

## Método Analítico Multirresíduo para Determinação de Inseticidas no Bicho-da-Seda (*Bombyx mori* L.)



OBJETIVOS DE  
DESENVOLVIMENTO  
SUSTENTÁVEL

2 FOME ZERO  
E AGRICULTURA  
SUSTENTÁVEL





**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Agropecuária Oeste  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
89**

**Método Analítico Multirresíduo para  
Determinação de Inseticidas no  
Bicho-da-Seda (*Bombyx mori* L.)**

*Rômulo Penna Scorza Júnior  
Irzo Isaac Rosa Portilho*

**Embrapa Agropecuária Oeste**  
Dourados, MS  
2021

**Embrapa Agropecuária Oeste**  
BR 163, km 253,6  
Trecho Dourados-Caarapó  
79804-970 Dourados, MS  
Caixa Postal 449  
Fone: (67) 3416-9700  
www.embrapa.br/  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações  
da Unidade

Presidente  
*Walder Antonio Gomes de Albuquerque Nunes*

Secretária-Executiva  
*Silvia Mara Belloni*

Membros  
*Alexandre Dinnys Roese, Auro Akio Otsubo,  
Claudio Lazzarotto, Danilton Luiz Flumignan,  
Eliete do Nascimento Ferreira, Guilherme  
Lafourcade Asmus, José Rubens Almeida  
Leme Filho, Marciana Retore e Tarcila Souza  
de Castro Silva*

Supervisão editorial  
*Eliete do Nascimento Ferreira*

Revisão de texto  
*Eliete do Nascimento Ferreira*

Normalização bibliográfica  
*Silvia Mara Belloni*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Eliete do Nascimento Ferreira*

Fotos da capa  
*Rômulo Penna Scorza Júnior*

**1ª edição**  
E-book (2021)

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Agropecuária Oeste

---

Scorza Júnior, Rômulo Penna

Método analítico multirresíduo para determinação de inseticidas no  
bicho-da-seda (*Bombix mori* L.) / Rômulo Penna Scorza Júnior, Irzo  
Isaac Rosa Portilho. - Dourados, MS : Embrapa Agropecuária Oeste,  
2021.

30 p. : il. color. ; 16 x 22 cm. — (Boletim de Pesquisa e  
Desenvolvimento / Embrapa Agropecuária Oeste, ISSN 1679-0456 ;  
89).

1. Monitoramento ambiental – Agrotóxico. 2. Bicho-da-seda. 3.  
Sericultura. 4. *Bombix mori* L.. I. Portilho, Irzo Isaac Rosa Portilho. II.  
Embrapa Agropecuária Oeste. III. Título. IV. Série.

## Sumário

---

Resumo .....	5
Abstract .....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos .....	8
Resultados e Discussão.....	16
Conclusões .....	28
Agradecimentos.....	28
Referências.....	29



# Método Analítico Multirresíduo para Determinação de Inseticidas no Bicho-da-Seda (*Bombyx mori* L.)

Rômulo Penna Scorza Júnior<sup>1</sup>

Irzo Isaac Rosa Portilho<sup>2</sup>

**Resumo** – Diante dos crescentes relatos de perdas de produção na sericultura pela intoxicação e morte do bicho-da-seda por inseticidas aplicados em áreas adjacentes aos sericultores, torna-se importante a realização de estudos de monitoramento para caracterizar a problemática como subsídio para ações futuras na proposição de soluções. No entanto, para trabalhos de monitoramento, é fundamental possuir um método analítico confiável e validado no laboratório para a matriz alvo. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a validação de um método analítico multirresíduo para identificação e quantificação de 26 inseticidas e produtos de degradação em amostras de bicho-da-seda, utilizando o protocolo QuEChERS e cromatografia líquida de ultraperformance acoplada à espectrometria de massas. Os parâmetros para validação do método foram seletividade, linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e recuperação. Observou-se efeito matriz com supressão de resposta entre -8% e -88% para os compostos analisados, requerendo assim a construção das curvas de calibração na matriz e obtendo-se valores de  $R^2$  superiores a 0,99. Os valores de recuperação variaram de 73% a 118%, com precisão inferior a 20%. Os valores de LQ variaram de 1,35 ng g<sup>-1</sup> a 2,70 ng g<sup>-1</sup>, considerados satisfatórios para estudos de monitoramento do bicho-da-seda.

**Termos para indexação:** agrotóxicos; sericultura; monitoramento ambiental; QuEChERS.

---

<sup>1</sup> Engenheiro-agrônomo, doutor em Ciências Ambientais, pesquisador da Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS.

<sup>2</sup> Biólogo, doutor em Recursos Naturais, bolsista de Inovação Tecnológica da Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS.

## Multiresidue Analytical Method for Determination of Insecticides in Silkworm (*Bombyx mori* L.)

**Abstract** – In view of the growing reports of production losses in sericulture due to the intoxication and death of silkworms by insecticides applied in areas adjacent to sericulturists, it is important to carry out monitoring studies to characterize the problem as a subsidy for future actions to propose solutions. However, for monitoring work, it is essential to have a reliable and laboratory-validated analytical method for the target matrix. This work aimed to develop and validate a multi-residue analytical method for the identification and quantification of 26 insecticides and degradation products in silkworm samples, using the QuEChERS protocol and ultraperformance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. Parameters for method validation were selectivity, linearity, working range, sensitivity, detection limit (LD), quantification limit (LQ), precision and recovery. A matrix effect was observed with response suppression between -8% and 88% for the analyzed compounds, thus requiring the construction of matrix-matched calibration curves with  $R^2$  values greater than 0.99. Recovery values ranged from 73% to 118%, with precision less than 20%. The LQ values ranged from  $1.35 \text{ ng g}^{-1}$  to  $2.70 \text{ ng g}^{-1}$ , which can be considered satisfactory for silkworm monitoring studies.

**Index terms:** pesticides; sericulture; environmental monitoring; QuEChERS.

## Introdução

---

A sericultura é uma atividade milenar com origem na China, tendo se expandido para outras regiões do mundo, inclusive ao Brasil, quando, em 1808, D. João VI introduziu as primeiras mudas de amoreira no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Atualmente, o Brasil é o sexto maior produtor de seda no mundo, atrás apenas da China, Índia, Uzbequistão, Vietnã e Tailândia (International Sericultural Commission, 2020). No entanto, o Brasil é reconhecido por ter o melhor fio de seda do mundo e exporta 97% de sua produção para mercados da Ásia e Europa. Portanto, a sericultura proporciona relevante contribuição à balança comercial brasileira.

No Brasil, a sericultura é uma atividade exercida por pequenos produtores rurais, que gera renda e emprego e, portanto, desempenha um importante papel social, pois evita a emigração da população rural para as cidades. Estima-se que essa atividade gere 20 mil empregos diretos e indiretos, durante um período de 8 a 9 meses por ano, sendo principais estados produtores o Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul (IBGE, 2020). Em Mato Grosso do Sul, os principais municípios produtores são Itaquiraí, Deodópolis, Glória de Dourados, Ivinhema, Iguatemi, Nova Alvorada do Sul e Ponta Porã.

