

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Graziela Iop Rocha

**MÉTODO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM CAQUI
EMPREGANDO QuEChERS SEM LIMPEZA DO EXTRATO
E UHPLC-MS/MS**

Santa Maria, RS

2022

Graziela Iop Rocha

**MÉTODO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM CAQUI EMPREGANDO
QuEChERS SEM LIMPEZA DO EXTRATO E UHPLC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**, área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, RS

2022

Rocha, Graziela Iop
MÉTODO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM CAQUI EMPREGANDO
QuEChERS SEM LIMPEZA DO EXTRATO E UHPLC-MS/MS / Graziela
Iop Rocha.- 2022.
118 p.; 30 cm

Orientador: Renato Zanella
Coorientador: Osmar D. Prestes
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2022

1. QuEChERS sem etapa de limpeza 2. Agrotóxicos 3.
UHPLC-MS/MS 4. Caqui I. Zanella, Renato II. Prestes,
Osmar D. III. Título.

sistema de geração automática de ficha catalográfica da uvm. dados fornecidos pelo autor(a). sob supervisão da direção da divisão de processos técnicos da biblioteca central. bibliotecária responsável raula schoenfeldt patta cmu 10/1728.

Declaro, GRAZIELA IOP ROCHA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Graziela Iop Rocha

**MÉTODO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM CAQUI EMPREGANDO
QuEChERS SEM LIMPEZA DO EXTRATO E UHPLC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**, área de concentração Química Analítica.

Aprovada em 16 de março de 2022:



Renato Zanella, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Janice Zulma Francesquett, Dra. (FAHOR)



Liziara da Costa Cabrera, Dra. (UFFS)

Santa Maria, RS

2022

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares, amigos e colegas que sempre me acompanharam nesta jornada. Em especial aos meus pais Éder e Jacqueline, os dois maiores incentivadores das realizações dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Éder e Jacqueline, pelo apoio e incentivo incondicional e por se esforçarem incansavelmente para me proporcionar educação e condições, que possibilitaram minha chegada até aqui. A minha irmã Karoline pelo carinho e por estar junto comigo, me apoiando, em todos os momentos.

Aos meus familiares, que me incentivam e comemoram comigo todas as minhas vitórias, em especial aos meus avós, Arthur e Gema, que não estão presentes neste momento mas são grandes formadores do meu caráter. Ao Fábio, por todo amor e por estar sempre me incentivando, aconselhando e acreditando no meu potencial.

Ao meu orientador, Professor Renato e aos demais professores do LARP, Osmar e Martha por compartilharem comigo seus conhecimentos, pela oportunidade de crescimento pessoal e por me receberem de braços abertos no laboratório desde a iniciação científica.

Aos membros da banca Prof.^a Dr.^a Janice e Prof.^a Dr.^a Liziara pela disponibilidade e por todas as contribuições nesta defesa de dissertação.

Às minhas amigas e colegas de graduação Adriane, Juliana, Karolaine e Larissa pelo carinho, parceria em tantos momentos importantes, e pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho. Aos meus amigos, que não estão presentes no meu dia a dia no laboratório, mas participaram desta jornada comigo almejando meu sucesso.

Aos meus colegas de laboratório, que dividiram comigo esta jornada, pela parceria e auxílio. Em especial a Daniela, Dilson, Herliana, Júlia e Luana pelas contribuições, discussões e por dividirem comigo seus conhecimentos, auxiliando na execução deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao PPGQ-UFSM por oferecer um ensino gratuito e de qualidade, sendo essencial na minha formação. Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

À Deus que me protegeu e me guiou sempre pelos melhores caminhos.

RESUMO

MÉTODO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM CAQUI EMPREGANDO QuEChERS SEM LIMPEZA DO EXTRATO E UHPLC-MS/MS

AUTORA: Graziela Iop Rocha
ORIENTADOR: Prof. Dr. Renato Zanella

Os agrotóxicos são amplamente empregados no cultivo de alimentos e os resíduos destes compostos podem estar presentes nessas culturas. Apesar do uso em larga escala na agricultura, os agrotóxicos podem ser perigosos à saúde humana, aos animais e ao meio ambiente. Estes riscos decorrentes do frequente uso de agrotóxicos demandam o estabelecimento de métodos analíticos adequados, bem como de programas de monitoramento para avaliar a observância da quantidade máxima de resíduos de agrotóxicos que podem estar presentes nos alimentos, chamado de limite máximo de resíduos (LMRs). O caqui é um fruto amplamente consumido *in natura* e algumas vezes utilizado na produção de subprodutos. A produção de caqui se destaca no Brasil, figurando nos últimos anos entre as vinte frutas mais produzidas. O estado de São Paulo é o líder na produção, porém o estado do Rio Grande do Sul vem ampliando a produção de caqui, sendo o segundo estado que mais produz. O volume de exportação do fruto também é alto. Existem inúmeras variedades de caqui, que é um fruto bastante sensível, com um curto período de safra e apresenta problemas de conservação, resultando em amplo emprego de agrotóxicos. A determinação simultânea de agrotóxicos de diversas classes em diferentes matrizes é bastante complexa, por isso o emprego de um método multirresíduo é essencial. O método QuEChERS tem se mostrado muito eficiente para nestes casos, e permite várias modificações de acordo com as características das matrizes. Assim, o trabalho visou desenvolver e validar um método de preparo de amostra rápido e eficiente utilizando QuEChERS para determinação multirresíduo de agrotóxicos em caqui por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS). Foram efetuadas modificações do método QuEChERS original, como por exemplo a substituição da etapa de limpeza do extrato por apenas uma maior diluição do extrato antes da análise. Essa inovação gera uma análise mais simples, rápida e barata. O método QuEChERS modificado foi validado para 86 agrotóxicos, o limite de quantificação do método (LOQ), confirmado por ensaios de recuperação, variou de 10 a 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$, os níveis de recuperação ficaram entre 70 e 120% e o RSD \leq 20%. O efeito matriz foi de $\pm 20\%$ para todos os compostos. As análises por UHPLC-MS/MS com ionização por eletronebulização apresentaram alta seletividade, sensibilidade e detectabilidade. O método validado foi aplicado em amostras comerciais de caqui e foram encontrados resíduos de cinco agrotóxicos, alguns deles proibidos no país, como o carbendazim e o dimetoato. Desta maneira, os resultados obtidos demonstraram que o método proposto é eficiente e pode ser empregado na rotina para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em caqui.

Palavras-chave: caqui, agrotóxicos, preparo de amostra, QuEChERS, UHPLC-MS/MS.

ABSTRACT

MULTIRESIDUE METHOD OF PESTICIDES IN PERSIMMONS USING QuEChERS WITHOUT CLEANING THE EXTRACT AND UHPLC-MS/MS

AUTHOR: Graziela Iop Rocha
ADVISOR: Prof. Dr. Renato Zanella

Pesticides are widely used in food crops and residues of these compounds may be present in these crops. Despite their large-scale use in agriculture, pesticides can be dangerous to human health, animals and the environment. These risks arising from the frequent use of pesticides demand the establishment of adequate analytical methods, as well as monitoring programs to assess compliance with the maximum amount of pesticide residues that may be present in food, called maximum residue limits (MRLs). Persimmon is a fruit widely consumed in nature and sometimes used in the production of by-products. Persimmon production stands out in Brazil, appearing in recent years among the twenty most produced fruits. The state of São Paulo is the leader in production, but the state of Rio Grande do Sul has been increasing persimmon production, being the second state that produces the most. The export volume of the fruit is also high. There are numerous varieties of persimmon, which is a very sensitive fruit, with a short harvest period and has conservation problems, resulting in widespread use of pesticides. The simultaneous determination of pesticides of different classes in different matrices is quite complex, so the use of a multiresidue method is essential. The QuEChERS method has been shown to be very efficient for these cases, and allows several modifications according to the characteristics of the matrices. Thus, the work aimed to develop and validate a fast and efficient sample preparation method using QuEChERS for multiresidue determination of pesticides in persimmon by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Modifications were made to the original QuEChERS method, such as replacing the extract cleaning step with just a higher dilution of the extract before analysis. This innovation generates a simpler, faster and cheaper analysis. The modified QuEChERS method was validated for 86 pesticides and the method limit of quantification (LOQ), confirmed by recovery assays, ranged from 10 to 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$, recovery levels were between 70 and 120% and $\text{RSD} \leq 20\%$. The matrix effect was $\pm 20\%$ for all compounds. The analyzes by UHPLC-MS/MS with ionization by electrospray showed high selectivity, sensitivity and detectability. The validated method was applied to commercial samples of persimmon and residues of five pesticides were found, some of them banned in the country, such as carbendazim and dimethoate. In this way, the results obtained showed that the proposed method is efficient and can be used routinely for the multiresidue determination of pesticides in persimmon

Keywords: persimmon, pesticide, sample preparation, QuEChERS, UHPLC-MS/MS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Método QuEChERS, original, acetato e citrato	49
Figura 2 – Fluxograma do procedimento MSPD, avaliado para a determinação de agrotóxicos em caqui	70
Figura 3 – Fluxograma do procedimento de extração com acetato de etila, avaliado para a determinação de agrotóxicos em caqui.....	71
Figura 4 – Fluxograma do método QuEChERS proposto a ser validado neste estudo	75
Figura 5 - Cromatograma de íons totais obtido por UHPLC-MS/MS a partir de uma solução padrão 20 µg L ⁻¹ em acetonitrila.	80
Figura 6 - Representativo do número de compostos com recuperações entre 70 a 120%, nos testes T1 a T5	82
Figura 7 - Aparência dos extratos obtidos pela extração utilizando as variações do método QuEChERS com e sem a etapa de limpeza.....	83
Figura 8 - Avaliação visual dos extratos obtidos, após a análise gravimétrica, utilizando as variações do método QuEChERS com e sem etapa de limpeza por d-SPE	83
Figura 9 - Comparação entre as quantidades de coextrativos não-voláteis retidos em cada variação do método QuEChERS, com e sem etapa de limpeza	84
Figura 10 - Níveis de recuperações satisfatórias (70-120%) para os T1 e T12.....	86
Figura 11 - Aspecto dos extratos obtidos utilizando QuEChERS acetato com e sem a adição de C18	86
Figura 12 - Aspecto visual dos testes gravimétricos para QuEChERS acetato com e sem o uso de C18	87
Figura 13 – Número de compostos obtidos com os testes de diluições de 10, 20, 40, 50 e 100 vezes sem efeito matriz, com efeito de matriz médio e alto para as concentrações de 2 (a), 5 (b), 10 (c) e 20 (d) µg L ⁻¹	90
Figura 14 - Teor de coextrativos, em mg, para as diluições de 10, 20 e 40 vezes....	91
Figura 15 - Mudança no aspecto visual das colorações dos extratos conforme as diluições.....	91
Figura 16 – Procedimento QuEChERS validado, envolvendo etapas de extração, partição e diluição dos extratos	92

Figura 17 - Cromatogramas representativos para avaliação da seletividade para o composto (a) carbendazim (solução padrão de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$), preparada na amostra “branco” de caqui e (b) extrato branco da matriz caqui.	93
Figura 18 – Gráfico representativo do efeito matriz ao comparar as curvas de trabalho em solvente (acetonitrila - CTS) e na matriz (caqui - CTM), para o composto atrazina, com diluição de 20 vezes.	95
Figura 19 – Cromatograma positivo para o fungicida carbendazim da amostra A3, sobreposto ao seu LOQ e amostra branco de caqui.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela TACO de composição de caqui, chocolate, cru por 100 g de parte comestível: centesimal, minerais, vitaminas e colesterol	29
Tabela 2 - Valores de vitamina C e teor de carotenoides em 100 g de frutos de caqui sem sementes (<i>Rojo Brillante</i>) analisados na temporada de 2017, em Valência.....	30
Tabela 3 - Conteúdo mineral em mg a cada 100 g de frutos de caqui com casca (variedade <i>Rojo Brillante</i>) analisado na temporada de 2017, em Valência	32
Tabela 4 - Influência da presença da casca do caqui nos valores de pH, ácido ascórbico, licopeno e polifenólicos a cada 100 g de fruta	32
Tabela 5 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos	35
Tabela 6 – Ingredientes ativos com o ranking de vendas aproximadas no Brasil	37
Tabela 7 - Compostos registrados no Brasil para uso na cultura de caqui	38
Tabela 8 – Valores de LMR para caqui de acordo com ANVISA e UE	39
Tabela 9 - Métodos de preparo de amostra empregados para extração de agrotóxicos em caqui, com sua respectiva instrumentação, limites de detecção (LOD), quantificação (LOQ) e recuperação (%).....	45
Tabela 10 – Amostras de caqui avaliadas no presente estudo, sua variedade e localidade de coleta.....	63
Tabela 11 – Compostos a serem determinados, sua pureza, fórmula molecular, massa molecular (g mol^{-1}), pKa, log Kow, Koc (mg L^{-1}) e solubilidade em água (mg L^{-1}).....	65
Tabela 12 – Condições cromatográficas do sistema UHPLC-MS/MS Xevo TQ-XS..	68
Tabela 13 - Gradiente de fase móvel utilizado na determinação de resíduos de agrotóxicos em caqui por UHPLC-MS/MS Xevo TQ-XS	68
Tabela 14 – Resumo dos testes iniciais avaliados para a determinação de agrotóxicos em caqui através do método QuEChERS	70
Tabela 15 – Identificação dos testes gravimétricos utilizando os métodos QuEChERS	71
Tabela 16 – Resumo dos testes de diluição realizados para a determinação de agrotóxicos em caqui	73
Tabela 17 – Parâmetros de validação avaliados no desenvolvimento do método analítico proposto	74

Tabela 18 - Compostos determinados por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos tempos de retenção (t_R), voltagem do cone (VC), íons precursores e produto, e energias de colisão (EC) utilizados	76
Tabela 19 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS desenvolvido no presente trabalho: LOQ, LOD, linearidade (coeficiente de determinação, r^2), exatidão e precisão em termos de repetitividade e precisão intermediária.....	98
Tabela 20 -Resíduos de agrotóxicos, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, encontrados nas amostras de caqui analisadas através do método validado, utilizando QuEChERS e UHPLC-MS/MS	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adstringente
ACN	Acetonitrila
AGROFIT	Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação de Químicos Analíticos Oficiais, do inglês <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
C18	Octadecilsilano
CGAA	Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins
CMD	Concentração média determinada
CODEVASF	Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco
CTM	Curva de trabalho na matriz
CTS	Curva de trabalho no solvente
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detecção por arranjo de diodos, do inglês <i>diode array detection</i>
DAS	Secretaria da Defesa Agropecuária
DFIA	Departamento de Fiscalização de Insumos Agrícolas
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DQ-UFSM	Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva, do inglês <i>dispersive solid phase extraction</i>
EC	Comissão Europeia, do inglês <i>European Commission</i>
EC	Energia de colisão
EM	Efeito matriz
ESI	Ionização por eletronebulização, do inglês <i>electrospray ionization</i>
FA	Fortificação na amostra
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês <i>Food and Agriculture Organization</i>
FL	Fluorescência
GC	Cromatografia gasosa, do inglês <i>gas chromatography</i>
GCB	Carbono grafitizado, do inglês <i>graphitized carbon black</i>
GC-MS/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês <i>gas chromatography coupled to tandem mMass spectrometry</i>
HAc	Ácido acético
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IEA	Instituto de Economia Agrícola
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LARP	Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas

LC	Cromatografia líquida, do inglês <i>liquid chromatography</i>
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês <i>liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i>
LLE	Extração líquido-líquido, do inglês <i>liquid-liquid extraction</i>
LMR	Limite máximo de resíduos
LOD	Limite de detecção, do inglês <i>limit of detection</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>limite of quantification</i>
MAE	Extração assistida por micro-ondas, do inglês <i>microwave assisted extraction</i>
MAPA	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MASE	Extração com membrana assistida por solvente, do inglês <i>membrane-assisted solvent extraction</i>
MS	Espectrometria de massas, do inglês <i>mass spectrometry</i>
MS/MS	Espectrometria de massas em série, do inglês <i>tandem mass spectrometry</i>
MSPD	Dispersão da matriz em fase sólida, do inglês <i>matrix solid phase dispersion</i>
NA	Não adstringente
ONU	Organização das Nações Unidas, do inglês <i>United Nations Organization</i>
PA	Padrão na amostra
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PC	Padrão de controle
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Padrão interno
PLE	Extração acelerada por solventes, do inglês <i>pressurized liquid extraction</i>
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PSA	Amina primária secundária, do inglês <i>primary secondary amine</i>
QqQ	Triplo quadrupolo
QuEChERS	Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, acrônimo do inglês <i>quick, easy, cheap, effective, rugged and safe</i>
r	Coeficiente de correlação
r ²	Coeficiente determinação
rpm	Rotações por minuto
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>relative standard deviation</i>
SEFAGs	Serviços de Fiscalização Agropecuária
SFE	Extração com fluido supercrítico, do inglês <i>supercritical fluid extraction</i>
SIM	Monitoramento de íon selecionado, do inglês <i>selected ion monitoring</i>
SPE	Extração em fase sólida, do inglês <i>solid phase extraction</i>
SPME	Microextração em fase sólida, do inglês <i>solid phase microextraction</i>
SRM	Monitoramento de reações selecionadas, do inglês <i>selected reaction monitoring</i>
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TIC	Cromatograma de íons totais
t _R	Tempo de retenção
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra alta eficiência, do inglês <i>ultra high performance liquid chromatography</i>

UV/Vis
VC
WHO

Ultravioleta/visível

Voltagem do cone

Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 OBJETIVOS	20
1.1.1 Objetivos Específicos	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 CAQUI: CARACTERÍSTICAS E HISTÓRICO	21
2.1.1 Variedades	23
2.1.2 Dificuldades no cultivo e problemas fitossanitários	24
2.1.3 Produção de caqui no Brasil e no Rio Grande do Sul	26
2.1.4 Composição do caqui	28
2.2 AGROTÓXICOS.....	33
2.2.1 Resíduos de agrotóxicos	33
2.2.2 Classificação dos agrotóxicos	34
2.2.3 Risco toxicológico.....	35
2.2.4 Uso e fiscalização dos agrotóxicos	36
2.2.5 Monitoramento dos resíduos de agrotóxicos em alimentos.....	37
2.3 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAQUI	41
2.3.1 Método QuEChERS	47
2.3.2 Método QuEChERS sem a etapa de limpeza	50
2.4 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS.....	51
2.4.1 Cromatografia líquida de ultra alta eficiência.....	54
2.4.2 Espectrometria de massas	54
2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	55
2.5.1 Seletividade.....	56
2.5.2 Linearidade, sensibilidade e curva analítica	57
2.5.3 Faixa de trabalho.....	58

2.5.4 Efeito matriz	58
2.5.5 Limite de detecção	58
2.5.6 Limite de quantificação.....	59
2.5.7 Exatidão	59
2.5.8 Precisão	60
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
3.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	61
3.2 REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS	62
3.3 AMOSTRAS DE CAQUI.....	63
3.4 COMPOSTOS SELECIONADOS E PREPARO DE SOLUÇÕES ANALÍTICAS ..	64
3.5 UTILIZAÇÃO DO PADRÃO INTERNO (PI) E PADRÃO DE CONTROLE (PC) ..	67
3.6 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAQUI.....	68
3.7 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAQUI UTILIZANDO UHPLC-MS/MS	69
3.7.1 Testes iniciais.....	69
3.7.2 Avaliação gravimétrica dos coextrativos obtidos após realização da etapa de extração	71
3.7.3 Avaliação do uso de C18 na etapa de limpeza	72
3.7.4 Avaliação de diluições dos extratos obtidos após realização da etapa de extração e o efeito matriz relacionado	73
3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE PROPOSTO.....	74
3.8.1 Método QuEChERS validado neste estudo.....	75
3.8.2 Aplicação do método em amostras comerciais	75
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAQUI	76

4.2 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAQUI.....	80
4.2.1 Avaliação das condições de extração	80
4.2.2 Avaliação gravimétrica dos coextrativos presentes no extrato	82
4.2.3 Avaliação do uso de C18 na etapa de limpeza do extrato	85
4.2.4 Avaliação de diluições dos extratos da etapa de extração e o efeito matriz relacionado.....	87
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO.....	92
4.3.1 Seletividade.....	93
4.3.2 Linearidade e faixa de trabalho	93
4.3.3 Sensibilidade	94
4.3.4 Efeito matriz	94
4.3.5 Limite de detecção e de quantificação	95
4.3.6 Exatidão e precisão.....	96
4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO EM AMOSTRAS COMERCIAIS.....	102
5 CONCLUSÕES	105
6 DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
ANEXO A – FLUXOGRAMA CONTENDO TODOS OS TESTES REALIZADOS NA OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA DA PRESENTE PESQUISA	118

1 INTRODUÇÃO

A todo momento agrotóxicos estão sendo empregados no cultivo de inúmeros alimentos e diversos tipos de resíduos e contaminantes orgânicos podem estar presentes nestas culturas. O uso de agrotóxicos de diferentes classes (herbicidas, inseticidas, fungicidas, acaricidas, entre outros) na agricultura apresenta benefícios econômicos, uma vez que asseguram o controle e o combate de pragas e doenças, protegendo a qualidade da produção. Por outro lado, os consumidores podem ser expostos a estes compostos químicos através dos alimentos (BASSO; SIQUEIRA; RICHARDS, 2021).

O caqui é um fruto muito apreciado para consumo *in natura* e também, algumas vezes, é utilizado na produção de outros produtos como frutas secas, geleias e vinagres. No ano de 2018 e 2019 o caqui figurou entre as vinte frutas mais produzidas no Brasil, deixando o país em quinto lugar no ranking de produção mundial do fruto. Ainda, no ano de 2019 a produção de caqui no país atingiu pouco mais de 168 toneladas, e o volume de exportação do fruto cresce anualmente (FAOSTAT, 2021). O estado de São Paulo é referência no cultivo de caqui, sendo responsável pela maior parte da produção, a região de Mogi das Cruzes é conhecida como a “Terra do Caqui”. Apesar disso, o estado do Rio Grande do Sul vem se destacando, já que o cultivo de caqui é uma das culturas mais apropriadas para produção no estado, graças ao clima subtropical, a cultivar se adapta perfeitamente as condições climáticas da região (IBGE, 2021).

O fruto de caqui possui incontáveis variedades, algumas delas se classificam de acordo com a sua adstringência. As variedades de caqui mais consumidas no país são Rama Forte, Taubaté, Fuyu e Giombo, esta última é conhecida pelos brasileiros como caqui Chocolate, sendo um fruto muito apreciado pelo seu sabor e pelas suas ótimas características nutricionais. Contudo, essa cultivar apresenta problemas de comercialização e pós colheita, para a exportação os frutos devem atender a requisitos de qualidade, o que limita os transportes a longas distâncias. Ainda, durante o armazenamento do caqui ocorrem muitas perdas, principalmente em decorrência do excesso de maturação, perda de firmeza, podridões e à incidência de escurecimento da casca dos frutos (VIEITES, 2012).

O caqui é altamente perecível e são diversos os problemas relacionados à sua conservação, desde o momento da colheita, por isso, algumas técnicas foram

desenvolvidas e estão sendo utilizadas com o intuito de aumentar a vida de prateleira do fruto, sendo necessário o uso de um controle fitossanitário (SILVA *et al.*, 2011). Outro fator complexo está no curto período de safra do fruto, o que afeta o preço do produto e a concorrência com frutas mais tradicionais, como a laranja, banana e maçã (VIEITES, 2012).

Atualmente, há programas que objetivam controlar a quantidade de resíduos de agrotóxicos em alimentos, como o *Codex Alimentarius* e o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Esse controle é realizado baseado em limites máximos de resíduos (LMRs), que são estabelecidos por órgãos como a Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA), no Brasil, e o *Codex Alimentarius*. Amostras com níveis acima do LMR indicam a aplicação incorreta de agrotóxicos. Produtos não autorizados também podem ser encontrados (ANVISA, 2019b).

Com isso, considerando os riscos que o uso de agrotóxicos na produção de alimentos apresenta aos trabalhadores e consumidores, que o Brasil se destaca negativamente como um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, e que a produção e o consumo do caqui vêm crescendo no Brasil, o monitoramento de resíduos de agrotóxicos no fruto de caqui é de grande importância. Ainda, destaca-se que o estabelecimento de métodos multirresíduo modernos para a determinação de agrotóxicos é imprescindível para permitir a avaliação da observância dos LMRs visando proteger a saúde dos consumidores e incentivar a comercialização no Brasil e a exportação do fruto.

1.1 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é desenvolver e validar um método de preparo de amostras simples, barato e rápido para determinação multirresíduo de agrotóxicos em caqui utilizando o sistema UHPLC-MS/MS.

1.1.1 Objetivos Específicos

- I. Avaliar o melhor procedimento de extração para determinação de resíduos de agrotóxicos em caqui;
- II. Avaliar a utilização de diferentes sorventes na remoção de interferentes da matriz, bem como a viabilidade do uso de diluições maiores do extrato para evitar a etapa de limpeza do extrato;
- III. Validar o método desenvolvido de forma a atender os parâmetros da legislação brasileira para determinação de resíduos de agrotóxicos em caqui;
- IV. Aplicar o método desenvolvido em amostras comerciais de caqui provenientes de diferentes regiões de produção.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CAQUI: CARACTERÍSTICAS E HISTÓRICO

Caqui é o fruto do caquizeiro (*Diospyros kaki* L.) e pertence ao gênero *Diospyrus* e à família *Ebenaceae*, esta família possui diversas espécies de grande importância comercial, contudo, a *Diospyros kaki* é a representante mais importante (KLUGE; TESSMER, 2018). Os frutos de caqui começam a crescer quando as árvores atingem por volta de três anos e ao iniciarem o desenvolvimento, os frutos são esverdeados, já a fruta madura tem coloração laranja ou avermelhada, dependendo da variedade (NEUWALD *et al.*, 2009).

Para cada cultivar existe uma época de colheita e as condições climáticas também podem alterar a duração deste período. No Brasil, nas regiões tradicionalmente produtoras, a colheita é realizada no primeiro semestre do ano, principalmente entre os meses de fevereiro a maio. Entretanto, no país, o tempo de colheita pode variar em função das condições climáticas, das variedades cultivadas e dos tratos culturais empregados, podendo se estender de fevereiro a junho. Nas regiões de clima quente, a safra é precoce, já em regiões mais frias, a colheita é mais tardia (LOPES *et al.*, 2014). Já em países europeus e asiáticos, as safras ocorrem em períodos inversos aos países do hemisfério sul, o que beneficia a exportação (KLUGE; TESSMER, 2018).

A denominação do gênero *Diospyrus* provem do grego, e significa “Alimento de Zeus” e seria, conforme as lendas, a fruta preferida do deus da mitologia grega, já caqui vem do japonês *Kaki* (KLUGE; TESSMER, 2018). O caquizeiro é originário da Ásia, onde tem seu cultivo consolidado há séculos. O cultivo do fruto é oriundo principalmente de países como China, onde há registros de seu cultivo séculos antes de Cristo, e Japão, onde a espécie *Diospyros kaki* foi introduzida durante o século VII (MARTÍNEZ-CALVO; BADENEZ; LLÁCER, 2012). O fruto faz parte até mesmo de uma lenda popular japonesa, que conta a história de um samurai, herói do país no século XII. Já na Coreia o fruto foi introduzido no século XIV e espalhou-se para diversos continentes devido à sua forte adaptação às regiões tropicais e temperadas. Do continente asiático espalhou-se para diversas regiões devido à sua forte adaptação a locais de clima temperado e subtropical (KLUGE; TESSMER, 2018).

Entre os séculos XVII e XIX há registros que o cultivo de caqui foi iniciado na Europa e em países da região mediterrânea, onde as espécies do gênero *Diospyrus* eram cultivadas em jardins e pomares, junto com frutas cítricas e oliveiras (MARTÍNEZ-CALVO; BADENEZ; LLÁCER, 2012). Por volta do ano de 1800 a espécie *Diospyrus kaki* foi introduzida nos Estados Unidos da América e os cultivares foram adaptados e expandidos. A espécie conhecida como *Diospyros virginiana L.* é nativa da América do Norte, e a árvore origina o fruto conhecido como caqui americano. Esta árvore também dá origem a uma madeira de grande qualidade, que é usada, também, como porta-enxerto para outros cultivares de caqui. Posteriormente, a espécie *Diospyros kaki L.* foi introduzida na Austrália e na Nova Zelândia (KLUGE; TESSMER, 2018).

Ainda que o Brasil figure entre os maiores produtores mundiais de caqui, nacionalmente, o fruto ainda é considerado, por alguns, como uma fruta exótica, termo que tem por definição como espécies que não são originárias do país e foram trazidas por meio de processos de colonização ou até mesmo posteriormente, com propósitos comerciais (FELIPPE, 2004).

A cultura do caquizeiro foi introduzida em São Paulo no final do século XIX, com variedades conhecidas como adstringentes, vindas da França. Na época tais variedades não foram muito aceitas pelo público consumidor. Contudo, a partir de 1920, com a chegada de imigrantes japoneses, que desembarcavam no país trazendo mudas da espécie de inúmeras variedades e domínio e tecnologia de produção, o cultivo do caqui iniciou seu processo de grande expansão (CORSATO; SCARPARE; VERDIAL, 2005). A produção teve início em fazendas, que antes, se restringiam ao cultivo de café, e a cultivar agradou o gosto popular e se adaptou muito bem ao clima ao clima subtropical e temperado brasileiro (SILVA *et al.*, 2011).

Segundo Mowat e colaboradores (1995) e Park e colaboradores (2004), o caquizeiro se firmou como a espécie com maior capacidade de adaptação ao clima tropical, quando comparada a outras árvores frutíferas de clima temperado, sendo cultivada com êxito em diversos países tropicais e subtropicais. Com isto, o cultivo de caqui foi difundido pelos estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, nas partes altas de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo (LOPES *et al.*, 2014).

2.1.1 Variedades

A família Ebenácea agrega cerca de 200 espécies e mais de 800 variedades, apenas para caqui existem centenas. O caquizeiro é uma espécie caducifólia, ou seja, é uma planta que, em uma certa estação do ano, perde suas folhas. No geral, os cultivares comerciais apresentam apenas flores femininas polinizadas. O fruto originário da árvore é do tipo baga e varia quanto ao tamanho e a forma de acordo com sua variedade e pode pesar, geralmente, de 200 a 350 g e conter até oito sementes (KLUGE; TESSMER, 2018).

A cor do fruto pode ser de amarela a vermelha, podendo ainda, ser marrom ou esverdeada. Quando verde contém tanino, que possui sabor amargo, e que com sua adstringência, tem a função de proteger as plantas e o fruto dos animais herbívoros (ITTAH, 1993). Quando maduro possui a polpa mole, doce e saborosa (KLUGE; TESSMER, 2018).

Quanto as variedades de cultivares de *Diospyros kaki* L., existem inúmeras classificações que podem ser encontradas na literatura. As variedades podem ser classificadas de acordo com a polinização, ou não, das flores, com a persistência da adstringência e com as alterações de cor da polpa e da casca. Assim, a classificação pode ser como: constante de polinização (PC), para frutos que não apresentam alteração da cor da polpa devido à polinização; variante de polinização (PV), para frutos de polpa clara quando partenocárpicos, ou seja, quando não possuem semente (não polinizados) e polpa escura, quando com semente (polinizados). Essas classificações ainda se dividem em adstringente (A) e não adstringente (NA) de acordo com a presença ou ausência de adstringência nos frutos maduros (YONEMORI; SUGIURA; YAMADA, 2000).

