no Excel. Por esse fato sugere-se que a quantificação dos compostos seja realizada em uma curva na matriz.

Tabela 7-: Efeito matriz e linearidade do método

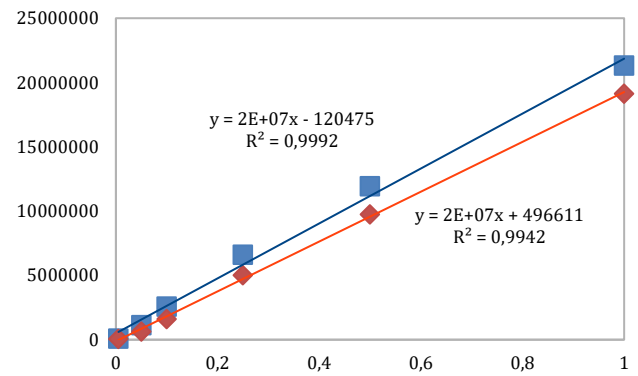
Agrotóxico	Efeito matriz (%) Equação 3	R ² (matriz)
Atrazina	Sem efeito	0,9974
Ciproconazol	-33 (supressão)	0,9973
Propiconazol	Sem efeito	0,9946
Epoxiconazol	Sem efeito	0,9942
Tebuconazol	-33 (supressão)	0,9973
Piraclostrobina	-33 (supressão)	0,9915
Trifloxistrobina	Sem efeito	0,9951

Fonte: autora (2023)

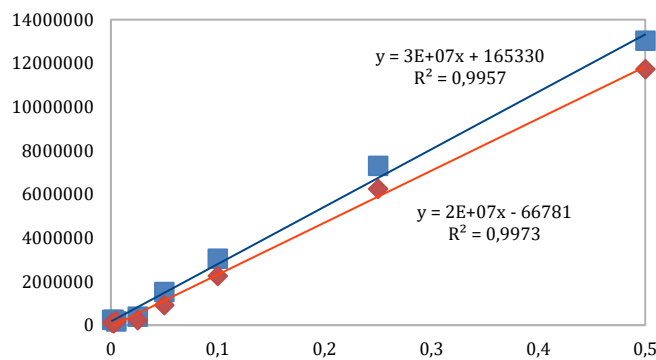
Figura 2-: Curvas de calibração na Matriz (vermelho) e no solvente (azul)