Uma importante etapa dessa atividade compreende o cultivo da amoreira (*Morus alba*) cujas folhas servem de alimento para a criação do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). É de fundamental importância que as amoreiras sejam cultivadas em áreas distantes de outras culturas que utilizem inseticidas para o manejo de pragas, evitando assim a contaminação das folhas de amoreira devido à deriva após aplicação desses produtos. No entanto, têm sido cada vez mais frequentes relatos de perdas de produção na sericultura pela intoxicação e morte do bicho-da-seda em função da contaminação das folhas de amoreira no campo com inseticidas, provenientes de aplicações desses compostos em áreas adjacentes aos sericultores. Diante disso, é crescente a demanda por estudos de monitoramento de resíduos de inseticidas e outras classes de agrotóxicos, tanto nas folhas de amoreira como também no bicho-da-seda, com foco na identificação, confirmação e diagnóstico de possível intoxicação por inseticidas em eventos de mortalidade e perdas de produção.

Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento e a validação de um método analítico multirresíduo com 26 inseticidas e produtos de degradação, para identificação e quantificação de seus resíduos em amostras de bicho-da-seda. Para tal, utilizou-se o protocolo QuEChERS para extração e limpeza dos extratos e cromatografia líquida de ultraperformance acoplada à espectrometria de massas para identificação e quantificação dos compostos. Os critérios para validação do método desenvolvido foram baseados no documento “Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008” do INMETRO (2020). O método desenvolvido e validado foi incorporado na rotina de análises do Laboratório de Análises Ambientais da Embrapa Agropecuária Oeste (Dourados, MS).

## Material e Métodos

---

Os inseticidas e produtos de degradação selecionados para o desenvolvimento do método multirresíduo foram aqueles mais utilizados nas culturas adjacentes às áreas com sericultura (soja, cana-de-açúcar, milho e outras) em Mato Grosso do Sul, Paraná e São Paulo. As principais propriedades físico-químicas desses inseticidas e produtos de degradação são mostradas na Tabela 1. Observa-se que existe uma ampla variabilidade com relação à solubilidade em água e polaridade (expressada pelo Log P ou coeficiente de partição de uma substância entre uma fase orgânica e uma fase aquosa) desses compostos, enquanto a maioria se enquadra como compostos neutros ou não ionizáveis (ausência de valores de pKa ou logaritmo da constante de dissociação de um ácido).

As soluções estoques dos 26 diferentes inseticidas e produtos de degradação foram preparadas, individualmente, por meio da pesagem de 10 mg de cada padrão analítico com posterior diluição em 10 mL de acetona grau HPLC, com concentração final de 1 mg mL<sup>-1</sup> (1.000 µg mL<sup>-1</sup>). Os padrões analíticos foram obtidos junto às empresas Sigma Aldrich®, ChemService®, Dr. Ehrenstorfer GmbH® e Fluka®, todos com pureza acima de 95%. A partir da solução estoque, uma solução de trabalho foi preparada para cada um dos 26 compostos, em metanol grau LC-MS, na concentração de 100 µg mL<sup>-1</sup>. Em seguida, foi preparada uma outra solução de trabalho, em metanol grau LC-MS, contendo a mistura de todos os inseticidas e produtos de degradação

na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Todas as soluções estoque e de trabalho foram mantidas em freezer a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . A partir da solução de trabalho com todos os inseticidas e produtos de degradação, foram preparadas as soluções para as curvas analíticas de calibração nas concentrações de  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ .

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas dos inseticidas e produtos de degradação do método analítico multirresíduo.

Inseticida ou produto de degradação	Peso molecular ( $\text{g mol}^{-1}$ )	Solubilidade em água ( $\text{mg L}^{-1}$ )	pKa <sup>(1)</sup>	Log P <sup>(2)</sup>
Abamectina	866,6	0,020	-	4,4
Benzoato de emamectina	1.008,2	24	4,2	5,0
Bifentrina	422,9	0,001	-	6,6
Carbofurano	221,3	322	-	1,8
Carbosulfano	380,5	0,11	-	7,4
Clorantraniliprole	483,2	0,88	10,9	2,9
Clorfuazurom	540,6	0,016	8,1	5,8
Clorpirifós	350,6	1,05	-	4,7
Clotianidina	249,7	340	11,1	0,9
Dimetoato	229,3	25.900	-	0,8
Etofenproxi	376,5	0,023	-	6,9
Fipronil	437,1	3,78	-	3,8
Fipronil dessulfenil	389,1	0,95	-	-
Fipronil sulfeto	421,1	0,54	-	-
Fipronil sulfona	453,1	0,16	-	-
Flubendiamida	682,4	0,029	-	4,1
Imidacloprido	255,6	610	-	0,6
Lufenurom	511,2	0,046	10,2	5,1
Metamidofós	141,1	200.000	-	-0,8
Metomil	162,2	55.000	-	0,1
Metoxifenoazida	368,5	3,3	12,2	3,7
Novalurom	492,7	0,003	-	4,3
Profenofós	373,6	28	-	1,7
Tebufenozida	353,5	0,83	-	4,3
Tiametoxam	291,7	4.100	-	-0,13
Triflumurom	358,7	0,04	-	4,9

<sup>(1)</sup>pKa = constante de equilíbrio de ionização do ácido.

<sup>(2)</sup>Log P = coeficiente de partição entre n-octanol e água.

Fonte: PPDB (2020).

Os 26 inseticidas e produtos de degradação foram analisados utilizando-se um cromatógrafo líquido de ultra performance acoplado a um espectrômetro de massas (UHPLC-MS/MS), ambos da Waters® (modelo H-Class e Xevo-TQD). O sistema operou em modo gradiente, com fase móvel água (A) (acetato de amônio 10 mM) e metanol (B) (acetato de amônio 10 mM), coluna BEH C18 1,7  $\mu\text{m}$  x 2,1 x 100 mm (Waters®) com temperatura em 45 °C, fluxo de 0,4 mL min<sup>-1</sup> e volume de amostra injetado de 10  $\mu\text{L}$ . O gradiente iniciou em 50% de A até 0,8 min. No intervalo de 0,8 min a 8,75 min, o gradiente foi modificado gradativamente até atingir 99% de B, permanecendo assim até 14 min. Em seguida, o gradiente retornou para 50% de A até 17 min. Nessas condições, o tempo total de análise foi de 17 minutos. As seguintes condições do método de aquisição foram estabelecidas: capilar de 1 kV, extrator de 3V, temperatura da fonte de 150 °C, temperatura de dessolvatação de 400 °C, fluxo do gás de dessolvatação igual a 1.000 L h<sup>-1</sup> e do cone igual a 70 L h<sup>-1</sup>. Para otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas para os inseticidas e produtos de degradação foram feitas infusões dos padrões, individualmente, com concentração de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Para cada composto, dois íons de transição foram monitorados (o mais intenso para a quantificação e o outro para a confirmação), utilizando-se as respectivas energias de colisão (Tabela 2). Utilizou-se o método de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) para o monitoramento dos íons, sendo que a confirmação das moléculas dos inseticidas e produtos de degradação foi feita obedecendo-se simultaneamente aos três critérios: 1) correspondência com o tempo de retenção do padrão analítico preparado na matriz (variação máxima permitida de  $\pm 2,5\%$ ); 2) presença do íon precursor ou molecular e dos dois íons fragmentos (quantificação e confirmação); e 3) razão entre os íons de quantificação e de confirmação na amostra não deve variar mais que 30% da razão desses íons observadas na injeção dos padrões analíticos na matriz.

**Tabela 2.** Parâmetros de aquisição do espectrômetro de massas para os inseticidas e produtos de degradação do método multirresíduo.