Com isso, as variedades de caqui podem ser classificadas de acordo com os tipos básicos: PCA, tendo como exemplos a Taubaté, Hachiya, Pomelo e Rubi, PCNA, com as variedades Fuyu, Jiro e Hana Fuyu, e PV adstringentes, como exemplo Aizumishirazu, Rama Forte, Giombo e Rojo Brillante ou PV não adstringentes, como as variedades Zenjimarú, Shogatsu e Mizushima. Ainda, os cultivares do caquizeiro de origem japonesa podem ser classificados apenas de acordo com a presença de tanino, como: taninoso (*sibugaki*), variável (*variant sibugaki* ou *variant amagaki*) e doce (*amagaki*). Como taninoso temos como exemplo a Pomelo, Rubi e Taubaté, doce

como a Fuyu, Jirô e Fuyuhana e variável como Giombo e Rama Forte (BLUM *et al.*, 2008).

As variedades de caqui mais consumidas no país são Rama Forte, Taubaté, Fuyu e Giombo, esta última também é muito conhecida pelos brasileiros como caqui Chocolate. A cultivar Giombo pode ter ou não sementes, quando os frutos dessa variedade são polinizados e as sementes são formadas, estas liberam fenóis que levam a oxidação da polpa, tornando a sua coloração mais escura, o que lembra chocolate. Alguns cultivares como o Giombo são classificados de maneira diferente de acordo com cada autor, Martins e Pereira (1989), classificam a variedade como pertencente ao tipo variável, apresentando frutos com polpa bastante taninosa, quando sem semente, e sem adstringência, quando possuem numerosas sementes (KLUGE; TESSMER, 2018).

A árvore chamada de caquizeiro pode ser cultivada no sistema de agricultura natural ou orgânica, condição em que o cultivar atualmente está valorizado. Ainda, uma enorme parte dos caquis é vendida fresca, para consumo in natura, no entanto, em regiões do país de imigração japonesa, as frutas podem ser industrializadas e comercializadas como frutas secas e vinagre (SILVA *et al.*, 2011).

Os cultivares de sabor adstringente necessitam da remoção previa dos taninos, para possibilitar o consumo. Essa remoção denomina-se destanização, e é um processo utilizado para a remoção ou redução da adstringência dos frutos. Os caquis não taninosos são os que geram maior interesse do produtor, ainda mais devido à possibilidade de uma colheita tardia, além da melhor aceitação por parte dos consumidores, como o caso da cultivar Fuyu. Já para algumas variedades, como o caqui Rama Forte, o processo de destanização é bastante utilizado (SILVA; BAPTISTELA; FRANCISCO, 2005). Em estudos realizados no Brasil, com diversas cultivares, as variedades Rama Forte e Giombo são as que têm apresentado melhores resultados em termos de produção e qualidade dos frutos (SILVA *et al.*, 2011).

2.1.2 Dificuldades no cultivo e problemas fitossanitários

Apesar de ser um fruto muito apreciado pelo seu sabor e pelas características nutricionais, o caqui apresenta alguns problemas de comercialização e pós colheita. Com o passar dos anos o volume de cultivares de caqui exportados aumentou consideravelmente, contudo, para este fim os frutos devem atender a requisitos de

qualidade da fruta, o que limita os transportes a longas distâncias. Durante o armazenamento da cultivar ocorrem muitas perdas, em maior importância, ao excesso de maturação, perda de firmeza, podridões e à incidência de escurecimento da casca dos frutos (VIEITES, 2012).

Segundo Lemos e colaboradores (2008), as frutas *in natura* são altamente perecíveis e são diversos os problemas relacionados à sua conservação, desde o momento em que são colhidas. Por isso, diversas técnicas são utilizadas visando aumentar a vida de prateleira das frutas, como o aumento da umidade relativa do ar, diminuição da temperatura e uso de embalagens, atmosfera modificada e coberturas comestíveis, como biofilmes e ceras (SILVA *et al.*, 2011).

Outro problema está no curto período de safra, momento de grande oferta do fruto, o que acaba desvalorizando o produto e afetando a rentabilidade da cultura. Após o período de safra, os preços normalmente começam a aumentar, contudo, é um desafio para os produtores conservar a qualidade das frutas até esta época. Ainda, a cultivar precisa enfrentar a concorrência com frutas mais tradicionais, como a laranja, banana e maçã (VIEITES, 2012).

Os produtores de caqui ainda precisam enfrentar outras adversidades. O caquizeiro possui diversos problemas fitossanitários durante seu cultivo que culminam na diminuição da produtividade, na qualidade da produção e, até mesmo na perda do produto comercial. Existem diversos fungos que causam podridões pós colheita em caqui. No Brasil, a alta incidência do fungo *Rhizopus stolonifer*, Podridão mole, em *Diospyrus kaki* L., principalmente em condições de muita chuva, no decorrer do período de desenvolvimento e maturação dos frutos e do manuseio inadequado durante colheita e pós colheita, é um fator limitante na qualidade dos frutos para comercialização (CIA *et al.*, 2010).

A doença considerada como a mais severa e que causa graves danos na cultura do caqui é a antracnose, causada por espécies de fungos do gênero *Colletotrichum*, em maior relevância, por *Colletotrichum horii*, e afeta folhas, ramos e frutos, que em consequência ocorre a desfolhação, podridão e queda dos frutos. A variável mais suscetível a antracnose é a Giombo (BLOOD; ROZWALKA; MIO, 2015). Outras doenças relacionadas à cultura são a cercosporiose (*Cercospora Kaki*), o mofo cinzento (*Botrytis cinerea*), pestalozia (*Pestalotiopsis spp.*), a queima-dos-fios (*Cerotobasidium sp.*) e a galha da coroa (*Agrobacterium tumefaciens*). A cercosporiose, causada por um fungo e também pela condição ambiental de elevada

umidade relativa e temperaturas amenas, é disseminada pelo vento e água. A variedade Fuyu é a mais suscetível a esta patologia (TECCHIO; PEREIRA; MOTTA, 2019).

Entre as pragas, no cultivo do caqui, encontram-se a lagarta-dos-frutos (*Hypocala andremona*), tripes (*Heliethrips haemorrhoidalis*), cochonilhas (*Pseudococcus spp.*), ácaro rajado (*Tetranychus urticae*) e a mosca-das-frutas (*Anastrepha spp* e *Ceratitis capitata*). A lagarta-dos-frutos causa danos no caqui como perfurações e desfolhamento. O tripes causam danos nas folhas e frutos, fazendo com que as folhas atacadas caiam prematuramente e a casca dos frutos resseque, podendo ocorrer a podridão da fruta. As cochonilhas sugam os frutos e em consequência ocorre a formação de uma mancha escura (TECCHIO; PEREIRA; MOTTA, 2019).

2.1.3 Produção de caqui no Brasil e no Rio Grande do Sul

O Brasil é um conhecido grande produtor e exportador de frutas, a produção de frutas *in natura* no país segue superior a 40 milhões de toneladas por ano, e o volume pode ter variado de 44,3 a 44,5 milhões de toneladas no ano de 2020 (ABRAFRUTAS, 2021). Mesmo com todos os problemas causados pela pandemia a produção de frutas no país não enfraqueceu e o volume é semelhante ao produzido em 2019. O país foi o terceiro maior produtor de frutas do mundo, em 2018, ficando atrás da China e da Índia e o setor fruticultor é o que mais gera empregos dentro do agronegócio (HORTIFRUTI, 2021). Ainda, no ano de 2020, o mercado brasileiro bateu seu recorde, exportando mais de um milhão de toneladas de frutas frescas e derivados, o que rendeu ao país mais de US\$ 875, e os principais destinos foram os Países Baixos, Estados Unidos da América e o Reino Unido (ABRAFRUTAS, 2021; FAOSTAT, 2021).

Dentre as frutas que merecem destaque no mercado nacional está o caqui. No ano de 2018 e 2019 a cultivar figurou entre as vinte frutas mais produzidas no país. Em 2019, o Brasil ficou em quinto lugar no ranking de produção mundial de caqui, a China lidera o mercado e produziu incríveis 3.207.516 toneladas, em seguida Coreia, Japão e Azerbaijão. O continente asiático concentra uma enorme porcentagem da produção mundial (FAOSTAT, 2021).

No ano de 2019, no Brasil, a produção de caqui atingiu pouco mais de 168 toneladas e o valor da produção está estimado em 294.423 milhões de reais. No ano

de 2018 foram menos toneladas produzidas e um maior valor arrecadado, o que demonstra que a menor oferta de fruta eleva o preço da mesma, o que contribuí para a receita total do mercado fruticultor. Ainda, em 2019, o país exportou uma grande quantidade de caqui, o que gerou mais de US\$ 671 mil (HORTIFRUTI, 2021). O país que mais exporta a fruta atualmente é a Espanha e o maior importador a Rússia (FAOSTAT, 2021).

O cultivo do caqui vem ganhando importância no país, tanto no aumento da produção quando nos hectares de área plantada, o que gera um aumento da oferta do produto no mercado interno e incentiva os produtores a exportar parte da produção. As regiões sul e sudeste são as maiores produtoras, o estado de São Paulo lidera há mais de 10 anos a produção de caqui no país, seguido do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Paraná (IBGE, 2021).

O estado de São Paulo merece destaque na produção de caqui, a região atende tanto o mercado interno como a exportação e em 2019 produziu mais de 80 mil toneladas, em um comparativo, no mesmo ano, o estado produziu quase 7 mil toneladas a mais do que em 2011, o que demonstra o crescimento desta cultura (IBGE, 2021). Em São Paulo as cultivares predominantes produzidas são Taubaté, Rama Forte e Fuyu (FIORAVANÇO; PAIVA, 2007).

De acordo com dados do Instituto de Economia Agrícola (IEA), apenas o município de Mogi das Cruzes, em São Paulo, contribui com mais de 50% da produção regional da fruta, sendo conhecida com a “Terra do caqui”. Outra região que vem surpreendendo na produção de caqui é o Vale do São Francisco. O caquizeiro é uma planta tipicamente subtropical e na região nordeste, o cultivo de caqui acontecia apenas na Bahia, em zonas de altitude acima de 700 metros. Contudo, em 2006, a Embrapa Semiárido, em parceria com a Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco (CODEVASF), iniciou pesquisas para a implantação da cultura do caquizeiro no Vale do São Francisco, obtendo a primeira safra em 2010. Esta pesquisa busca trazer alternativas aos produtores, tendo como exemplo outras culturas atípicas que já tiveram seu cultivo consolidado no vale. Considerando as variáveis climáticas da região, a cultura do caqui demonstra um enorme potencial agrônômico e econômico (LOPES *et al.*, 2014).

Nos testes realizados durante os estudos demonstrou-se que a indução da floração no cultivo de caqui pode ser realizada em qualquer mês do ano, e com isso, o período de colheita pode ser direcionado para os meses de baixa oferta da fruta no

mercado, o que proporciona melhores preços para os produtores (FIORAVANÇO; PAIVA, 2007). Ainda, o cultivo irrigado de caqui vem sendo estudado nas áreas do sertão nordestino, e é uma opção para produtores que buscam alternativas de negócios para as áreas irrigadas do Submédio do Vale do São Francisco e durante as pesquisas Giombo e Rama Forte foram as variedades que se destacaram (LOPES *et al.*, 2014).

O cultivo de caqui é uma das culturas mais apropriadas para produção no estado do Rio Grande do Sul, graças ao clima subtropical, a cultivar se adapta perfeitamente as condições climáticas da região. Ainda, em decorrência do clima regional, existe a possibilidade da ampliação da colheita de algumas variedades, sem perdas significativas e se destacam técnicas rústicas de controle de pragas e doenças no cultivo de frutas gaúcho, o que favorece a produção (FIORAVANÇO; PAIVA, 2007). Por isso a cultura do caqui apresenta um grande crescimento e importância no Rio Grande do Sul.

O estado figura como segundo produtor de caqui no país há mais de dez anos, e a quantidade produzida em 2019 foi de mais de 39 mil toneladas, o valor da produção ficou em mais de 57 milhões de reais e a área destinada a colheita foi de cerca de 2.591 hectares. No estado, a produção da cultivar também cresce expressivamente ao longo dos anos, foram cerca de 8 mil toneladas a mais do que em 2009 (IBGE, 2021) A principal região produtora de caqui no Rio Grande do Sul é a nordeste, em 2019, o município de Caxias do Sul produziu, sozinho, mais de 19 mil toneladas, desbancando, até mesmo a região de Mogi das Cruzes. A produção no estado é seguida pelos municípios de Farroupilha, Antônio Prado, Ipê e Pinto Bandeira. As principais cultivares de caqui produzidas no Rio Grande do Sul são Fuyu e Kyoto (FIORAVANÇO; PAIVA, 2007).

2.1.4 Composição do caqui

O caqui é uma importante fonte de proteínas, fibras, minerais, carboidratos, carotenoides, compostos fenólicos e vitaminas. A fruta ainda apresenta baixo índice calórico e diversos nutrientes, onde se destacam minerais como potássio, magnésio, cálcio, ferro, manganês, zinco e cobre (DÍAZ *et al.*, 2020). A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) - apresenta a composição centesimal do caqui apenas para a variedade do tipo chocolate, conhecido também como caqui Giombo,

como apresentado na Tabela 1, a seguir. Em média, em cada fruta há 79,7% (m/m) de umidade, ainda são encontrados, em pequenas quantidades, proteínas e lipídeos. Na tabela ainda é possível verificar o teor de carboidratos, que constitui em média 19,3 g a cada 100 g de fruta, o teor de fibras alimentares e de diversos minerais (TACO, 2011).

Tabela 1 – Tabela TACO de composição de caqui, chocolate, cru por 100 g de parte comestível: centesimal, minerais, vitaminas e colesterol

Composição	Teor
Umidade (%)	79,7
Energia (kcal)	71
	(kJ)
	299
Proteína (g)	0,4
Lipídeos (g)	0,1
Colesterol (mg)	NA
Carboidrato (g)	19,3
Fibra Alimentar (g)	6,5
Cinzas (g)	0,5
Cálcio (g)	18
Magnésio (mg)	9
Manganês (mg)	0,39
Fósforo (mg)	18
Ferro (mg)	0,1
Sódio (mg)	2
Potássio (mg)	164
Cobre (mg)	traço
Zinco (mg)	0,2
Vitamina C (mg)	29,6

Fonte: Adaptação de TACO, 2011, p.38. *NA – não aplicável

A cultivar possui uma enorme variedade de antioxidantes, principalmente vitaminas antioxidantes, como os carotenoides (VINHA et al., 2011). Os carotenoides são compostos pigmentados, solúveis em gordura, e podem ser classificados em dois grupos principais de acordo com sua composição química: carotenos ou compostos de hidrocarbonetos (como exemplos α -caroteno, β -caroteno, licopeno) e oxicarotenos ou xantofilas (como exemplos luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, violaxantina) (DÍAZ et al., 2020).

O β -caroteno, o licopeno e a luteína são alguns dos carotenoides encontrados em frutos de caqui. Estes pigmentos são os responsáveis pelas cores amareladas, alaranjadas e avermelhadas encontradas no fruto. Além disso, estes compostos possuem um papel de grande importância na saúde humana, principalmente pela presença de provitamina A e também em função da atividade antioxidante. No processo de amadurecimento da fruta, o teor de carotenoides aumenta e ocorrem mudanças na composição dos compostos fenólicos, além da degradação da clorofila. Estas alterações provocam transformações na coloração dos frutos de caqui (DÍAZ et al., 2020; VINHA et al., 2011).