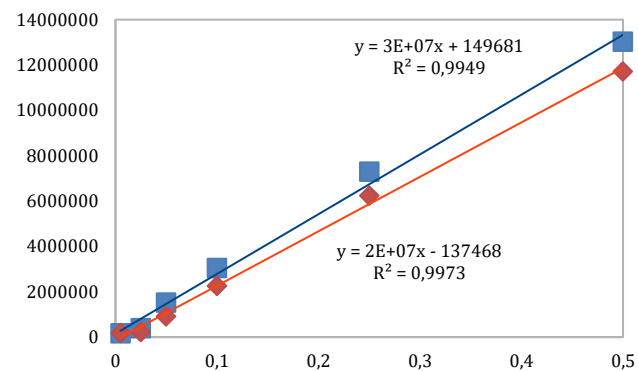
A- atrazina



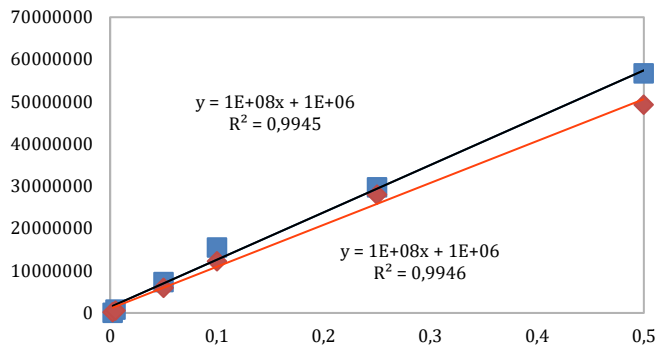
B- epoxiconazol



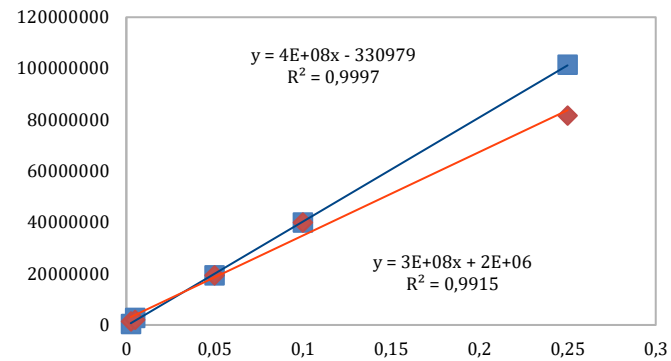
C - ciproconazol



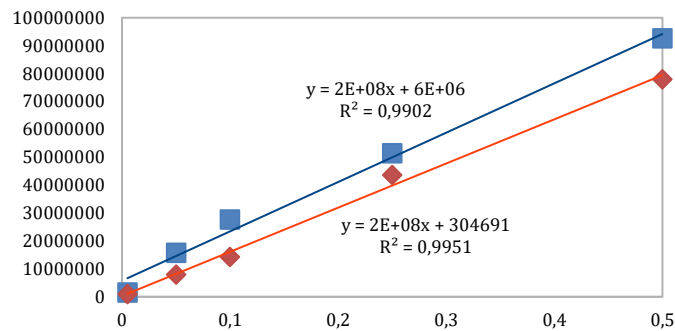
D- tebuconazol



E- propiconazol



F- piraclostrobina



G- trifloxtrobina

4.4 Aplicação do método

O método validado foi aplicado em nove amostras coletadas no município de Salvador das Missões. Após o preparo da amostra QuEChERS as amostras foram injetadas no HPLC e os resultados foram negativos. Ou seja, não houve contaminação dos sete agrotóxicos analisados em nenhum dos nove produtores em que as amostras foram coletadas, isso também aconteceu nos trabalhos de Rameza (2022), Nematí (2022) e Bandeira (2014) que não detectaram nenhum resíduo analisado em seus trabalhos.

Portanto, mesmo havendo grande diferença no trato dos animais e na estrutura das ordenhas todo o leite da cidade tem boa qualidade, fato este que vai contra o que citou Oliveira em (2016) mostrando além da determinação dos contaminantes, os fatores que contribuem para que os mesmos sejam encontrados no leite. Um dos principais pontos citados no artigo é a influência econômica e de produção elevada, locais com maior número de vacas e de produção mais elevada apresentam maior frequência de contaminação. O que não ocorreu no município em questão pois a distinção entre a produção diária em litros dos produtores abrangidos pelo trabalho passa dos 2 mil litros diários, tendo produtores com produção de 250 L a 4 mil litros por dia e mesmo assim nenhum apresentou contaminação quanto aos compostos monitorados.

5 CONCLUSÃO

O trabalho foi de grande valia uma vez que é inédito dentro do município de Salvador das Missões e é muito importante que seja realizado esse monitoramento nas propriedades leiteiras por ser um município com grande parte da sua extensão dominado pelas lavouras. Os próprios pecuaristas leiteiros têm dentro de sua propriedade muito próximo dos locais da ordenha lavouras de plantio destinada a alimentação de seus animais. Tendo em vista isso, se faz necessária a análise do leite para o controle da qualidade e contaminação.

Os resultados das análises tranquilizam a comunidade quando se leva em conta que os resultados foram negativos para os 7 agrotóxicos analisados. A coleta foi feita na safra do trigo e os agrotóxicos escolhidos foram os mais usados nesse plantio. É importante salientar que esse tipo de estudo seja feito em diversos períodos de plantio, porque os compostos usados são diferentes para cada espécie como soja e trigo que são muito plantados no município em questão. Também vale ressaltar que é preciso expandir o escopo de compostos analisados visando uma abrangência de todos os tipos de cultivo da região em todas épocas do ano.