Inseticida ou produto de degradação	Modo ESI	TR <sup>(1)</sup> (min)	Íon Molecular (m/z)	Cone (V)	Íons Fragmentos (m/z)	
					Quantificação	Confirmação
Abamectina	+	8,48	895,7	95	327,3 (53) <sup>(2)</sup>	751,5 (45) <sup>(2)</sup>
Benzoato de emamectina	+	8,08	886,3	50	82,3 (70)	158,2 (35)
Bifentrina	+	8,95	440,0	20	166 (50)	181 (15)
Carbofurano	+	1,78	222,3	25	123 (20)	165,2 (12)
Carbosulfano	+	8,62	381,0	40	76 (34)	118 (22)
Clorantianilprole	+	3,38	484,0	30	286 (15)	453 (20)
Clorfuazurom	+	8,04	539,8	40	158 (20)	382,9 (20)
Clorpirifós	+	7,28	349,9	25	97 (30)	198 (20)
Clotianidina	+	0,88	250,2	20	132 (15)	169,1 (12)
Dimetoato	+	0,97	230,1	20	125 (20)	199 (10)
Etofenproxi	+	8,74	394,3	25	106,9 (40)	177 (15)
Fipronil	-	5,34	435,1	30	250 (25)	330 (15)
Fipronil dessulfenil	-	5,13	389,0	25	331 (27)	351 (15)
Fipronil sulfeto	-	5,54	419,0	30	262 (28)	383 (13)
Fipronil sulfona	-	5,81	451,0	30	282,1 (27)	415 (17)
Flubendiamida	-	5,56	681,0	35	254 (30)	274 (15)
Imidacloprido	+	0,84	256,0	20	175 (22)	209 (13)
Lufenurum	-	7,27	509,0	25	326 (18)	339 (10)
Metamidofós	+	0,70	142,0	30	93,9 (15)	124,9 (15)
Metomil	+	0,77	163,1	15	88 (10)	106 (10)
Metoxifenoazida	+	4,40	369,1	20	149,1 (20)	313,2 (5)
Novalurum	+	6,73	493,0	35	141 (45)	158 (20)
Profenofós	+	6,78	372,9	30	127,9 (40)	302,6 (20)
Tebufenozida	+	5,33	353,1	20	133 (25)	297 (10)
Tiametoxam	+	0,77	292,2	20	181 (24)	211,1 (12)
Triflumurom	+	5,99	359,0	31	139,1 (35)	156,1 (16)

<sup>(1)</sup> TR = tempo de retenção.

<sup>(2)</sup> O valor entre parêntesis se refere à energia de colisão (eV).

Amostras de larvas do bicho-da-seda foram coletadas em propriedades de diferentes sericultores nos municípios de Glória de Dourados e Deodópolis, MS, no dia 20 de fevereiro de 2021 (Figura 1). Após a coleta, as amostras devidamente identificadas e acondicionadas em sacos plásticos foram imediatamente colocadas em caixa térmica com gelo, até transporte ao

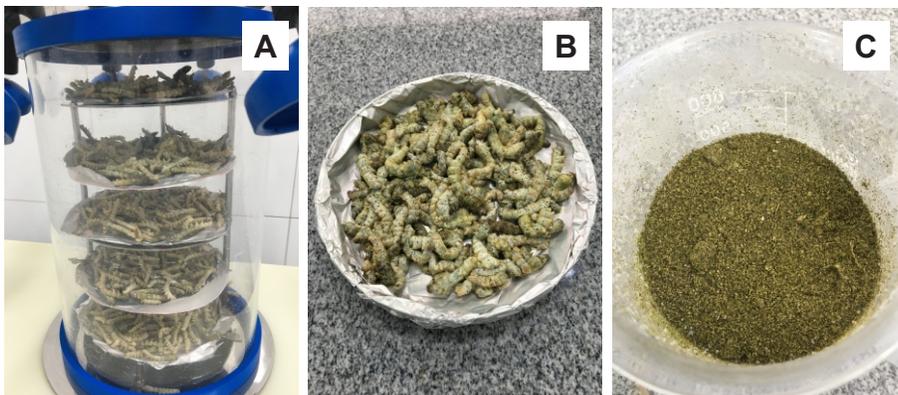
laboratório para congelamento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Com objetivo de preparar material suficiente para o desenvolvimento do método analítico, 500 g de bicho-da-seda foram liofilizados a  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  sob vácuo por um período de 48 horas. Em seguida, todo esse material foi triturado utilizando um moinho analítico (Figura 2).

Fotos: Rômulo Penna Scorza Júnior



**Figura 1.** Criação das larvas do bicho-da-seda nas propriedades dos sericultores nos municípios de Glória de Dourados e Deodópolis, MS.

Fotos: Irzo Isaac Rosa Portilho



**Figura 2.** Processo de liofilização das larvas do bicho-da-seda (A), amostras liofilizadas (B) e após trituração (C).

O método analítico foi baseado no protocolo QuEChERS (acrônimo de Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), desenvolvido por Anastassiades et al. (2003), e consiste em uma etapa inicial de extração com acetonitrila, seguida de partição após adição de sal e, por último, uma etapa de limpeza com extração em fase sólida dispersiva. No entanto, o protocolo QuEChERS tem sofrido modificações ao longo do tempo, recebendo as denominações de original (Anastassiades et al., 2003), acetato (Lehotay et al., 2005) e citrato (Anastassiades et al., 2007). Esse protocolo é comumente utilizado para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos e derivados (Muñoz et al., 2017; Souza et al., 2021), sendo mais recentemente também utilizado para matrizes ambientais (Dutra et al., 2020).

Uma visão geral do método analítico desenvolvido para determinação dos 26 diferentes inseticidas e produtos de degradação no bicho-da-seda é apresentada na Figura 3. Após liofilização e trituração, 5 gramas do bicho-da-seda são adicionados em um tubo de centrífuga cônico de polipropileno de 50 mL (tipo Falcon), com posterior adição de 17 mL de acetonitrila grau HPLC e 4 mL de água ultrapura e agitação por 10 minutos a 2.000 rpm em um agitador de tubos do tipo Multi Reax®. Em seguida, adiciona-se 6 g de  $MgSO_4$  e 1,5 g de NaCl com posterior agitação no Multi Reax® por 10 minutos a 2.000 rpm. Após essa etapa de extração, os tubos com as amostras são centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 15 °C. Uma alíquota de 6 mL do sobrenadante é transferida para um tubo de polipropileno de 15 mL, onde adiciona-se 300 mg da fase sólida dispersiva PSA (amina primária e secundária) e 300 mg de  $MgSO_4$ , o qual é colocado em seguida para agitação no Multi Reax® por 10 minutos a 2.000 rpm. Posteriormente, os tubos são centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 15 °C e uma alíquota de 5 mL é retirada e evaporada até total secura com gás nitrogênio. O extrato final é retomado em 2 mL de metanol:água (50:50 v/v), com posterior filtração em filtros de seringa de celulose regenerada de 0,22 µm antes da injeção no UHPLC-MS/MS.



**Figura 3.** Fluxograma com as diferentes etapas do método analítico para a determinação de inseticidas e produtos de degradação em bicho-da-seda.