O caqui ainda é rico em ácido ascórbico, a vitamina C, que está relacionada com a absorção de ferro, produção de colágeno e melhora do sistema imune, sendo de presença muito importante no corpo humano. Estudos demonstraram que os frutos de caqui possuem maiores quantidades de vitamina C do que outras frutas de grande consumo como maçã, pera, ameixa, uva e figo (DÍAZ et al., 2020). A Tabela 2 demonstra o teor de ácido ascórbico e de carotenoides presentes em caqui da variedade *Rojo Brillante*.

Tabela 2 - Valores de vitamina C e teor de carotenoides em 100 g de frutos de caqui sem sementes (*Rojo Brillante*) analisados na temporada de 2017, em Valência

Lote	Ácido Ascórbico (AA)	Ácido Desidroascórbico (DHA)	Total Vitamina C	Total Carotenóides
1	1,56 mg \pm 0,49	7,71 mg \pm 0,60	9,43 mg \pm 1,04	40,86 μ g \pm 4,31
2	1,45 mg \pm 0,01	8,80 mg \pm 0,76	10,25 mg \pm 0,76	75,84 μ g \pm 5,33
3	1,22 mg \pm 0,19	3,56 mg \pm 0,70	4,62 mg \pm 0,41	60,24 μ g \pm 1,54

Fonte: Adaptação de DÍAZ et al., 2020.

A fruta ainda possui um alto teor de fibras, em comparação com frutas muito populares como maçã, laranja, pera, pêssego e banana, a quantidade desse composto é bem maior em caqui. No cultivar podemos encontrar a fibra insolúvel (celulose, hemicelulose e lignina) e a fibra solúvel (pectinas, gengivas e mucilagens) e estas possuem diversas propriedades medicinais (DÍAZ et al., 2020). Em relação aos açúcares no caqui, 90% do teor consiste em glicose e frutose, já a sacarose é encontrada em taxas bem menores (BUTT et al., 2015). Ainda, o teor de açúcares varia entre as variedades da cultivar, de acordo com a fase de maturação e com o uso

de algum método para a remoção da adstringência (DEL BUBBA *et al.*, 2009). Estudos revelaram que o teor de açúcar é maior em caqui do que em frutas consumidas amplamente pela população, como maçã, pêsego, pera e laranja (BUTT *et al.*, 2015).

O caqui também é considerado uma fonte de compostos fenólicos e polifenólicos. Os compostos fenólicos presentes na fruta são caracterizados em solúvel em água/extraível e insolúvel em água/não extraível. Exemplos destes compostos que se destacam são os flavonoides (catequinas e taninos condensados), que também são antioxidantes benéficos ao ser humano. Estes grupos evitam que os radicais livres causem danos ao indivíduo e trabalham para prevenir doenças mutagênicas e carcinogênicas (BUTT *et al.*, 2015).

Os taninos são compostos naturalmente produzidos por diversas plantas e atuam como um mecanismo de defesa para as mesmas. Este mecanismo consiste em impedir que predadores se alimentem de frutas, folhas e sementes das plantas antes do amadurecimento completo, para isso o cultivar libera os taninos, que provocam uma sensação de constrição nas mucosas da boca. Estes compostos são uma das categorias mais importantes presentes no caqui, e em relação as propriedades químicas, os taninos podem ser divididos em dois grupos mais amplos, como hidrolisável e não hidrolisável. O tanino é o grande responsável por conferir a adstringência ao fruto. Como já citado, existem variedades de caqui não adstringentes e adstringentes, os últimos contêm níveis muito elevados de taninos solúveis (BUTT *et al.*, 2015). As proantocianidinas são um grupo de taninos condensados que se acumulam em grande quantidade nos frutos de caqui durante os estágios de desenvolvimento. Outro exemplo de tanino condensado que ocorre em caqui são as catequinas, que fornecem proteção contra diversas doenças e assim como os outros taninos, os valores deste composto são maiores nos frutos adstringentes do que em cultivares não adstringentes (BUTT *et al.*, 2015).

O fruto de caqui possui diversos minerais. Um estudo publicado em 2020 por Díaz e colaboradores analisou a variedade de caqui *Rojo Brillante* e demonstrou o teor de compostos minerais nessa variedade, como apresentado na Tabela 3. Foi possível comparar o conteúdo destes minerais em caqui com algumas frutas como a maçã, pera, banana, manga e pêsego, e o teor destes compostos é maior na fruta de caqui. Apenas o teor de sódio se destaca, como menor em caqui do que para outras frutas e vegetais (DÍAZ *et al.*, 2020).

Outra análise importante acerca da composição do caqui é em relação a casca do fruto. Na literatura encontram-se pesquisas que revelam que os teores da maioria dos compostos presentes no cultivar são afetados pela remoção da casca (DÍAZ *et al.*, 2020). Em estudos feitos acerca do potencial hidrogeniônico (pH) da fruta os valores foram em média de 5,5 a 6, e é possível verificar que os frutos com casca possuem um pH ligeiramente mais ácido, contudo, isso varia de acordo com a região onde as frutas foram cultivadas. Neste mesmo estudo foi possível verificar que o clima e a exposição solar que as frutas foram submetidas influenciam na cor das mesmas, ou seja, no teor de licopeno (VINHA *et al.*, 2011).

Na mesma pesquisa publicada foi possível verificar como a presença da casca influencia no teor de ácido ascórbico, amostras com casca possuem maior quantidade deste composto. O teor de compostos polifenólicos também aumenta em amostras analisadas com casca. A atividade antioxidante do caqui está relacionada com os compostos polifenólicos, com o teor de ácido ascórbico e com o teor de licopeno, como já citado, com isso, o consumo feito com a remoção da casca da fruta diminui os teores destes compostos (VINHA *et al.*, 2011). Os minerais também se encontram em maior quantidade na casca do que na polpa (BUTT *et al.*, 2015). Na Tabela 4, a seguir, é possível verificar a diferenciação de valores em frutos com e sem casca.

Tabela 3 - Conteúdo mineral em mg a cada 100 g de frutos de caqui com casca (variedade *Rojo Brillante*) analisado na temporada de 2017, em Valência

Lote	Fe	Cu	Zn	Mn	Ca	Mg	Na	K
1	0,15	0,26	0,11	0,07	14,41	13,65	3,84	251,24
2	0,19	0,28	0,26	0,06	14,17	19,5	4,21	279,67
3	0,23	0,28	0,69	0,06	36,63	20,95	3,97	349,11

Fonte: Fonte: Adaptação de DÍAZ *et al.*, 2020.

Tabela 4 - Influência da presença da casca do caqui nos valores de pH, ácido ascórbico, licopeno e polifenólicos a cada 100 g de fruta

	Com casca	Sem casca
pH	6,05	5,95
Ácido Ascórbico (mg)	0,9479	0,6834
Licopeno (mg)	4,418	3,63
Polifenólicos (mg)	30,9	21,1

Fonte: Adaptação de VINHA *et al.* (2011).

2.2 AGROTÓXICOS

Como definição, segundo a Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, consideram agrotóxicos e afins:

a) os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;

b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento;

De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO), Programa da Organização das Nações Unidas (ONU) responsável pelas áreas de agricultura e alimentação, os agrotóxicos são definidos como qualquer substância, ou mistura de substâncias, usadas para prevenir, destruir ou controlar qualquer praga – incluindo vetores de doenças humanas e animais, espécies indesejadas de plantas ou animais, causadoras de danos durante (ou interferindo na) a produção, processamento, estocagem, transporte ou distribuição de alimentos, produtos agrícolas, madeira e derivados, ou que deva ser administrada para o controle de insetos, aracnídeos e outras pestes que acometem os corpos de animais de criação (FAO, 2005).

2.2.1 Resíduos de agrotóxicos

Diversos tipos de resíduos e contaminantes orgânicos podem estar presentes em alimentos. O *Codex Alimentarius* é uma agência que faz parte da FAO (CODEX ALIMENTARIUS, 2010) e o órgão atribui uma classificação para o termo resíduo em alimentos, conforme se segue: Resíduo é definido como a fração de uma substância, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento proveniente de produtos agrícolas e/ou animais tratados com estas substâncias (CODEX ALIMENTARIUS, 2010).

Além disso, o *Codex Alimentarius* ainda conceitua o termo resíduo de agrotóxico como uma substância ou mistura de substâncias remanescentes ou presentes em alimentos, commodities agrícolas ou ração animal que são resultantes

do uso ou da presença de agrotóxicos ou de derivados específicos, tais como produtos de conversão e de degradação, metabolitos, produtos de reação e impurezas, consideradas tóxicas e ambientalmente significativas (CODEX ALIMENTARIUS, 2010).

2.2.2 Classificação dos agrotóxicos

Os agrotóxicos podem ser classificados de muitas maneiras. A forma mais usual de classificação é de acordo com o tipo de praga que controlam, sendo herbicidas, fungicidas, acaricidas, moluscicidas e inseticidas. Além disso os agrotóxicos, se sintéticos, também podem ser classificados quanto à estrutura química das suas substâncias ativas, podendo ser organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, entre outros (SOUZA, 2006). Outra forma de classificar os agrotóxicos é através do modo de ação perante ao organismo alvo, que pode ser por contato, por ingestão ou fumegante. Em relação à persistência, os agrotóxicos podem ser classificados segundo o tempo de meia vida, que é o tempo necessário, após aplicação, para que tenha sua eficácia reduzida à metade (PRESTES, 2007).

Ainda, os agrotóxicos também podem ser classificados de acordo com os efeitos causados à saúde humana e ao meio ambiente. Em relação aos efeitos decorrentes da exposição humana a estes compostos, a classificação é feita considerando a dose letal oral, cutânea e inalatória estabelecida. A ANVISA, através da RDC nº 294, de 29 de julho de 2019, estabelece a classificação dos agrotóxicos de acordo com sua toxicidade.

No ano de 2019, o mesmo órgão publicou uma reclassificação, em função de um novo marco regulatório no setor. Esta mudança ampliou de quatro para cinco categorias de classificação e ainda incluiu o item “não classificado” (ANVISA, 2019a). A Tabela 5 apresenta classificação toxicológica dos agrotóxicos. Em relação ao potencial de periculosidade ambiental de um agrotóxico, eles dividem-se em classes que variam de I a IV: produtos impeditivos de obtenção de registro e produtos altamente perigosos ao meio ambiente (Classe I), produtos muito perigosos ao meio ambiente (Classe II), produtos perigosos ao meio ambiente (Classe III) e produtos pouco perigosos ao meio ambiente (Classe IV) (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003).

Tabela 5 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos

Classificação	Significado	Faixa e numeração
Categoria 1	Produto extremamente tóxico	Vermelha: 43
Categoria 2	Produto altamente tóxico	Vermelha: 79
Categoria 3	Produto moderadamente tóxico	Amarela: 136
Categoria 4	Produto pouco tóxico	Azul: 599
Categoria 5	Produto improvável de causar dano agudo	Azul: 899
Não classificado	Produto não classificado	Verde: 168

Fonte: Adaptação de ANVISA, 2019.

2.2.3 Risco toxicológico

Os efeitos toxicológicos causados pela exposição ambiental aos agrotóxicos trazem uma série de transtornos e modificações para o meio ambiente, estes compostos contaminam as comunidades de seres vivos que o compõem, se acumulam nos segmentos bióticos e abióticos dos ecossistemas (biota, água, ar, solo, sedimentos) e contaminam espécies que não interferem no processo de produção que se tenta controlar (espécies não alvos) (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003).

As propriedades físico-químicas dos agrotóxicos, bem como sua forma de aplicação, as características do solo e condições ambientais interferem nos processos envolvidos no destino ambiental destes compostos. Como exemplos desses processos têm-se a lixiviação, o escoamento superficial, a sorção, a degradação química e biológica e a volatilização. A lixiviação consiste no transporte do agrotóxico pelo solo e, conforme a umidade e porosidade do solo, pode levar à contaminação do lençol freático. Já o processo de escoamento superficial tem o potencial de contaminar rios, lagos, entre outros e expor os organismos aquáticos e outras espécies (REBELO; CALDAS, 2014). Por outro lado, os efeitos de toxicidade dos agrotóxicos sobre o homem podem ser de dois tipos. Os agudos ou resultantes da exposição a concentrações altas de um ou mais agentes tóxicos são aqueles capazes de causarem dano efetivo aparente em um período de 24 h. Enquanto os efeitos crônicos são aqueles resultantes de uma exposição continuada a doses relativamente baixas de um ou mais produtos. Os efeitos agudos são os mais visíveis, que aparecem

durante ou após o contato da pessoa com o produto (OPS, 1996). Em contrapartida, os efeitos de uma exposição crônica podem aparecer semanas, meses, anos ou até mesmo gerações após o período de contato com tais produtos, sendo, portanto, mais difíceis de identificação (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003).

2.2.4 Uso e fiscalização dos agrotóxicos

A difusão do uso dos agrotóxicos no controle fitossanitário de doenças e proteção contra insetos e outras pragas proporcionou um aumento significativo na produtividade agrícola. Este é um dos fatores que elevam o consumo de insumos, colaborando para o destaque do Brasil, como um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (PELAEZ *et al*, 2015). No ano de 2017, o Brasil recebeu o título de maior consumidor de agrotóxicos, em volume de produto, do planeta, consumindo cerca de 550 mil toneladas de ingredientes ativos (FAOSTAT, 2018). O uso dessas substâncias é muito alto porque o Brasil é um grande produtor agrícola, além de o país possuir, pelo menos, duas safras por ano (PIGNATI, 2018).

Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), a classe de uso mais vendida no Brasil, em 2017, foram os herbicidas, configurando 58,45%. O IBAMA atualizou, em 2019, estas informações e forneceu uma relação dos 10 ingredientes ativos mais vendidos no país, como demonstrado na Tabela 6 (IBAMA, 2019).

No que diz respeito a fiscalização de agrotóxicos, a nível federal, esta é coordenada pela Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins (CGAA)/ Departamento de Fiscalização de Insumos Agrícolas (DFIA)/ Secretaria da Defesa Agropecuária (DAS)/ Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A CGAA/DFIA/SDA/MAPA é a instância do MAPA responsável pela interlocução com a ANVISA e o IBAMA. Esta coordenação regulamenta e fiscaliza, no setor público do país, a pesquisa, a importação/exportação, a produção, a embalagem e a rotulagem dos agrotóxicos. No âmbito estadual, as ações da CGAA/DFIA/SDA/MAPA são realizadas através dos Serviços de Fiscalização Agropecuária (SEFAGs) presentes em todas as Superintendências Federais da Agricultura (BRASIL, 2019).

Tabela 6 – Ingredientes ativos com o ranking de vendas aproximadas no Brasil

Ranking	Ingrediente ativo	Vendas (ton)
1º	Glifosato	217
2º	2,4-D	52
3º	Mancozebe	49
4º	Acefato	28
5º	Atrazina	23
6º	Clorotalonil	16
7º	Dicloreto de paraquate	16
8º	Malationa	13
9º	Enxofre	11
10º	Clorpirifós	10

Fonte: Adaptação IBAMA, 2019 / Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto nº 4.074/2002.

Conforme o artigo 9º, da Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, é de responsabilidade da União estabelecer legislações sobre a produção, registro, comércio interestadual, exportação, importação, transporte, classificação e controle tecnológico e toxicológico; ainda, controlar e fiscalizar os estabelecimentos de produção, importação e exportação; também, analisar os produtos agrotóxicos, seus componentes e afins, nacionais e importados; e controlar e fiscalizar a produção, a exportação e a importação (BRASIL, 1989).

2.2.5 Monitoramento dos resíduos de agrotóxicos em alimentos

Existem diversos programas que visam regular o uso e verificar a quantidade de resíduos de agrotóxicos em alimentos. A ANVISA criou em 2001 o PARA. O programa tem como encargo identificar e quantificar os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos definindo, assim o limite máximo de resíduos. De acordo com o programa LMR caracteriza a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico ou afim oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expressa em mg kg⁻¹ (ANVISA, 2019b).