Sendo o leite um alimento muito importante para a saúde e alimentação humana, o monitoramento dos agrotóxicos é necessário para prevenir possíveis doenças causadas por essa contaminação. Tendo em vista isso, esse trabalho foi muito importante para levar um estudo diferenciado a comunidade de Salvador das Missões. Logo que obtemos os resultados os produtores do município foram avisados que não houve contaminação dos agrotóxicos analisados, promovendo assim um retorno para a comunidade.

6 REFERÊNCIAS

- BANDEIRA, Danieli Daiani et al. Determinação de resíduos de agrotóxicos em leite bovino empregando método QuEChERS modificado e GC-MS/MS. **Química Nova**, v. 37, p. 900-907, 2014.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa n. 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal – PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel- PCRM, Leite - PCRL e Pescado - PCRP. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, p. 213, 22 dez. 1999.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, p.13, 29 set. 2002.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa 62 de 29 de dezembro de 2011. Dispõe sobre regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte do leite. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, 30 dez. 2011.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, p. 8, 14 dez. 2006.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Estabelece parâmetros do Plano Nacional de Qualidade do leite. Diário Oficial da União, Brasília, 29 mar. 2017.
- BRITO, José Renaldi Feitosa; BRITO, Maria Aparecida VP. **Qualidade higiênica do leite**. Juiz de Fora-MG. EMBRAPA-CNPGL-ADT, 17p (EMBRAPA-CNPGL Documentos, 62). Set- 1998. ISSN 0101-0581
- ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S.; TSIPI, D. **Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. Journal of Chromatography A, v. 1216, n.31, p. 5856-5867, 2009. Embrapa: Caderno técnico n.62, 1998.
- FAGNANI, Rafael et al. Organophosphorus and carbamates residues in milk and feedstuff supplied to dairy cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 598-602, 2011.
- GRANELLA, Vanusa et al. Resíduos de agrotóxicos em leites pasteurizados orgânicos e convencionais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 4, p. 1731-1739, 2013.

HASAN, GMM Anwarul; DAS, Anuj Kumer; SATTER, Mohammed A. Multi residue analysis of organochlorine pesticides in fish, milk, egg and their feed by GC-MS/MS and their impact assessment on consumers health in Bangladesh. **NFS Journal**, v. 27, p. 28-35, 2022.

JEONG, In-Seek et al. Determination of pesticide residues in milk using a QuEChERS-based method developed by response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 473-481, 2012.

LOBATO, Alnilan et al. Organochlorine pesticide analysis in milk by gas-diffusion microextraction with gas chromatography-electron capture detection and confirmation by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1636, p. 461797, 2021.

NUTRIÇÃO, Sociedade brasileira de alimentação e. **A importância do consumo de leite no atual cenário brasileiro**. Diretoria 2013-2015. 27p. 2015.

OLIVEIRA, Fabiano Aurélio da Silva. **Resíduos de agrotóxicos em leite cru refrigerado: validação da ampliação do escopo de método por LC-MS/MS e análise multivariada de fatores que influenciam sua ocorrência no estado de Minas Gerais**. Tese- (Doutorado em Ciência animal). Belo Horizonte. 139 p.2016 UFMG.

PEREIRA, P. C. A. **Determinação de resíduos de medicamentos veterinários e agrotóxicos em leite cru refrigerado produzido na microrregião de Cacoal - Rondônia**. Dissertação- (Mestrado em Ciências Ambientais) -Rondônia. 65p. 2018.UNIR Centro.

PRASSAD, K. S. N.; CHHABRA, A. Organochlorine pesticide residues in animal feeds and fodders. **Indian Journal of Animal Science**, v. 71, n. 12, p. 1178–1180, 2001.

RAMEZANI, Sara et al. **Determination of multi-class pesticides residues of cow and human milk samples from Iran using UHPLC-MS/MS and GC-ECD: A probabilistic health risk assessment**. **Environmental Research**, v. 208, p. 112730, 2022.

SILVA, Edenilson da. **Levantamento de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários no leite bovino em cidades do sudoeste do paraná**. Trabalho de conclusão de curso – (Graduação em Química licenciatura). Realeza. 25p. 2016 UFFS.

YASIEN, Sara et al. Quantification of multi-class pesticides in stomach contents and milk by gas chromatography–mass spectrometry with liquid extraction method. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 7, p. 103937, 2022.