Ilustração: Thiago Luis Aquayo de Castro

O método analítico foi validado com base nos parâmetros e critérios estabelecidos pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), com base na publicação DOQ-CGCRE-008 revisão 09 de 06/2020, que trata de “Orientação sobre validação de métodos analíticos” (INMETRO, 2020). Os parâmetros de desempenho do método avaliado foram seletividade, efeito matriz, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), recuperação e precisão. O efeito matriz foi estimado pela comparação das inclinações das curvas de calibração analíticas na matriz bicho-da-seda (bmatriz) e na fase móvel (bfase móvel) para os 26 inseticidas e produtos. Considerou-se um efeito significativo os valores de efeito matriz maiores que 20% na supressão ou aumento da resposta. O efeito matriz (EM) foi estimado pela equação (Vázquez et al., 2015):

$$EM (\%) = \left( \frac{b_{matriz}}{b_{fase\ móvel}} - 1 \right) \times 100 \quad (1)$$

O LQ para cada composto foi estabelecido como a menor concentração que pôde ser quantificada no bicho-da-seda com recuperação (70% a 120%) e a precisão (menor que 20%) aceitáveis. Já o LD foi estabelecido como LQ / 3,3 (INMETRO, 2020).

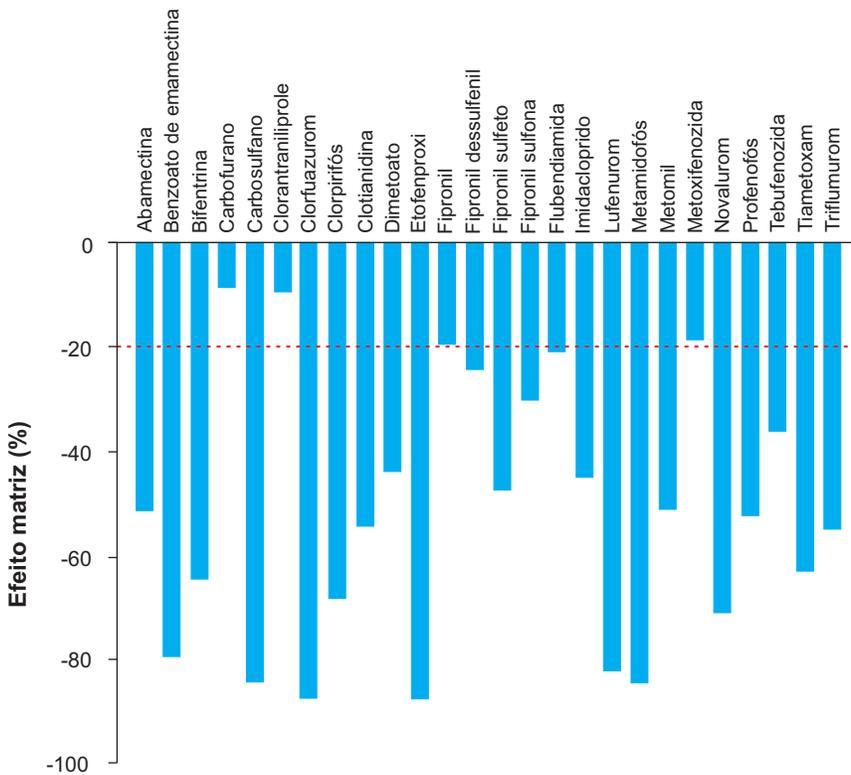
Para avaliação da recuperação e precisão do método, amostras do bicho-da-seda liofilizadas foram contaminadas com as concentrações de 1,35 ng g<sup>-1</sup>; 2,70 ng g<sup>-1</sup> e 6,70 ng g<sup>-1</sup> dos 26 diferentes inseticidas e produtos de degradação, utilizando-se uma solução em metanol grau HPLC com a mistura de todos eles na concentração de 100 µg L<sup>-1</sup>.

## Resultados e Discussão

---

O primeiro parâmetro avaliado durante o desenvolvimento do método foi a seletividade, que indica se este é capaz de identificar e quantificar os 26 diferentes inseticidas e produtos de degradação na presença de outros analitos e materiais interferentes presentes na matriz bicho-da-seda. Após comparação das respostas dos cromatogramas do “branco da amostra” (apenas extratos do bicho-da-seda sem os compostos de interesse) com as respostas obtidas para as menores concentrações dos 26 inseticidas e produtos de degradação adicionados na matriz analisada, considerando os respectivos tempos de retenção dos compostos, observou-se ausência de picos interferentes com sinais menores que 30%. Assim, o método desenvolvido foi considerado seletivo e específico para identificar e quantificar os 26 inseticidas e produtos de degradação na presença de outros analitos e possíveis materiais interferentes no bicho-da-seda.

O efeito matriz, que corresponde à influência positiva ou negativa na resposta de um analito de interesse devido à presença de um ou mais interferentes nas amostras e que foram coextraídos, foi avaliado por meio da comparação das curvas analíticas de calibração preparadas no gradiente inicial da fase móvel e na matriz bicho-da-seda (Equação 1). Observou-se efeito matriz na forma de supressão de resposta (efeito negativo) para os 26 inseticidas e produtos de degradação, com valores entre -8% e -88% (Figura 4). Dentre esses 26 compostos, apenas carbofurano, clorantraniliprole, fipronil e metoxifenoazida apresentaram valores de efeito matriz menores que 20% e que podem ser considerados não significativos. Os maiores valores de efeito matriz na forma de supressão da resposta (> 60%) foram observados para os compostos benzoato de emamectina, bifentrina, carbosulfano, clorfluazurom, clorpirifós, etofenproxi, lufenurom, metamidofós, novalurom e tiametoxam. Diante da constatação do efeito matriz durante o desenvolvimento do método, concluiu-se pela necessidade e obrigatoriedade de construção das curvas de calibração analíticas sempre na presença da matriz, para a correta quantificação dos resíduos dos 26 inseticidas e produtos de degradação no bicho-da-seda. Importante salientar que a magnitude do efeito matriz na supressão ou aumento da resposta de agrotóxicos é dependente da molécula e da matriz analisada e, até mesmo, do lote da mesma matriz (Niessen et al., 2006).