Para a realização do controle internacionalmente, existe a *European Commission* e o *Codex Alimentarius*, que foi criado em 1963, com o propósito de estabelecer normas internacionais na área de alimentos, o Brasil é membro do *Codex Alimentarius*

desde a década 70 (ANVISA, 2016). O MAPA coordena o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) em produtos de origem vegetal e animal. Este programa tem como função monitorar a qualidade dos alimentos produzidos em todo o território nacional, em relação à ocorrência de resíduos de agrotóxicos e contaminantes químicos e biológicos (BRASIL, 2017). Ainda existe o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT), também do MAPA, que determina os agrotóxicos registrados no país para cada cultura. Neste sentido, a Tabela 7 apresenta os compostos registrados pelo AGROFIT para uso no país, na cultura de caqui. Já a Tabela 8 demonstra os valores de LMR de acordo com a ANVISA e União Europeia (UE, do inglês *European Union*) para caqui, bem como o grupo químico e a classe funcional de cada composto que foi avaliado neste estudo.

O programa PARA analisa anualmente amostras de frutas, hortaliças, cereais, entre outros, como forma de avaliar a qualidade dos principais alimentos adquiridos no mercado varejista e consumidos pela população. Contudo, para a cultura de caqui não há relatórios (ANVISA, 2019b).

Tabela 7 - Compostos registrados no Brasil para uso na cultura de caqui

Nome comum	Grupo químico	Classe
Acetamiprido	Neonicotinóide	Inseticida
Azoxistrobina	Estrobilurina	Fungicida
Difenoconazol	Triazol	Fungicida
Espinetoram	Espinosinas	Inseticida
Espiromesifeno	Cetoenol	Acaricida/inseticida
Etofenproxi	Éter difenílico	Inseticida
Hidróxido de cobre	Inorgânico	Bactericida/ fungicida
Metilciclopropeno	Cicloalqueno	Regulador de crescimento
Oxicloreto de cobre	Inorgânico	Bactericida/ fungicida
Óxido cuproso	Inorgânico	Bactericida/ fungicida

Fonte: Adaptação de AGROFIT, 2021.

Tabela 8 – Valores de LMR para caqui de acordo com ANVISA e UE

(continua)

Agrotóxicos	LMR (mg kg ⁻¹)		
	ANVISA	UE (caqui americano)	UE (caqui japonês)
2,4 D	-	0,05*	0,05*
Acetamiprido	0,3	0,01*	0,01*
Atrazina	-	0,05*	0,05*
Azinfós-etil	-	0,02*	0,02*
Azinfós-metil	-	0,01*	0,01*
Azoxistrobina	0,2	0,01*	0,01*
Bentazona	-	0,03*	0,03*
Bitertanol	-	0,01*	0,01*
Boscalida	-	0,01*	0,01*
Bromuconazol I	-	0,01*	0,01*
Bromuconazol II	-	0,01*	0,01*
Buprofezin	-	0,01*	0,01*
Carbaril	-	0,01*	0,01*
Carbendazim	-	0,1*	0,1*
Carbofurano	-	0,01*	0,003*
Carbofurano-3-hidroxi	-	0,01*	0,003*
Carboxina	-	0,03*	0,03*
Ciantraniliprole	-	0,01*	0,8
Cinazina	-	-	-
Ciprodinil	-	0,02*	2
Cletodim	0,05	0,1	0,1
Clomazone	-	0,01*	0,01*
Clopiralida	-	0,5	0,5
Clorimuron etil	-	-	-
Clorpirifós	-	0,01*	0,01*
Clorpirifós-metil	-	0,01*	0,01*
Diazinona	-	0,01*	0,01*
Diclofuanida	-	-	-
Difenoconazol I	0,5	0,01*	0,8
Dimetoato	-	0,01*	0,01*
Epoxiconazol	-	0,05*	0,05*
Espinetoram (J)	0,3	0,05*	-
Espinetoram (L)	0,3	0,05*	-
Espiromesifeno	0,3	0,02*	-
Cinazina	-	-	-
Ciprodinil	-	0,02*	2
Cletodim	0,05	0,1	0,1
Clomazone	-	0,01*	0,01*
Clopiralida	-	0,5	0,5
Clorimuron etil	-	-	-
Clorpirifós	-	0,01*	0,01*
Clorpirifós-metil	-	0,01*	0,01*

Tabela 8 – Valores de LMR para caqui de acordo com ANVISA e UE

(continuação)

Agrotóxicos	LMR (mg kg ⁻¹)		
	ANVISA	UE (caqui americano)	UE (caqui japonês)
Diazinona	-	0,01*	0,01*
Diclofuanida	-	-	-
Difenoconazol I	0,5	0,01*	0,8
Dimetoato	-	0,01*	0,01*
Epoxiconazol	-	0,05*	0,05*
Espinetoram (J)	0,3	0,05*	-
Espinetoram (L)	0,3	0,05*	-
Espiromesifeno	0,3	0,02*	-
Etefon	-	0,05*	0,3
Etofenproxi	2	0,01*	0,8
Fenarimol	-	0,02*	0,02*
Fenoxapro-p-etil	-	0,1	0,1
Fenpropatrina	-	0,01*	0,01*
Fentiona	-	0,01*	0,01*
Fipronil	-	0,005*	0,005*
Flupiradifurona	2	0,01*	0,01*
Fluquinconazol	-	0,01*	0,01*
Fluroxipir	-	0,01*	0,01*
Flutolanil	-	0,01*	0,01*
Imazali	-	0,01*	0,01*
Imidacloprido	-	0,05*	0,05*
Iprovalicarbe I	-	0,01*	0,01*
Iprovalicarbe II	-	0,01*	0,01*
Linuron	-	0,01*	0,01*
Malationa	-	0,02*	0,02*
Mecarban	-	0,01*	0,01*
Mepronil	-	0,01*	0,01*
Metalaxil	-	0,01*	0,05*
Metamidofós	-	0,01*	0,01*
Metconazole	-	0,02*	0,02*
Metiocarbe sulfona	-	0,2	0,2
Metsulfuron metil	-	0,01*	0,01*
Mevinfós I	-	0,01*	0,01*
Mevinfós II	-	0,01*	0,01*
Miclobutanil	-	0,01*	0,6
Monocrotofós	-	0,01*	0,01*
Monolinuron	-	0,01*	0,01*
Oxamil	-	0,01*	0,01*
Paraoxona etílica	-	-	-
Pindimetalina	-	0,05*	0,05*
Piraclostrobina	-	0,01*	0,02*
Pirazofós	-	0,01*	0,01*

Tabela 8 – Valores de LMR para caqui de acordo com ANVISA e UE

(conclusão)

Agrotóxicos	LMR (mg kg ⁻¹)		
	ANVISA	UE (caqui americano)	UE (caqui japonês)
Piridabem	-	0,01*	0,01*
Piridafentiona	-	-	-
Piridato	-	0,05*	0,05*
Pirimetanil	0,7	0,01*	15
Pirimicarbe	-	0,01*	0,01*
Pirimifós metil	-	0,01*	0,01*
Piriproxifen	5	0,05*	0,05*
Procloraz	-	7	0,03*
Profenofós	-	0,01*	0,01*
Propargito	-	0,01*	0,01*
Propiconazol	-	0,01*	0,01*
Propizamida	-	0,01*	0,01*
Propoxur	-	0,05*	0,05*
Quincloraque	-	0,01*	0,01*
Quinoxifen	-	0,02*	0,02*
Simazina	-	0,01*	0,01*
Tebuconazol	0,2	0,02*	0,02*
Terbufós	-	0,01*	0,01*
Terbutilazina	-	0,05*	0,05*
Tetraconazol	-	0,02*	0,09
Tiacloprido	-	0,01*	0,01*
Tiametoxam	-	0,01*	0,01*
Tiodicarbe	-	0,01*	0,01*
Tolclofós-metil	-	0,01*	0,01*
Triadimefon	-	0,01*	0,01*
Triadimenol	-	0,01*	0,01*
Triclorfon	-	0,01*	0,01*
Trifloxistrobina	0,2	0,01*	0,01*
Triflumizol	-	0,02*	0,02*
Vamidotiona	-	-	-

Fonte: o autor, 2022. Não foi incluído o glifosato e seus sais. *Limite mínimo de determinação analítica.

2.3 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAQUI

Considerando os riscos oferecidos à saúde humana e ao meio ambiente decorrentes do uso de agrotóxicos, bem como a verificação da conformidade com os limites máximos destes compostos, estabelecidos pela legislação, é de grande importância à determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentares e

ambientais. Produtos agrícolas como frutas, vegetais e cereais geralmente possuem resíduos de agrotóxicos de diversas classes. Isso demonstra a necessidade do desenvolvimento de métodos para a determinação multirresíduo de agrotóxicos (PRESTES *et al.*, 2009).

No entanto, a análise de agrotóxicos é uma tarefa complicada, comumente as matrizes são complexas, as concentrações presentes destes compostos são muito baixas e os agrotóxicos apresentam propriedades químicas bastante distintas. Existem diversos avanços no desenvolvimento de instrumentação analítica para tais determinações, contudo, uma etapa prévia de preparo de amostra ainda é indispensável para a mitigação destas adversidades e obtenção de resultados precisos (PRESTES *et al.*, 2009; LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007).

O preparo de amostra é a primeira etapa de uma análise química e se resume em submeter tais amostras a um tratamento adequado a suas características, visando a sua preparação para avançar as etapas seguintes (ARRUDA; SANTELLI, 1997). O objetivo deste preparo é promover a extração e o enriquecimento dos analitos, bem como a remoção dos interferentes (PRESTES *et al.*, 2009). Da mesma forma que é indispensável, esta etapa é uma das mais críticas do processo analítico. O preparo de amostra é um dos principais entraves para a obtenção de resultados satisfatórios ao considerar precisão e detectabilidade e frequentemente apresentam etapas que demandam tempo, alto investimento e quantidades significativas de resíduos gerados. Por isso, há uma crescente necessidade de aperfeiçoamento deste método analítico exigindo aumento da eficiência e diminuição do custo e do tempo de análise (PRESTES *et al.*, 2009).

A maioria dos procedimentos de preparo de amostra geralmente envolve a homogeneização da amostra com solventes orgânicos, por vezes aplicados sozinhos ou em solução com água ou agentes tamponantes, empregando ainda homogeneizadores ou sonicadores (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007). Na literatura, diversos métodos de preparo de amostras para a extração de agrotóxicos no fruto de caqui são abordados, como pode ser visualizado na Tabela 9.

O primeiro método multirresíduo desenvolvido para extração de agrotóxicos foi na década de 1960, executado por Mills e colaboradores. Este método baseia-se em uma extração com acetonitrila (ACN), e é usado basicamente na determinação de compostos organoclorados apolares em amostras não gordurosas. Esse método limita

a extração de agrotóxicos com características polares e com isso, surgiu a necessidade do desenvolvimento de métodos alternativos (PRESTES *et al.*, 2009).

Em 1975, Luke *et al.* desenvolveram o denominado método de Luke, que consiste em uma etapa de extração com acetona seguida de uma partição líquido-líquido com solventes apolares. Com o propósito de melhores resultados desenvolveram-se, com o tempo, novos métodos de extração, como o de Krijgsman e colaboradores, tão vantajoso que foi utilizado como método de extração oficial em diversos países. Em 1980, o *Food and Consumer Product Safety Authority* da Holanda desenvolveu o método de extração *mini-Luke*, que se configura em uma miniaturização do método Luke, o desenvolvimento desse método possibilitou a redução da quantidade de amostra, bem como de solventes utilizados (PRESTES *et al.*, 2009).

A extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*) foi outra alternativa desenvolvida e foi aplicada para a extração de agrotóxicos em fruto de caqui por Shim e colaboradores (2007), conforme a tabela a seguir. Nesta técnica, uma mistura do solvente orgânico com a amostra aquosa é submetida a agitação e ocorre a formação de uma gota de solvente orgânico, o que garante o aumento da superfície de troca para favorecer a partição dos analitos entre as fases (MARTINS *et al.*, 2012). Contudo, este método demanda o uso de grande quantidade de solventes orgânicos, possui custo elevado, é de difícil automação e trabalhosos. (CALDAS *et al.*, 2011).

Com o passar dos anos, foram desenvolvidos vários métodos alternativos de preparo de amostras, baseados na redução do volume de solvente utilizado na etapa de extração, por exemplo, a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*). Esta técnica foi introduzida em meados de 1970 e baseia-se nos mecanismos de separação da cromatografia líquida clássica (baixa pressão). Este se tornou um dos principais métodos de extração para aplicação em amostras líquidas e é uma das técnicas de preparo de amostra mais utilizadas, devido ao baixo consumo de solvente, se comparada à LLE (MORAIS *et al.*, 2013).

Dentre os principais atrativos da SPE podem ser destacados o alto fator de concentração dos solutos, a possibilidade de realização de inúmeras extrações simultâneas e a redução do uso de solventes orgânicos comparada a técnicas de extração com solventes. Amostras ambientais, especialmente água, que apresentam concentrações de contaminantes em níveis traço estão entre as principais aplicações

da SPE (AGUIAR *et al.*, 2018). Ainda assim, este método de extração também é abordado para determinação de agrotóxicos em caqui no estudo publicado por Shim e colaboradores (2007), apresentado na tabela a seguir.

Neste período, outros métodos foram desenvolvidos os quais também visavam a simplificação de etapas como, por exemplo, a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *matrix solid phase dispersion*), a microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase microextraction*) e extração com membrana assistida por solvente (MASE, do inglês *membrane-assisted solvent extration*). A MSPD se resume na homogeneização de uma amostra viscosa, sólida ou semissólida com um suporte sólido e possibilita o uso de pequenas quantidades de amostra e solventes orgânicos, com as etapas de extração e *clean-up* sendo realizadas simultaneamente, contudo apresenta desvantagens como o alto consumo de sorventes, não é adequada para amostras secas ou com alto teor de lipídeos e muitas vezes faz-se necessária uma limpeza adicional (BARKER, *et al.*, 1989; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011). Não há estudos utilizando esta técnica aplicados à caqui, como pode-se verificar na Tabela 9, porém a MSPD é bastante utilizada como preparo de amostra na análise de agrotóxicos em frutas, por isso pode ser uma alternativa para aplicação em caqui.

Outros métodos, conhecidos como extração por fluido supercrítico (SFE, do inglês *supercritical fluid extraction*), extração acelerada por solventes (PLE, do inglês *pressurized liquid extraction*) e extração assistida por micro-ondas (MAE, do inglês *microwave assisted extraction*) apresentam, dentre outras características, elevada eficiência, contudo, geralmente demandam investimento considerável em instrumentação (PRESTES *et al.*, 2009). Com isso, fez-se necessário o desenvolvimento de novos métodos, que realizem a extração do maior número de agrotóxicos possível, gerem bons resultados e que reduzam o investimento e tempo de análise. Desta forma, foi proposto o método QuEChERS, método que é amplamente utilizado na determinação de agrotóxicos em diversas matrizes. Além disso, segundo a literatura, este método é utilizado na determinação de agrotóxicos em fruto de caqui, conforme a tabela a seguir.

Tabela 9 - Métodos de preparo de amostra empregados para extração de agrotóxicos em caqui, com sua respectiva instrumentação, limites de detecção (LOD), quantificação (LOQ) e recuperação (%)

(continua)

Ano de publicação	Matriz	Analitos	Extração	Instrumentação	LOD (mg kg ⁻¹)	LOQ (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)	Referência
2004	Frutas e vegetais diversos	Inseticidas macrocíclicos de lactona	QuEChERS	LC-MS/MS	-	-	87 a 104	Zywitz, Anastassiades, Scherbaum (2004a)
2004	Frutas e vegetais diversos	Inseticidas neonicotinoides	QuEChERS	LC-MS/MS	-	-	70 a 110	Zywitz, Anastassiades, Scherbaum (2004b)
2006	Laranja, tangerina, pêssego, nectarina, caqui e melancia	Multirresíduo	Extração com solvente	GC-MS/MS	-	-	70 a 110	Berrada et al. (2006)
2006	Caqui e couve-flor	Captana e folpete	Extração com solvente	GC/NCI-MS	0,01	0,05	94 a 100	Barreda et al. (2006)
2006	Caqui e couve-flor	Triclorfon	Extração com solvente	LC-ESI-MS/MS	-	-	83 a 101	Grimalt et al. (2006)
2006	Caqui <i>Rojo Brillante</i>	Captana e triclorfon	Extração com solvente	GC-MS e LC-MS/MS	-	0,04 e 0,05	93 a 107% e 97 a 101%	Fernández-Cruz et al. (2006)
2007	Caqui	Pirimetanol	LLE e SPE	HPLC-MS	0,02	0,07	87 a 92	Shim et al. (2007)
2009	Abacate, cherimoya, figo, uva, amora, limão, goiaba, mamão, manga e caqui	Multirresíduo	Método DFG S19	GC-ECD, GC-NPD, GC-FPD, HPLC-Uv-vis e LC-MS/MS	-	-	70 a 110%	Siscato, Gebara, Monteiro (2009)
2011	Caqui, uva e pêra	Multirresíduo	QuEChERS	LC-MS/MS	-	-	70-120*	Min et al. (2011)
2011	Maçã, goiaba, laranja, uva, pêra, caqui, banana e pêra	Multirresíduo	Extração com solvente	GC-ECD	-	-	-	Anwar, Ahmad, Tahir, (2011)

Tabela 9 – Métodos de preparo de amostra empregados para extração de agrotóxicos em caqui, com sua respectiva instrumentação, limites de detecção (LOD), quantificação (LOQ) e recuperação (%)

(conclusão)

Ano de publicação	Matriz	Analitos	Extração	Instrumentação	LOD (mg kg ⁻¹)	LOQ (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)	Referência
2011	Maçã, damasco, caqui, chiku, frutas cítricas, uva, goiaba, manga, mamão, pêssego, ameixa e romã	Multirresíduo	Extração com solvente	GC/FID e HPLC/UV	-	-	-	Parveen et al. (2011)
2012	Caqui doce	Difenoconazol e tiametoxam	Extração com solvente	GC-EDC e HPLC	-	-	88 a 99	Chang et al. (2012)
2012	Caqui	Pirimetanil e trifloxistrobina	Extração com solvente	HPLC-DAD	-	0,01	81 a 98	Lee et al. (2012)
2012	Caqui	Pirimetanil e trifloxistrobina	Extração com solvente	HPLC-DAD	-	0,01	81 a 98	Lee et al. (2012)
2014	Caju, goiaba, caqui e pêssego	Multirresíduo	QuEChERS	GC- μ ECD, GC-FPD e LC-MS/MS	-	-	70 a 120	Jardim et al. (2014)
2016	Caqui, jujuba e solo	Multirresíduo	Extração com solvente	GC- EDC e GC-FDP	-	-	75 a 109	Liu et al. (2016)
2019	Caqui doce	Clorfenapir	QuEChERS	GC-ECD	0,01	0,03	104 a 107	Jeong et al. (2019)

Fonte: o autor, 2022. Legenda= *não satisfatórios: bifenazato, deltametrina, etoxazol e espiromesifeno; NCI: ionização química negativa (do inglês *negative chemical ionization*); ECD: Detecção por captura de elétrons (do inglês *electron capture detection*); μ ECD: Micro-captura de elétrons; FPD: Detecção fotométrica de chama (do inglês *flame photometric detection*); TSD: Detecção termoiônica seletiva (do inglês *thermionic selective detection*); DAD: Arranjo de diodos (do inglês *diode array detection*); NPD: Detecção neurofisiológica (do inglês *neurophysiological detection*); FID: Detecção por ionização de chama (do inglês *flame ionization detection*)

2.3.1 Método QuEChERS

Para atender a necessidade de um método multirresíduo que contornasse as limitações dos métodos já existentes, em 2003, Anastassiades e colaboradores desenvolveram um novo método de preparo de amostras para extração multirresíduo, denominado QuEChERS, acrônimo do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe* (rápido, fácil, econômico, robusto e seguro). Entre as principais vantagens da utilização deste método estão os valores satisfatórios de recuperação para uma ampla faixa de agrotóxicos, o elevado grau de exatidão e precisão, o preparo de um grande número de amostras em um curto período de tempo, a redução no volume de solventes orgânicos e simplicidade de operação (LEHOTAY *et al.*, 2005).

O QuEChERS baseia-se em três principais etapas: uma extração sólido-líquido com solvente, a partição promovida pela adição de sais e a limpeza do extrato, utilizando a técnica de Extração em Fase Sólida Dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid phase extraction*) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Na etapa de extração utiliza-se a acetonitrila, este solvente oferece diversas vantagens como a possibilidade de extração de uma menor quantidade de coextrativos e interferentes presentes nas amostras, como gorduras, ceras e pigmentos, a extração de uma grande faixa de analitos de diferentes polaridades e ainda, é o solvente mais adequado para cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS, do inglês *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*), podendo ser utilizado também na cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em série (GC-MS/MS, do inglês *gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry*). A acetonitrila também pode ser acidificada, o que fornece melhores níveis de recuperações para analitos com problemas de estabilidade (ZANELLA *et al.*, 2015).

A etapa de partição baseia-se na adição de sais que promovem o efeito *salting out*, essa medida é rápida, fácil, barata, não dilui o extrato da amostra e separa as fases orgânica e aquosa. Dependendo da natureza do solvente utilizado em conjunto, melhoram-se os percentuais de recuperação para analitos polares, pois os sais diminuem a solubilidade destes compostos em fase aquosa e a quantidade de água na fase orgânica. O sulfato de magnésio (MgSO₄) é o sal utilizado originalmente no método QuEChERS, este possui maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais, reduz o volume da fase aquosa e possui uma hidratação

exotérmica, que promove o aquecimento da amostra entre 40 e 45 °C, favorecendo a extração, principalmente, de compostos apolares. Ainda são utilizados outros sais como o cloreto de sódio (NaCl) e o sulfato de sódio (Na₂SO₄), estes melhoram a recuperação de agrotóxicos polares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; ZANELLA *et al.*, 2015).

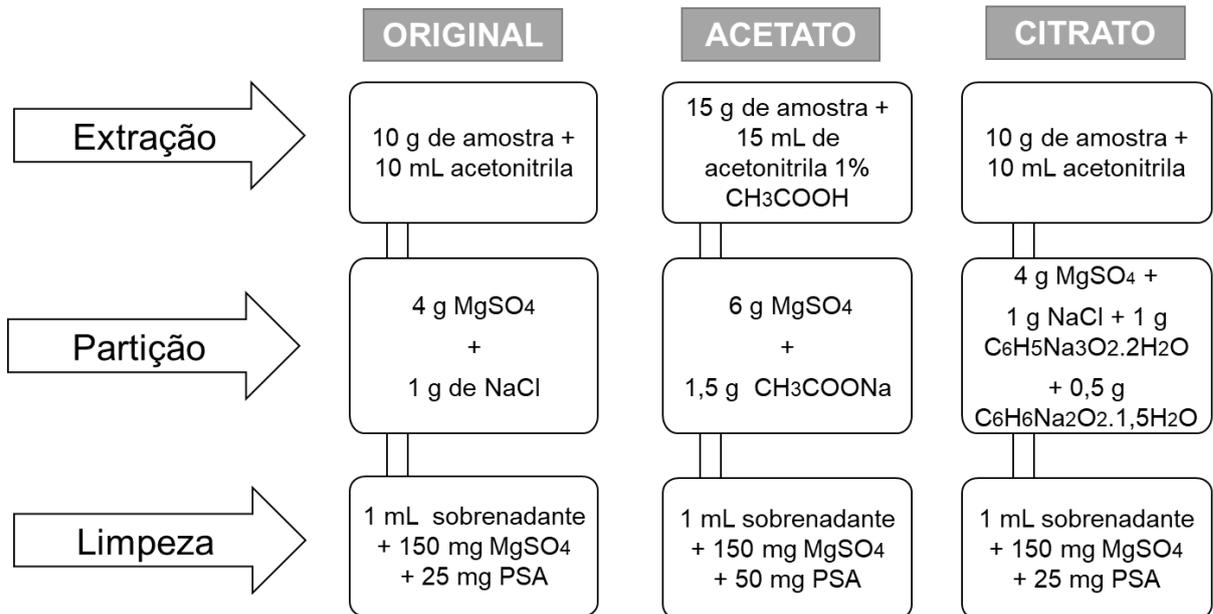
Durante o desenvolvimento do método QuEChERS compostos dependentes do pH apresentaram resultados insatisfatórios de recuperação e estabilidade, este impasse foi contornado com a utilização de uma etapa de tamponamento. Por isso, em 2005, Lehotay e colaboradores desenvolveram o método denominado QuEChERS acetato, neste, a extração é realizada utilizando acetonitrila acidificada com 1% (v/v) de ácido acético (HAc) e ainda utiliza o emprego de acetato de sódio (CH₃COONa), adicionado para promover o efeito tamponante (pH 4,8). Em 2007 esse método foi adotado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) como oficial para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (ZANELLA *et al.*, 2015; BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

Ainda para mitigar tais adversidades, em 2007, Anastassiades e colaboradores propuseram o método QuEChERS citrato, que promove o efeito tamponante (pH 5,0 - 5,5) através da utilização de uma mistura de citrato de sódio di-hidratado (C₆H₅Na₃O₇ · 2 H₂O) e hidrogenocitrato sesqui-hidratado (C₆H₆Na₂O₇ · 1,5 H₂O). Este foi oficializado, mais tarde, como método de referência na União Europeia (ZANELLA *et al.*, 2015; BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015). Na Figura 1, é possível observar as etapas das três versões do método QuEChERS.

Durante o preparo de amostras a utilização de uma etapa de limpeza confere robustez e confiabilidade aos resultados obtidos, bem como a diminuição das manutenções no sistema cromatográfico, visto que elimina componentes não voláteis que poderiam ficar aderidos no sistema de injeção e na coluna cromatográfica (ZANELLA *et al.*, 2015). A d-SPE, proposta por Anastassiades e colaboradores (2003) se mostrou uma alternativa vantajosa, simples e de baixo custo para etapa de limpeza dos extratos, principalmente se comparada a SPE.

O método QuEChERS é amplamente utilizado como preparo de amostra para a determinação de agrotóxicos em caqui, como foi possível verificar na Tabela 9. Zywitz e colaboradores (2004 a,b) utilizaram QuEChERS original para este fim. Já Min e colaboradores (2011), Jardim e colaboradores (2014) e Jeong e colaboradores (2019) utilizaram o método QuEChERS acetato para análise em fruto de caqui.

Figura 1 – Método QuEChERS, original, acetato e citrato



Fonte: Adaptação ZANELLA et al. (2015).

Nessa etapa de limpeza o extrato é agitado com uma pequena quantidade de sorvente, neste caso o PSA, do inglês *primary secondary amine*, para a distribuição uniforme do sorvente, o que facilita a limpeza. O PSA atua retendo os co-extrativos da matriz. Tal mistura é separada utilizando centrifugação e o extrato segue para análise. Além disso, na etapa de limpeza por d-SPE pode-se aplicar a combinação de diferentes sorventes, além do PSA, de acordo com o tipo de matriz e do equipamento que será utilizado (ZANELLA *et al.*, 2015; BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

O sorvente PSA é uma amina primária secundária que atua como trocador iônico e interage com outros compostos através de ligações de hidrogênio ou dipolo-dipolo. Esse sorvente tem forte interação com os compostos da matriz, removendo coextrativos interferentes, sua estrutura bidentada tem elevado efeito quelante, o que causa a retenção de ácidos graxos livres, açúcares e outros compostos polares. Entretanto, o PSA não é tão eficiente para remoção de gorduras (WILKOWSKA & BIZUK, 2011; ZANELLA *et al.*, 2015). Outro sorvente bastante utilizado é o octadecilsilano (C18), que promove uma limpeza mais efetiva de algumas matrizes, principalmente as que contém gordura, remove interferentes apolares e substâncias graxas e lipídios. Por isso, o C18 é muito utilizado em conjunto com o PSA (WILKOWSKA & BIZUK, 2011; ZANELLA *et al.*, 2015).

Não apenas, na etapa de d-SPE ainda pode ser utilizado o carbono grafitizado (GCB, do inglês *graphitized carbon black*), para a redução do teor de pigmentos contidos em extratos de amostras vegetais. Também são aplicados a alumina (Al_2O_3), o Florisil[®], a terra diatomácea, destacando-se pelo seu baixo custo. O sorvente polimérico ChloroFiltr[®] tem sido aplicado como alternativa ao GCB e a tetraetilenopentamina como variação ao PSA, ainda, a utilização de nanotubos de carbono vem sendo desenvolvida (ZANELLA *et al.*, 2015).

2.3.2 Método QuEChERS sem a etapa de limpeza

Com o avanço no desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de preparo de amostras foi possível o progresso para a utilização de métodos mais rápidos, simples, baratos e com menos etapas. Com isso, há diversos estudos que demonstram a utilização do método QuEChERS sem o uso da etapa de limpeza do extrato (STRINGHINI, 2020).

Na literatura são relatadas diversas aplicações que contam com a etapa de partição em conjunto apenas, com o método de diluição, com o intuito de remover de interferentes e reduzir o efeito matriz. Existem diversas estratégias para minimizar e eliminar tais interferências, bem como melhorar a seletividade cromatográfica, pois assim, evita-se a co-eluição dos agrotóxicos com os componentes interferentes da matriz. Contudo, a diluição do extrato é um dos métodos mais fáceis e extremamente eficaz (FERRER *et al.*, 2011).

Outra vantagem deste recurso é que, neste caso, é feita uma introdução de menos componentes da matriz no sistema cromatográfico, o que prolonga a vida útil dos equipamentos. Existem estudos que demonstram que a utilização da etapa de limpeza pode diminuir os valores de recuperação, visto que, alguns analitos polares podem ser eliminados com os interferentes ou ficarem retidos no sorvente de limpeza, o método da diluição mitiga este problema. Um ponto de atenção é a sensibilidade, visto que a diluição da amostra reduz a quantidade de analitos presentes (STRINGHINI, 2020; GUO *et al.*, 2019; FERRER *et al.*, 2011).

Estudos são relatados para diferentes diluições na análise de agrotóxicos em três diferentes matrizes vegetais: laranja, tomate e alho-poró (FERRER *et al.*, 2011). O procedimento de diluição também foi aplicado para reduzir o efeito matriz e detectar

oito inseticidas neonicotinóides em chá (JIAO *et al.*, 2016). Para caqui não há estudos encontrados na literatura acerca de testes de diluição.

Já é de conhecimento que os efeitos interferentes da matriz podem ser reduzidos pela diluição da amostra. Além disso, o recente surgimento de instrumentos analíticos de tecnologia avançada no mercado, que são altamente sensíveis, torna promissora esta aplicação. Por esse motivo, o método de diluição tem se tornado uma abordagem comum em análises para a determinação de resíduos de agrotóxicos (FERRER *et al.*, 2011; GUO *et al.*, 2019)

O método QuEChERS tem sido utilizado em diversas áreas de atuação como indústrias farmacêuticas, área forense, testes antidoping e de composição e segurança alimentar (STRINGHINI, 2020).