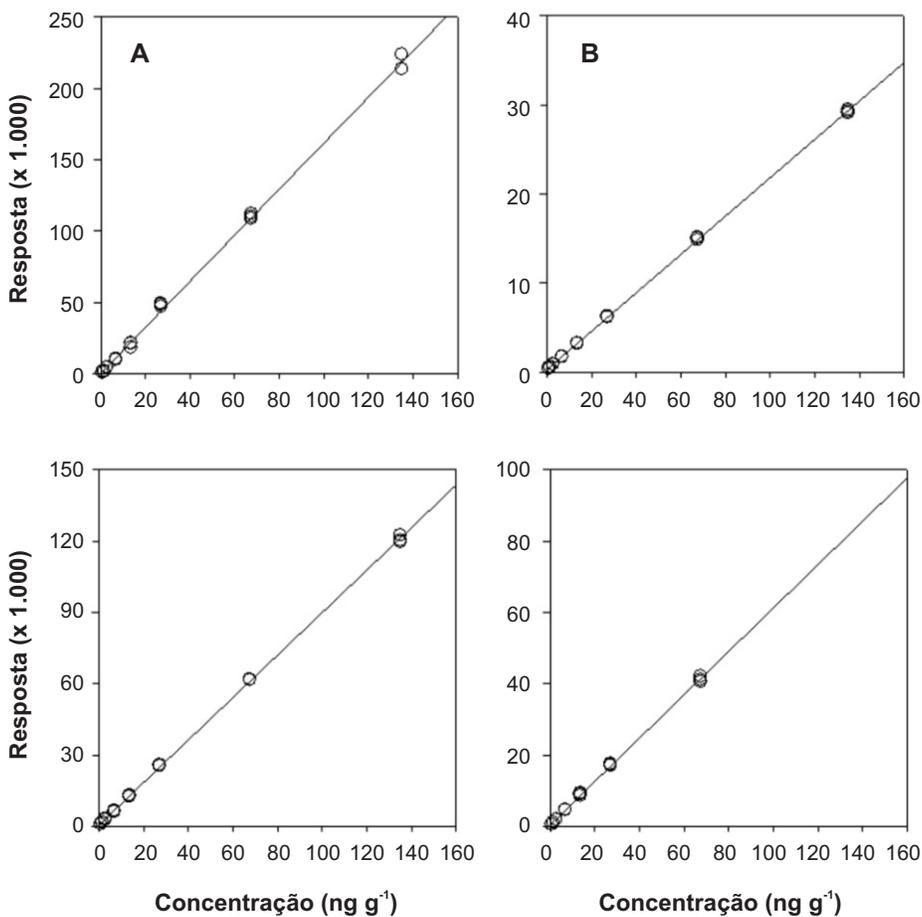
**Figura 4.** Valores de supressão dos sinais devido ao efeito matriz para os diferentes inseticidas e produtos de degradação.

As curvas de calibração analíticas preparadas na matriz bicho-da-seda com seus respectivos valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) são mostradas na Tabela 3 e Figura 5 (para alguns inseticidas). Todas as curvas foram construídas com base no íon de quantificação para cada composto, obtendo-se valores de  $R^2$  superiores a 0,99, com exceção do novalurum, que apresentou valor superior a 0,98. Esses valores de  $R^2$  confirmam a linearidade satisfatória do método, ou seja, as respostas do equipamento foram linearmente proporcionais à faixa de concentração avaliada para cada inseticida ou produto de degradação.

**Tabela 3.** Parâmetros de desempenho para validação do método analítico multirresíduo<sup>(1)</sup>.

Inseticida ou produto de degradação	R <sup>2</sup>	LD (ng g <sup>-1</sup> )	LQ (ng g <sup>-1</sup> )	Faixa linear (ng g <sup>-1</sup> )
Abamectina	0,9919	0,41	1,35	1,35–135
Benzoato de emamectina	0,9976	0,41	1,35	1,35–135
Bifentrina	0,9950	0,41	1,35	1,35–135
Carbofurano	0,9996	0,41	1,35	0,68–135
Carbosulfano	0,9993	0,41	1,35	0,68–135
Clorantraniliprole	0,9997	0,41	1,35	0,68–135
Clorfuazurom	0,9903	0,41	1,35	1,35–67,5
Clorpirifós	0,9945	0,82	2,70	2,70–135
Clotianidina	0,9977	0,41	1,35	1,35–135
Dimetoato	0,9998	0,41	1,35	0,68–135
Etofenproxi	0,9976	0,41	1,35	1,35–135
Fipronil	0,9989	0,41	1,35	0,68–135
Fipronil dessulfenil	0,9987	0,41	1,35	1,35–135
Fipronil sulfeto	0,9978	0,41	1,35	1,35–135
Fipronil sulfona	0,9991	0,41	1,35	0,68–67,5
Flubendiamida	0,9985	0,41	1,35	0,68–67,5
Imidacloprido	0,9988	0,41	1,35	0,68–135
Lufenurum	0,9942	0,41	1,35	1,35–135
Metamidofós	0,9967	0,41	1,35	0,68–135
Metomil	0,9995	0,41	1,35	0,68–135
Metoxifenoazida	0,9965	0,41	1,35	0,68–135
Novalurum	0,9855	0,41	1,35	0,68–27
Profenofós	0,9995	0,41	1,35	0,68–135
Tebufenozida	0,9910	0,82	2,70	2,70–67,5
Tiametoxam	0,9994	0,41	1,35	1,35–135
Triflumurom	0,9995	0,41	1,35	0,68–135

<sup>(1)</sup> R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação da curva analítica de calibração preparada na matriz; LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação.



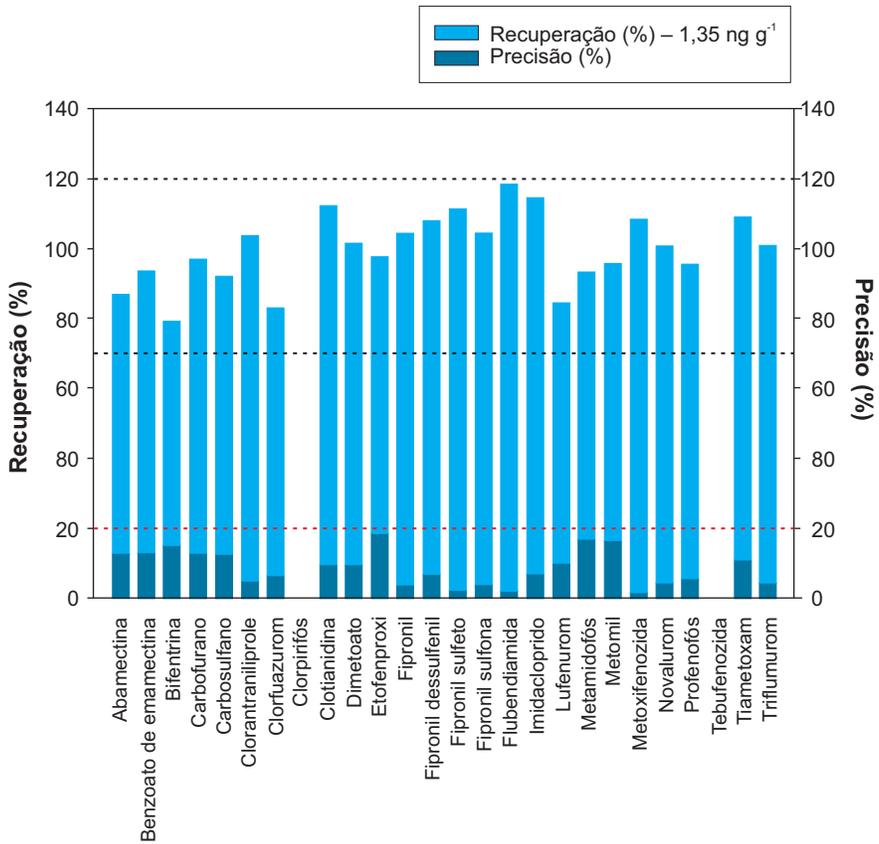
**Figura 5.** Número Curvas analíticas de calibração para os inseticidas benzoato de emamectina (A), clorantraniliprole (B), triflumurom (C) e flubendiamida (D) na matriz bicho-da-seda. Os eixos Y possuem diferentes escalas.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método analítico multirresíduo variaram de 0,41 ng g<sup>-1</sup> a 0,82 ng g<sup>-1</sup> e de 1,35 ng g<sup>-1</sup> a 2,70 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 3). O LD corresponde à menor concentração do analito de interesse (inseticida ou produto de degradação) no bicho-da-seda que pode ser detectada, mas não quantificada, nas condições dos critérios estabelecidos na validação do método (precisão com CV menor que 20% e recuperação entre 70% e 120%). Já o LQ corresponde à menor concentração do analito de interesse no bicho-da-seda que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis e estabelecidas nos critérios de validação do método analítico multirresíduo. Assim, importante salientar que, se após análise de uma amostra esta apresentar valores entre LD e LQ, este resultado deve ser reportado como <LQ, ou seja, o analito de interesse estava presente, mas não pôde ser quantificado com precisão e recuperação aceitáveis conforme critério na validação do método. Valores menores que LD devem ser reportados como ND (não detectado) e maiores ou iguais ao LQ devem ser reportados com os valores finais das concentrações obtidos pelo método de análise. Diante da escassez de trabalhos na literatura sobre métodos analíticos multirresíduo para determinação de resíduos de inseticidas e produtos de degradação em larvas do bicho-da-seda, optou-se por comparar os valores de LQ do método desenvolvido com os valores de outras matrizes biológicas semelhantes como, por exemplo, outros insetos e que utilizaram o protocolo QuEChERS. Atualmente, os insetos polinizadores (abelhas e outros) têm sido bastante estudados com relação à sua exposição aos inseticidas utilizados nas diferentes culturas, em especial aos neonicotinoides. Silvina et al. (2017) avaliaram resíduos dos inseticidas acetamiprido, imidacloprido e tiametoxam em abelhas utilizando um método com LQ igual a 0,1 ng g<sup>-1</sup>. Amulen et al. (2017) desenvolveram um método analítico multirresíduo para quantificação de 36 diferentes agrotóxicos em abelhas, com LQ variando de 0,028 ng g<sup>-1</sup> a 0,094 ng g<sup>-1</sup>. Já Calatayud-Vernich et al. (2016) desenvolveram um método multirresíduo para 52 diferentes agrotóxicos em abelhas, com LQ variando de 0,03 ng g<sup>-1</sup> a 10 ng g<sup>-1</sup>. Barganska et al. (2014), também trabalhando com abelhas, desenvolveram e validaram um método multirresíduo para 19 agrotóxicos com LQ variando de 3 ng g<sup>-1</sup> a 75 ng g<sup>-1</sup>. Com base nesses trabalhos, observa-se que o método desenvolvido possui valores de LQ (1,35 ng g<sup>-1</sup> a 2,70 ng g<sup>-1</sup>) intermediários ou até mesmo inferiores, quando comparados aos métodos desenvolvidos para abelhas, o que o torna um método sensível para uso como uma ferramenta de monitoramento dos resíduos de agrotóxicos.