2.4 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

A determinação de resíduos de agrotóxicos, em matrizes no geral, é tradicionalmente feita com a utilização de técnicas cromatográficas. Estas técnicas possuem a facilidade de realizar separações, identificar e quantificar as espécies presentes na amostra através da utilização de detectores específicos. Além da utilização de diferentes detectores, uma grande vantagem das técnicas cromatográficas é a possibilidade da utilização associada a outras técnicas, como as espectroscópicas e eletroanalíticas. A utilização das técnicas cromatográficas apresenta um contínuo desenvolvimento, principalmente em decorrência da crescente necessidade de técnicas mais precisas e sensíveis para a caracterização e quantificação de analitos em matrizes complexas. Por isso, são uma ferramenta importante de separação, apresentando informações quantitativas e qualitativas importantes sobre tais espécies (GALLI *et al.*, 2006).

A cromatografia se apresenta como uma das mais relevantes técnicas para a análise de substâncias químicas (MAFFEI; NOGUEIRA; BRONDI, 2009). Essa técnica pode ser definida como um método físico-químico de separação no qual os constituintes da amostra são particionados entre duas fases, uma estacionária, geralmente de grande área, e a outra, móvel (CIOLA, 1998; SKOOG *et al.*, 2002). Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases e cada um deles é seletivamente retido pela

fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes (COLLINS *et al.*, 2006).

A grande maioria dos métodos físico-químicos para a análise de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários, ou contaminantes, em alimentos utiliza a cromatografia em combinação com técnicas espectrométricas, como já citado, tal combinação fornece informações sobre as estruturas químicas dos analitos, possibilitando a confirmação inequívoca da identidade, o que evita a possibilidade de resultados falso-positivos (MAFFEI; NOGUEIRA; BRONDI, 2009). Ainda, a análise de compostos orgânicos utilizando técnicas cromatográficas produz resultados com limites de detecção baixos, na faixa de nanogramas (ng) a microgramas (μg), dependendo da técnica utilizada no preparo de amostra e do detector, o que é uma vantagem (GALLI *et al.*, 2006).

A cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*) é uma técnica com elevado poder de resolução, possibilitando a análise de várias substâncias em uma mesma amostra. Esse método cromatográfico está baseado na partição dos componentes de uma amostra entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária líquida ou sólida, que propiciam a separação da mistura por meio de processos físicos e químicos (DEGANI; CASE; VIERA, 1998; PERES, 2002). A grande limitação deste método é a necessidade de que a amostra seja volátil ou termicamente estável (PERES, 2002). Já na técnica de cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*), os equipamentos são geralmente modulares, com isso é possível intercambiar um módulo de um equipamento de uma marca por um equivalente de outra marca. Isso permite ao usuário configurar um cromatógrafo líquido de acordo com as suas necessidades e preferências (LANÇAS, 2009). A cromatografia líquida de alta eficiência, (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*), utiliza suporte com partículas muito pequenas, responsáveis pela alta eficiência, sendo um método adequado para separação de espécies iônicas e macromoléculas (DEGANI; CASE; VIERA, 1998). Devido à utilização de colunas com grande capacidade de separação a HPLC requer a utilização de equipamentos específicos, com o uso de bombas e colunas que suportem altas pressões necessárias para eluição da fase móvel. Assim, a HPLC necessita da utilização de um cromatógrafo composto de bomba, coluna cromatográfica, detector e registrador (DEGANI; CASE; VIERA, 1998; PERES, 2002).

No caso da determinação de resíduos de agrotóxicos, esta análise é realizada principalmente por cromatografia líquida, sobretudo por cromatografia líquida de alta eficiência e utiliza detecção como o ultravioleta/visível (UV/Vis), fluorescência (FL) ou arranjo de diodos (DAD, do inglês diode array detection), mas a ferramenta que se destaca é o acoplamento com a espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*), especialmente espectrometria de massas em série (MS/MS, do inglês *tandem mass spectrometry*).

As principais vantagens da cromatografia líquida são a grande capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma inúmera variedade de compostos, que estão presentes em diversos tipos de matrizes, sem depender da volatilidade, da estabilidade térmica e da polaridade, tudo isso em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e repetitividade (GALLI *et al.*, 2006; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014).

Já a técnica de espectrometria de massas permite identificar e quantificar qualquer composto ionizável, elucidar sua estrutura e determinar sua massa molar e promove o aumento de seletividade e detectabilidade. Além disso, quando existem compostos que não podem ser totalmente separados por técnicas cromatográficas, usando espectrometria de massas é possível detectá-los individualmente se possuírem diferentes massas molares ou gerarem diferentes espectros de massas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014; OSHITA; JARDIM, 2015). Por isso, o acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas se configura como a técnica mais utilizada para a detecção e quantificação de resíduos de agrotóxicos. A junção dessas técnicas permite obter grande quantidade de informação estrutural sobre o analito, assegurando sua identificação com maior exatidão, combinando suas diversas vantagens, graças a sua alta sensibilidade e seletividade e seu baixo limite de quantificação para a maioria dos compostos (SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Neste âmbito, a espectrometria de massas em série se destaca como uma ferramenta de identificação e confirmação, pois o monitoramento dos fragmentos oferece uma melhor discriminação se comparado ao emprego de um único estágio. Esta aplicação diminui as etapas de preparo de amostra, os resultados falsos positivos ou negativos, a quantidade de reagentes utilizados, o custo e o tempo de análise e ainda proporciona a identificação de compostos com características físico-químicas diferentes (OSHITA; JARDIM, 2015). Quando se utiliza a MS/MS é possível obter

maior detectabilidade e menores limites de detecção e quantificação, devido aos modos de varreduras possíveis de serem realizados, o que favorece a sua aplicação à análise de elementos traço (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

2.4.1 Cromatografia líquida de ultra alta eficiência

Com o passar dos anos e a crescente necessidade de análises mais rápidas e/ou de melhor resolução, sem diminuir o desempenho cromatográfico a técnica de cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC, do inglês *ultra high performance liquid chromatography*), foi difundida para distinguir da técnica convencional HPLC. Esta técnica conta com partículas de fase estacionária de menor diâmetro (normalmente $< 2 \mu\text{m}$), maiores temperaturas na separação dos compostos e altas pressões. O seu uso possui inúmeras vantagens, como o emprego de menor volume de amostra, menor consumo de fase móvel, menor tempo de análise, maior resolução dos picos cromatográficos, melhor detectabilidade e maior razão sinal-ruído, o que diminui o valor do limite de quantificação (OSHITA; JARDIM, 2015; LOOSE, 2020)

2.4.2 Espectrometria de massas

O princípio da espectroscopia de massas é a fragmentação de moléculas formando íons carregados, que são separados de acordo com a razão massa/carga (m/z) e fornecendo, então, um espectro da abundância relativa de cada fragmento. Desde que as mesmas condições de fragmentação sejam empregadas, o padrão de fragmentação é característico para cada composto (SKOOG *et al.*, 2002).

A ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray ionization*), é a forma de ionização mais usada no acoplamento LC-MS, ela permite a criação de íons na pressão atmosférica ao invés de vácuo. Neste processo, a amostra é dissolvida em um solvente não polar e pressurizada em um tubo capilar feito de aço inox, nesse tubo é aplicada uma voltagem tipicamente entre 3 e 5 kV. Assim, o líquido emerge do capilar à pressão atmosférica, na forma de um aerossol. As gotículas formadas são dessolvatadas e os íons fluem para o espectrômetro de massas induzidos pelos efeitos da atração eletrostática e pelo vácuo (LANÇAS, 2009).

Ainda, são utilizados analisadores de massas, o quadrupolo é o mais popular devido à sua simplicidade, preço relativamente baixo, boa linearidade em análises

quantitativas e a facilidade de operação (LANÇAS, 2009). Este analisador consiste em quatro barras cilíndricas, sendo que as barras opostas são conectadas e carregadas eletricamente, um par é carregado positivamente e outro negativamente e um potencial de radiofrequência é aplicado. Para obter o espectro de massa os íons são acelerados entre as barras, os fragmentos carregados com m/z específicas chegam ao detector, enquanto que, fragmentos com m/z menor ou maior que os íons selecionados colidem com as barras e são inativados (SKOOG *et al.*, 2002).

Uma maneira de tornar os analisadores de massa mais sensíveis é o acoplamento entre eles. O tipo mais utilizado nas análises de agrotóxicos é o triplo quadrupolo (QqQ) e é formado por três quadrupolos em série, porém o segundo quadrupolo não atua como analisador, mas sim como célula de colisão (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Para obtenção do espectro de massas estão dispostas diversas técnicas de varredura, algumas dessas são a varredura completa, do inglês *full scan*, o monitoramento de íons selecionado (SIM, do inglês *selected ion monitoring*), a varredura do íon produto, a varredura do íon precursor e monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*). O modo *full scan* é utilizado, principalmente, quando não se sabe quais os componentes presentes na amostra, e é o mais aplicado para análises de resíduos de agrotóxicos (ALBARNAZ, 2021).

2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Ao desenvolver um método analítico é necessário demonstrar qualidade das medições químicas, isso pode ser garantido através da comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Dados analíticos que não são confiáveis podem comprometer estudos e causar prejuízos financeiros. Para garantir que o método analítico desenvolvido seja confiável ele deve passar por uma avaliação, chamada validação (PEREZ, 2010).

Para a ANVISA (2003), a validação precisa garantir, através de estudos experimentais, que o método cumpra às exigências das aplicações analíticas, garantindo a confiabilidade dos resultados. Conforme a norma ISO/IEC 17025 (2005), a validação consiste na confirmação de testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos sejam preenchidos para tais usos. Já segundo a *World Health Organization* (CODEX ALIMENTARIUS, 2001), a validação é uma avaliação

sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que o mesmo está nas condições que deve ser aplicado.

Existem diversos órgãos nacionais e internacionais que verificam a competência de laboratórios de ensaios. Através da resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 e do documento DOQ-CGCRE-008, de fevereiro de 2010, a ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), respectivamente, disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos. Existem outros órgãos que regulamentam e recomendam, em forma de guias, a validação de métodos analíticos, como o *Codex Alimentarius* (2001), SANTE (2019), a Comissão Europeia (EC, do inglês *European Commission*) (DECISÃO 657/2002), a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*), entre outros.

Na validação, alguns parâmetros são avaliados, sendo esses: seletividade; linearidade e faixa de trabalho; limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*); limite de quantificação (LOQ, do inglês *limite of quantification*); recuperação; precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão (INMETRO, 2020).

2.5.1 Seletividade

Seletividade é o grau em que o método pode quantificar um analito na presença de outros analitos, matrizes ou de outro material potencialmente interferente. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito para outros, é chamado seletivo. Os ensaios de seletividade podem ser avaliados através da comparação de uma matriz livre do composto de interesse com a matriz fortificada com o padrão desta substância. Existem outras formas de avaliar esse critério, como com a comparação de duas curvas analíticas, com e sem a presença da matriz, e pelo método de adição de padrão (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2020). O critério de avaliação para a seletividade consiste na ausência de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas (INMETRO, 2020).

2.5.2 Linearidade, sensibilidade e curva analítica

A linearidade de um método analítico é a sua habilidade de obter resultados que são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e calculada com uma expressão matemática para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse pode ser expressa como uma equação de reta, que é chamada de curva analítica, conforme a Equação 1. (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2020).

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = a + bx \quad (1)$$

Onde:

y = resposta medida (sinal instrumental, altura ou área do pico);

x = concentração;

a = coeficiente linear (interseção com o eixo y , quando $x = 0$);

b = coeficiente angular (inclinação da curva analítica = sensibilidade).

A estimativa dos coeficientes da curva analítica a partir das medições experimentais pode ser feita, matematicamente, utilizando a regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b , é possível calcular o coeficiente de correlação (r), que demonstra a qualidade da curva obtida, quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e a incerteza dos coeficientes de regressão. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI *et al.*, 2004). Assim, para avaliação da linearidade, devem ser apresentados os seguintes dados: representação gráfica das respostas em função da concentração do analito; gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística; equação da reta de regressão de y em x , estimada pelo método dos mínimos quadrados; avaliação da associação linear entre as variáveis por meio do coeficiente de correlação (r), que devem possuir valores acima de 0,99 e de determinação (r^2), neste caso, quanto mais próximo de 1 o valor r^2 melhor a qualidade da regressão. A ANVISA recomenda um valor de r^2 acima de 0,99, bem como a avaliação do coeficiente angular (BRASIL, 2017).

Com a equação da reta ainda é possível determinar a sensibilidade analítica. O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação, representada pelo coeficiente angular (b) (INMETRO, 2020).

2.5.3 Faixa de trabalho

A faixa linear de trabalho também é determinada pela curva analítica, consiste no intervalo entre a menor concentração e a maior concentração de analito na amostra para o qual se demonstrou que o procedimento analítico tem um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade (INMETRO, 2020). A faixa de trabalho deve ser estabelecida a partir dos estudos de linearidade, juntamente com os resultados de precisão e exatidão, sendo dependente da aplicação pretendida (BRASIL, 2017).

2.5.4 Efeito matriz

O efeito matriz é determinado por meio de uma comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a substância química de referência do analito em solvente e com a amostra fortificada com a substância química de referência do analito (BRASIL, 2017).

Na matriz podem existir componentes que interferem no desempenho da medição, podendo gerar diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental, o que prejudica o resultado. Quando as duas retas das curvas de calibração se encontram sobrepostas, demonstra-se a ausência de interferências dos componentes da matriz na determinação dos compostos (BRASIL, 2017; INMETRO, 2020; ANVISA, 2017). Em caso de ocorrer efeito matriz significativo recomenda-se a adoção de curva na matriz branco para compensar este efeito.

2.5.5 Limite de detecção

O LOD de um método analítico individual é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob condições estabelecidas de ensaio (INMETRO, 2020).

A determinação do limite de detecção pode ser feita por meio de método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco, em parâmetros da curva

de calibração, considerando as particularidades do método analítico utilizado, ou através do LOQ, conforme a Equação 2 (BRASIL, 2017).

$$LOD = \frac{LOQ}{3,33} \quad (2)$$

2.5.6 Limite de quantificação

O LOQ de um método analítico é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis, ou seja, com recuperações entre 70 e 120% e desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*) $\leq 20\%$. Corresponde ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco), com base em uma curva analítica, onde o LOQ é o menor nível em que existe uma resposta com precisão e exatidão satisfatórias (INMETRO, 2020). Para a determinação deste parâmetro, pode-se usar a avaliação por meio do sinal/ruído, sendo que a razão sinal/ruído deve ser no mínimo de 10:1 (BRASIL, 2017).

2.5.7 Exatidão

A exatidão de um procedimento analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. A ANVISA recomenda que a exatidão seja analisada a partir de, no mínimo, nove determinações, visando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três replicatas em cada nível (BRASIL, 2017).

A exatidão é considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, sendo assim, sempre aparece associada a valores de precisão. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são o uso de materiais de referência, a comparação de métodos, o uso de ensaios de recuperação e a adição padrão. No último caso, este parâmetro é demonstrado com a relação percentual de recuperação da matriz branco fortificada, podendo ser calculada através da Equação 3 (BRASIL, 2017; RIBANI *et al.*, 2004)

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração Média das Medidas de Fortificação}}{\text{Concentração Nominal da Fortificação}} \times 100 \quad (3)$$

2.5.8 Precisão

A precisão de um método analítico retrata a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras similares ou padrões, sob condições já definidas. Este parâmetro é expresso comumente por três maneiras, por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade. A precisão é usualmente expressa pelo desvio padrão e coeficiente de variação. Na avaliação da precisão, quanto maior o número de replicatas, melhor é a avaliação da dispersão do método (INMETRO, 2020).

O coeficiente de variação (CV, expresso em %), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR) ou RSD, é calculado de acordo com a Equação 4:

$$CV = DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada.

A repetitividade é a medição num conjunto de condições, as quais incluem o mesmo procedimento de medição, os mesmos analistas, as mesmas condições de operação e o mesmo local, assim como medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares durante um curto período de tempo (INMETRO, 2020).