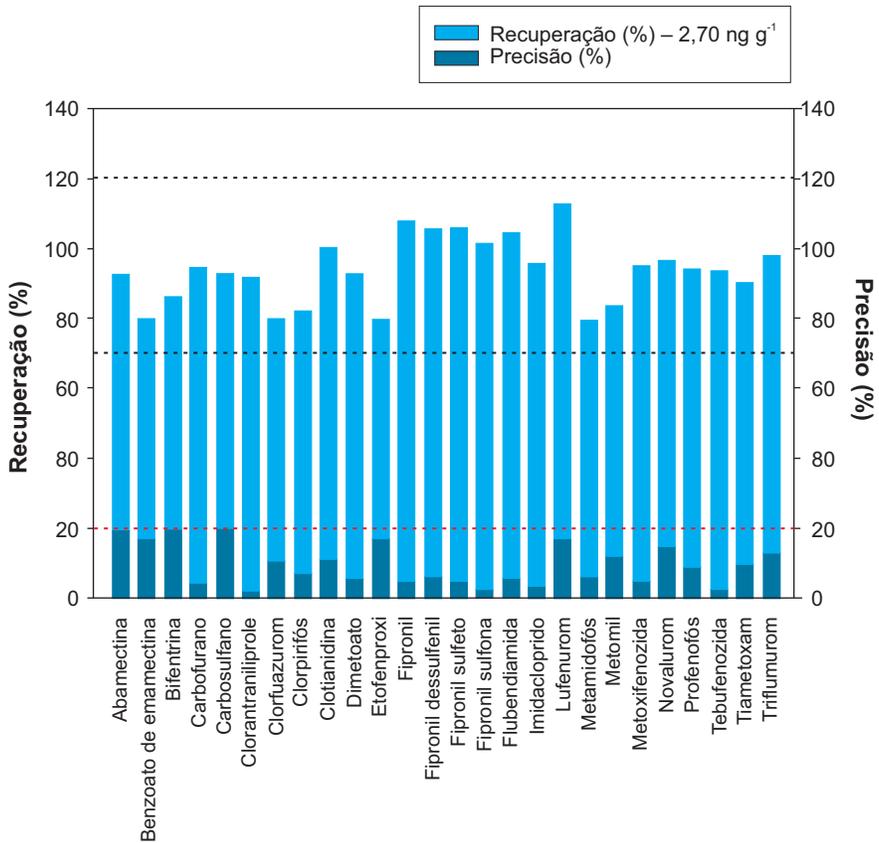
Nas Figuras 6, 7 e 8 são apresentados os valores de recuperação e precisão para os três níveis de fortificação das amostras equivalentes às concentrações de 1,35 ng g<sup>-1</sup>; 2,70 ng g<sup>-1</sup> e 6,75 ng g<sup>-1</sup>. Observa-se que os valores de recuperação para a concentração de 1,35 ng g<sup>-1</sup> (equivalente ao LQ para todos os compostos, com exceção do clorpirifós e do tebufenozida) variaram de 79% a 118%, com a precisão entre 1% a 18%. Para a concentração de 2,70 ng g<sup>-1</sup>, os valores de recuperação variaram de 73% a 116%, com precisão entre 1% e 19%, e para a concentração de 6,75 ng g<sup>-1</sup> os valores de recuperação variaram de 79% a 113%, com precisão entre 2% e 16%. Assim, todos os valores de recuperação ficaram no intervalo do critério estabelecido para validação do método, ou seja, entre 70% e 120%, com os valores de precisão inferiores a 20% (INMETRO, 2020).

A título de exemplo, nas Figuras 9, 10 e 11 são apresentados alguns cromatogramas do inseticida tebufenozida, obtidos durante o experimento de recuperação. Observa-se ausência de picos interferentes no tempo de retenção igual a 5,33 min, para ambos os íons de quantificação (m/z 133) e confirmação (m/z 297), nas amostras “branco” do bicho-da-seda (Figura 9). Os picos cromatográficos para o padrão analítico na concentração de 2 µg L<sup>-1</sup> na matriz bicho-da-seda, bem como no experimento de recuperação para a concentração de 2,7 ng g<sup>-1</sup> (LQ para tebufenozida), apresentaram boas resoluções (Figuras 10 e 11).

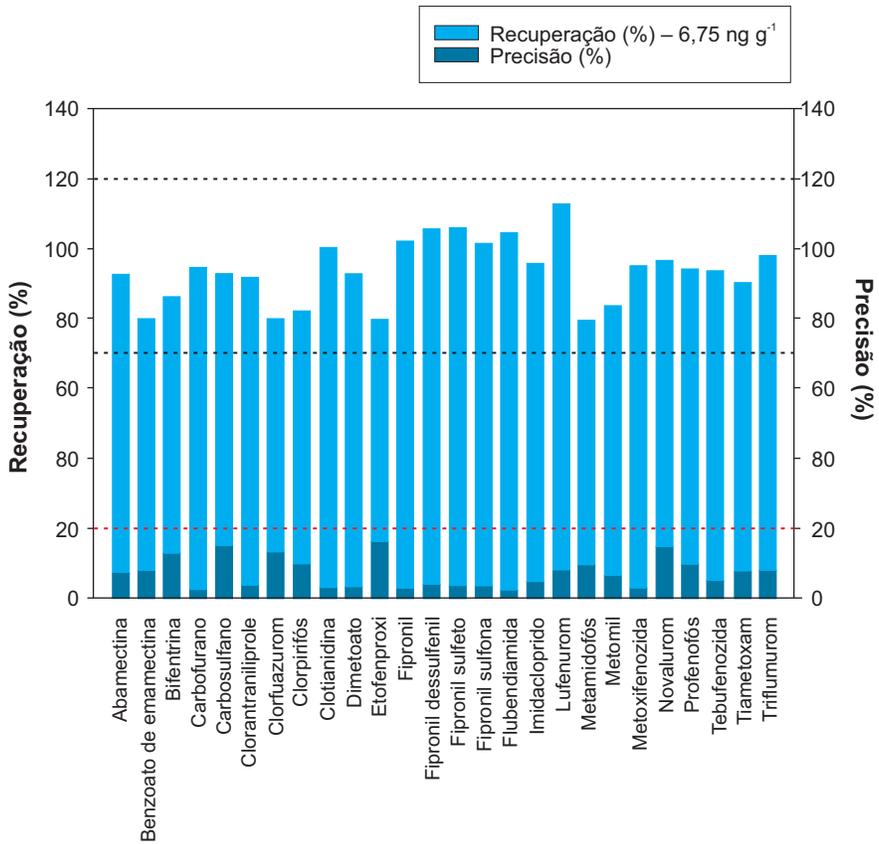
Assim, diante dos resultados satisfatórios para o desenvolvimento com posterior validação do método analítico, este foi incorporado na rotina do Laboratório de Análises Ambientais da Embrapa Agropecuária Oeste, com objetivo de identificação e quantificação de 26 diferentes inseticidas e produtos de degradação na matriz bicho-da-seda.



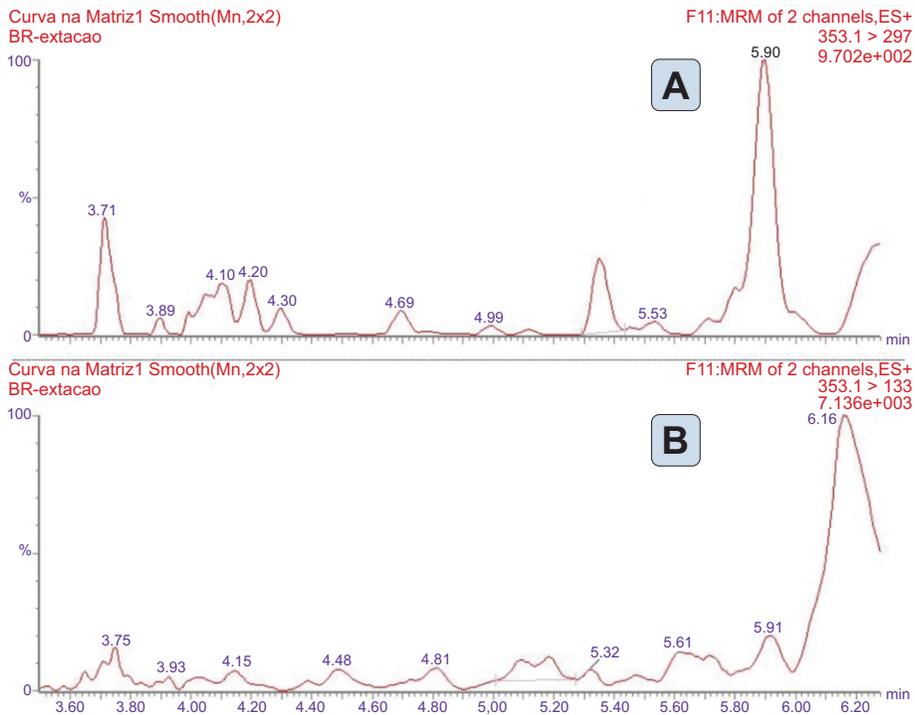
**Figura 6.** Valores médios (n=5) de recuperação (%) e precisão (%) dos inseticidas e produtos de degradação na matriz bicho-da-seda para a concentração de 1,35 ng g<sup>-1</sup>. As linhas horizontais representam os critérios de aceitação para recuperação (entre 70% e 120%) e para precisão (menor que 20%).



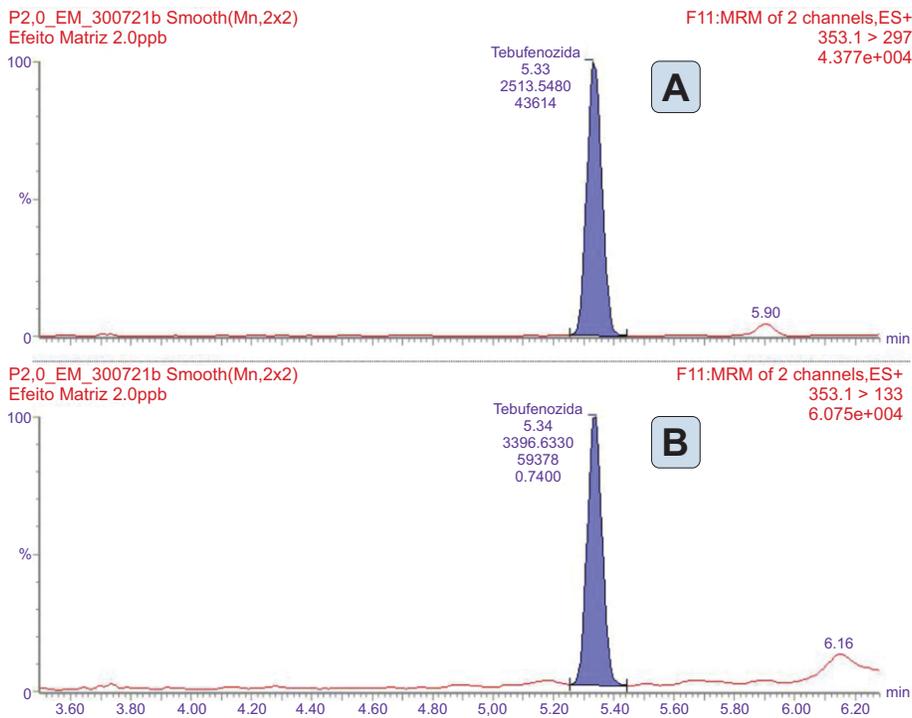
**Figura 7.** Valores médios (n=5) de recuperação (%) e precisão (%) dos inseticidas e produtos de degradação na matriz bicho-da-seda para a concentração de 2,70 ng g<sup>-1</sup>. As linhas horizontais representam os critérios de aceitação para recuperação (entre 70% e 120%) e para precisão (menor que 20%).



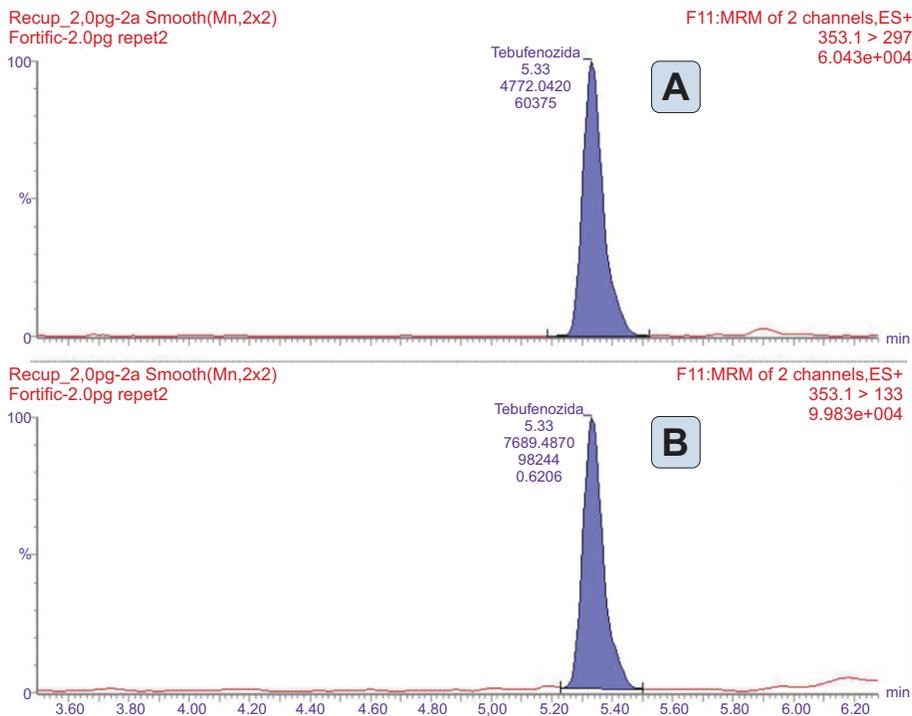
**Figura 8.** Valores médios (n=5) de recuperação (%) e precisão (%) dos inseticidas e produtos de degradação na matriz bicho-da-seda para a concentração de 6,75 ng g<sup>-1</sup>. As linhas horizontais representam os critérios de aceitação para recuperação (entre 70% e 120%) e para precisão (menor que 20%).



**Figura 9.** Cromatogramas dos íons de quantificação (A) e confirmação (B) do inseticida tebufenozida nas amostras “branco” do bicho-da-seda.



**Figura 10.** Cromatogramas dos íons de quantificação (A) e confirmação (B) do inseticida tebufenozida correspondente ao padrão analítico de  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  (primeiro ponto da curva de calibração) na matriz bicho-da-seda.



**Figura 11.** Cromatogramas dos íons de quantificação (A) e confirmação (B) do inseticida tebufenozida nas amostras fortificadas do bicho-da-seda com  $2,7 \text{ ng g}^{-1}$  (LQ) durante o experimento de recuperação.

## Conclusões

---

- a) O método analítico multirresíduo desenvolvido e validado permite a identificação e quantificação dos resíduos de 26 diferentes inseticidas e produtos de degradação na matriz bicho-da-seda.
- b) O método desenvolvido pode ser utilizado como uma ferramenta em trabalhos de monitoramento para avaliação da exposição e efeito de inseticidas no bicho-da-seda.

## Agradecimentos

---

Ao técnico de laboratório Paulo Henrique Vitro, pelo auxílio na execução das análises laboratoriais e cromatográficas. Ao estagiário Thiago Luis Aguayo de Castro, pela elaboração da Figura 3. Aos parceiros e financiadores (Projeto 10.20.00.003.00.00): Ministério Público de Mato Grosso do Sul (MPMS), Ministério Público Federal (MPF – PRM/Dourados) e Fundapam.

## Referências

---

- AMULEN, D. R.; SPANOGHE, P.; HOUBRAKEN, M.; TAMALE, A.; GRAAF, D. C.; CROSS, P.; SMAGGHE, G. Environmental contaminants of honeybee products in Uganda detected using LC-MS/MS and GC-ECD. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p.1–14, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0178546
- 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 the Association of Official Analytical Chemists**, v. 86, n. 2, p. 412–431, 2003. DOI: 10.1093/jaoac/86.2.412
- ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM, E.; TASDELEN, B.; STAJNBAHER, D. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. In: OHKAWA, H.; MIYAGAWA, H.; LEE, P. W. **Pesticide Chemistry: Crop protection, public health, environmental safety**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2007. p. 439–458.
- BARGANSKA, Z.; SLEBIODA, M.; NAMIESNIK, J. Determination of pesticide residues in honeybees using modified QuEChERS sample work-up and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Molecules**, v.19, p. 2911–2924, 2014. DOI: 10.3390/molecules19032911
- CALATAYUD-VERNICH, P.; CALATAYUD, F.; SIMÓ, E.; PICÓ, Y. Efficiency of QuChERS approach for determining 52 pesticides residues in honey and honey bees. **MethodsX**, v. 3, p. 452–458, 2016. DOI: 10.1016/j.mex.2016.05.005
- DUTRA, D. R. C. S.; ASSALIN, M. R.; SANTOS, R. S.; DORES, E. F. G. C. Method validation for multiresidue pesticide determination in riverbed sediment using QuEChERS and CG-MS/MS and application in samples from an important watershed in Central Western Brazil. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 100, n.13, p. 1536–1548, 2020. DOI: 10.1080/03067319.2019.1657107
- IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal - PPM**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/> Acesso em: 30 set. 2021.
- INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**: documento de caráter orientativo. DOQ-CGCRE-008: revisão 09 – junho 2020. Brasília, DF, 2020. Disponível em: < [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_05.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf)>. Acesso em: 30 set. 2021.
- INTERNATIONAL SERICULTURAL COMMISSION. **Silk - Statistics**. 2020. United Nations, Reg. No. 10448. Disponível em: <<http://www.inserco.org/en/statistics>>. Acesso em: 01 out. 2021
- LEHOTAY, S. J.; MASTOYSKA K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 88, n. 2, p. 615–629, 2005. DOI: 10.1093/jaoac/88.2.615
- MUÑOZ, N. C.; FLORIANO, L.; SOUZA, M. P.; BANDEIRA, N. M. G.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R. Determination of pesticide residues in golden berry (*Physalis peruviana* L.) by modified QuEChERS method and ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 320–329, 2017. DOI: 10.1007/s12161-016-0582-7

---

O método analítico descrito nesta publicação é uma importante ferramenta para ser utilizada em laboratórios com o objetivo de monitorar a exposição de organismos não-alvo a agrotóxicos, atendendo inclusive, ao Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 02: Acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável”, por meio do alcance da Meta 4: “Até 2030, garantir sistemas sustentáveis de produção de alimentos, por meio de políticas de pesquisa, de assistência técnica e extensão rural, entre outras, visando implementar práticas agrícolas resilientes que aumentem a produção e a produtividade e, ao mesmo tempo, ajudem a proteger, recuperar e conservar os serviços ecossistêmicos, fortalecendo a capacidade de adaptação às mudanças do clima, às condições meteorológicas extremas, secas, inundações e outros desastres, melhorando progressivamente a qualidade da terra, do solo, da água e do ar” (ONU, 2018).

---



---

*Agropecuária Oeste*

MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA  
**BRASIL**  
GOVERNO FEDERAL