A precisão intermediária consiste na precisão avaliada sob condições que compreendem o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares. Nesse estudo, devem-se variar uma ou mais condições como, analistas, equipamentos e/ou tempo. O valor de precisão intermediária é função do nível de concentração do ensaio e o seu cálculo é efetuado a partir dos resultados obtidos, após eliminação dos resultados discrepantes. A visualização gráfica dos valores também pode ser útil para identificá-los (INMETRO, 2020).

A reprodutibilidade não é um componente de validação de método executado por um único laboratório, contudo, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial (INMETRO, 2020).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental do presente trabalho baseia-se na otimização e validação de um método de preparo de amostra utilizando o método QuEChERS para a extração multirresíduo de agrotóxicos em caqui e posterior determinação por UHPLC-MS/MS. O trabalho foi realizado no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (DQ-UFSM).

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Para os ensaios do presente trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Agitador do tipo vórtex – Genie 2, modelo SI-0256 (Scientific Industries, EUA);
- Agitador do tipo vórtex multi tubos (Fisher Scientific, Reino Unido);
- Balança analítica de precisão AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- Balança analítica de precisão UX-420H (Shimadzu, Japão);
- Balança analítica APX-200 (Denver Instruments, Brasil);
- Banho ultrassônico, linha Sonorex modelo RK510 (Bandelin, Alemanha);
- Centrífuga refrigerada NT825 (Nova Técnica, Brasil);
- Estufa com circulação e renovação de ar modelo TE-394/I (Tecnal, Brasil)
- Evaporador Turbovap® LV (Biotage, Alemanha);
- Micropipetadores de capacidade variável (Brand, Alemanha; IKA, EUA);
- Mixer vertical – Black+Decker modelo Sb55 (Black & Decker, EUA);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3R (Millipore, EUA);
- Sistema UHPLC-MS/MS (Waters, EUA), equipado com: cromatógrafo a líquido modelo Acquity, composto de sistema controlador de solventes, bomba binária Acquity (Waters, EUA); detector MS do tipo triploquadropolo; modelo Xevo TQ-XS e amostrador automático sample manager FTN-I (Acquity) (Waters, EUA); interface/fonte de ionização por eletronebulização (ESI Zpray™) (Waters, EUA);
- Sistema gerador de nitrogênio, modelo NM30L-MS (PEAK Scientific, Escócia);
- Sistema de aquisição de dados MassLynx V 4.1 (Waters, EUA);
- Coluna analítica ACQUITY UPLC HSS T3 (100 x 2,1 mm; 1,8 µm) (Waters, EUA).

3.2 REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS

Os reagentes, solventes e demais materiais utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados abaixo:

- Acetato de etila para análises EMSURE[®] (Merck, Alemanha)
- Acetato de sódio anidro p.a. (J. T. Baker, EUA);
- Acetona, grau HPLC (Merck, Brasil);
- Acetonitrila, grau HPLC (Supelco, Alemanha);
- Ácido acético glacial 100% (J. T. Baker, EUA);
- Ácido fórmico 98% (J. T. Baker, EUA);
- Água ultrapurificada em sistema Milli-Q Direct 3UV[®] resistividade de 18,2 MΩ cm (Millipore, França);
- Amina primária e secundária (PSA), partícula de 50 µm (Supelco, Alemanha);
- Argônio grau de pureza 5.0 (Air Liquide, Brasil);
- Citrato de sódio diidratado, pureza ≥ 99% (Sigma-Aldrich, EUA);
- Cloreto de sódio p.a. (J. T. Baker, EUA);
- Discovery[®] DSC-C18 SPE, com diâmetro de partícula 50 µm (Supelco, Alemanha);
- Esferas de aço inoxidável de 9,5 mm de diâmetro, provenientes de rolamentos;
- Extran[®] neutro (Merck, Brasil);
- Filtros de nylon de 13 mm e porosidade de 0,22 µm (Nova Analítica, Brasil);
- Formiato de amônio (Sigma Aldrich, EUA);
- Frascos de vidro (vial), capacidade de 2 mL (Analítica, Brasil);
- Frascos de vidro, capacidade de 4 mL (Agilent, EUA)
- Hexano (95% n-hexano) (J. T. Baker, EUA);
- Hidrogenocitrato de sódio sesquiidratado, pureza ≥ 99% (Sigma-Aldrich, EUA);
- Metanol, grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Microtubos tipo Eppendorf, capacidade de 2 mL (Labcon, EUA);
- Nitrogênio grau de pureza 5.0 (analítico) (Air Liquide, Brasil);
- Padrões sólidos dos compostos em estudo (Tabela 11);
- Sílica com diâmetro de partícula 50 µm (Sigma-Aldrich, EUA);
- Sulfato de magnésio anidro p.a. (J. T. Baker, EUA);
- Tubos de polipropileno, com tampas de rosca, de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- Vidraria comum de laboratório.

3.3 AMOSTRAS DE CAQUI

No presente trabalho, a amostra de caqui empregada como “branco analítico”, que foi utilizada na otimização e validação do método de preparo de amostra proposto, foi adquirida da produção orgânica local. Os caquis foram acondicionados na geladeira até o momento do seu processamento. Foi realizada uma avaliação aplicando a técnica de UHPLC-MS/MS, confirmando a ausência de resíduos dos agrotóxicos em estudo.

O método desenvolvido foi aplicado na análise de 15 amostras de caqui, oriundas de diferentes localidades do estado do Rio Grande do Sul, conforme a Tabela 10, onde estão identificadas as variedades e localidades.

Tabela 10 – Amostras de caqui avaliadas no presente estudo, sua variedade e localidade de coleta

Identificação	Variedade	Origem
A 1	Fuyu	Santa Maria - RS
A 2	Fuyu	Santa Maria - RS
A 3	Taubaté	Farroupilha - RS
A 4	Chocolate	Santa Maria - RS
A 5	Kyoto	Caxias do Sul - RS
A 6	Chocolate	Santa Maria - RS
A 7	Chocolate	Santa Maria - RS
A 8	Kyoto	Santa Maria - RS
A 9	Fuyu	Gramado - RS
A 10	Rama-Forte	Farroupilha - RS
A 11	Rama-Forte	Santa Maria - RS
A 12	Kyoto	Santa Maria - RS
A 13	Kyoto	Caxias do Sul - RS
A 14	Taubaté	Farroupilha - RS
A 15	Rama-Forte	Santa Maria - RS

Fonte: o autor, 2022.

Para o processamento dos caquis, uma porção de 1 kg de cada amostra, em que foi retirada apenas as sementes e o cálice, foi cortada em pedaços e, então, processada em um *mixer* de alimentos. Os processados foram acondicionados em frascos de polipropileno, e armazenados em freezer, a uma temperatura em torno de

-18 °C. Ainda, para a realização dos ensaios, aguardou-se até que as amostras atingissem temperatura ambiente (25 °C).

3.4 COMPOSTOS SELECIONADOS E PREPARO DE SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Foram selecionados 98 agrotóxicos de diferentes classes para serem determinados neste trabalho. Esta escolha foi baseada em legislações vigentes para a matriz (UE e *Codex Alimentarius*), nos compostos de uso permitido na cultura do caqui no Brasil (ANVISA e AGROFIT) e com base nos materiais de referência disponíveis no banco de dados do laboratório. Os padrões sólidos dos agrotóxicos utilizados foram adquiridos das empresas LGC Standards (Alemanha), Sigma-Aldrich (EUA), Agilent (EUA), SPEX CertiPrep (EUA) e ChemService (EUA) e todos possuem pureza maior que 95%. A Tabela 11 lista tais agrotóxicos, bem como sua classe agrônômica, grupo químico, massa molecular e suas características físico-químicas.

A partir de cada composto sólido, preparou-se 10 mL das soluções estoque individuais de cada composto, na concentração de 1000 mg L⁻¹. Nessa etapa considerou-se a pureza de cada composto, a massa a ser pesada e a posterior diluição no solvente adequado (acetonitrila, metanol, água ou outro).

As soluções estoque foram armazenadas em frascos âmbar e mantidas sob refrigeração em temperatura abaixo de - 4 °C. Com isso, foram preparadas duas misturas de trabalho (mix), contendo todos os compostos em estudo, na concentração de 10 mg L⁻¹, ambas diluídas em acetonitrila, que foram armazenadas em frasco âmbar sob temperatura de - 4 °C. Estas soluções foram utilizadas para a realização da etapa de fortificação das amostras “branco” e também, para o preparo das curvas analíticas no extrato da matriz e no solvente. Assim, preparou-se uma solução padrão intermediária de 1 mg L⁻¹, a partir das soluções mistura. Para injeção no sistema UHPLC-MS/MS as concentrações finais das curvas analíticas foram 0,25; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 e 25 µg L⁻¹.

Tabela 11 – Compostos a serem determinados, sua pureza, fórmula molecular, massa molecular (g mol^{-1}), pKa, log Kow, Koc (mg L^{-1}) e solubilidade em água (mg L^{-1})

								(continua)
Nº	Compostos	Pureza (%)	Fórmula molecular	Massa molecular (g mol^{-1})	pKa	log Kow	Koc (mg L^{-1})	Solubilidade (mg L^{-1})
1	2,4 D	99,5	$\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_2\text{O}_3$	221,04	3,4	2,64	39,3	24300
2	Acetamiprido	99	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClN}_4$	222,67	0,7	0,8	20	790000
3	Atrazina	98,1	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{ClN}_5$	215,68	1,7	2,61	122	30
4	Azinfós-etil	97,7	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3\text{PS}_2$	345,38	-	3,4	237,1	8,25
5	Azinfós-metil	99	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_3\text{PS}_2$	317,32	5	2,53	69,7	43,54
6	Azoxistrobina	99,2	$\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5$	403,4	0,94	2,5	740,2	11,61
7	Bentazona	99	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	240,3	3,51	2,34	55,3	7112
8	Bitertanol	99	$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{NaO}_8$	452,36	3,35	1,03	302	64000
9	Boscalida	99	$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$	337,42	-	4,11	-	3,8
10	Bromuconazol I	99,5	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$	343,21	10,7	4	$3,74 \cdot 10^7$	2,61
11	Bromuconazol II	99,5	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$	343,21	10,7	4	$3,74 \cdot 10^7$	2,61
12	Buprofezin	99,3	$\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{OS}$	305,44	0,38	4,3	5741	2,43
13	Carbaril	100	$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_2$	201,22	10,4	2,36	241,7	416,2
14	Carbendazim	98,5	$\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	191,21	4,2	1,55	175,8	2441
15	Carbofurano	99	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_3$	221,26	3,78	2,32	70,85	353,9
16	Carbofurano-3-OH	97	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_4$	237,25	3,6	0,76	10	62000
17	Carboxina	99,5	$\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}$	235,3	0,5	2,14	79,96	423,7
18	Ciantraniliprole	97,5	$\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{BrClN}_6\text{O}_2$	473,7	-	3,18	-	-
19	Cinazina	99	$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{ClN}_6$	240,69	12,9	2,22	123,8	183,8
20	Ciprodinil	99,9	$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3$	225,29	4,44	4	-	13
21	Cletodim	90	$\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{ClNO}_3\text{S}$	359,9	4,47	4,14	-	5450
22	Clomazone	98,5	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{ClNO}_2$	239,7	-	2,5	4770	197,5
23	Clopiralida	99,69	$\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_2\text{NO}_2$	192	2,01	-2,63	-	143000
24	Clorimuron etil	99,5	$\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_6\text{S}$	414,82	4,2	2,5	78,19	18,15
25	Clorpirifós	99,9	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{NO}_3\text{PS}$	350,58	4,55	4,96	6829	0,36
26	Clorpirifós-metil	99,9	$\text{C}_7\text{H}_7\text{Cl}_3\text{NO}_3\text{PS}$	322,53	-	4,31	2008	1,89
27	Diazinona	97,5	$\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}$	304,35	2,6	3,81	1337	6,45
28	Diclofuanida	98,35	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}_2$	333,2	-	3,7	-	1,3
29	Difenoconazol I	99	$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_3$	406,26	1,07	4,3	2,43 1	0,6
30	Dimetoato	99,4	$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{NO}_3\text{PS}_2$	229,26	2	0,28	24,52	66000
31	Epoxiconazol	98,5	$\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClFN}_3\text{O}$	329,76	-	-	-	0,66
32	Espinetoram (J)	97,9	$\text{C}_{42}\text{H}_{69}\text{NO}_{10}$	748	9,17	-	-	-
33	Espinetoram (L)	97,9	$\text{C}_{43}\text{H}_{69}\text{NO}_{10}$	760	9,17	-	-	-
34	Espiromesifeno	98,94	$\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_4$	370,5	-	4,55	-	0,13
35	Etefon	96	$\text{C}_2\text{H}_6\text{ClO}_3\text{P}$	144,5	2,8	-1,89	-	800000
36	Etofenproxi	98	$\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_3$	376,5	-	6,9	-	0,0225
37	Fenarimol	99	$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$	331,2	-	3,62	3786	14
38	Fenoxapro-p-etil	98,51	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{ClNO}_5$	361,8	-	4,58	-	0,7
39	Fenpropatrina	99	$\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_3$	349,42	-	5,62	4473	0,046
40	Fentiona	95,5	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{PS}_2$	278,33	-	4,09	-	2
41	Fipronil	96,7	$\text{C}_{12}\text{H}_4\text{Cl}_2\text{F}_6\text{N}_4\text{OS}$	437,15	-	4	-	3,78
42	Flupiradifurona	99,8	$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClF}_2\text{N}_2\text{O}_2$	288,7	-	1,2	-	3200
43	Fluquinconazol	98,5	$\text{C}_{16}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{FN}_5\text{O}$	376,17	0,9	3,24	870	1,15

Tabela 11 – Compostos a serem determinados, sua pureza, fórmula molecular, massa molecular (g mol^{-1}), pKa, log Kow, Koc (mg L^{-1}) e solubilidade em água (mg L^{-1})

								(continuação)
Nº	Compostos	Pureza (%)	Fórmula molecular	Massa molecular (g mol^{-1})	pKa	log Kow	Koc (mg L^{-1})	Solubilidade (mg L^{-1})
44	Fluroxipir	96,5	$\text{C}_7\text{H}_5\text{Cl}_2\text{FN}_2\text{O}_3$	255,03	2,94	-	-	91
45	Flutolanil	99,5	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{NO}_2$	323,31	-	3,7	680	6,53
46	Imazali	97,5	$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$	297,18	6,53	-	2080	0,22
47	Imidacloprido	98,5	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ClN}_5\text{O}_2$	255,66	11,1	0,76	300	580
48	Iprovalicarbe I	98	$\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$	320,43	-	3,18	106	17,8
49	Iprovalicarbe II	98	$\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$	320,43	-	3,18	106	17,8
50	Linuron	99,4	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$	249,09	12,1	3,2	860	75
51	Malationa	99	$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{PS}_2$	330,36	6,8	2,7	1800	143
52	Mecarban	98	$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{NO}_5\text{PS}_2$	329,37	-	-	2,31	-
53	Mepronil	99	$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_2$	269,33	-	3,66	974	12,7
54	Metalaxil	99,5	$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_4$	279,33	-	1,71	163	8,41
55	Metamidofós	98,5	$\text{C}_2\text{H}_8\text{NO}_2\text{PS}$	141,13	-	-	8	$1,2 \cdot 10^6$
56	Metconazol	99,5	$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}$	319,83	11,3	3,85	1,71	30,4
57	Metiocarbe sulfona	98,5	$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$	257,31	-	-	-	-
58	Metsulfuron metil	99	$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}$	381,36	3,3	0,02	57	172
59	Mevinfós I	92	$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_6\text{P}$	224,1	-	0,13	72	2000
60	Mevinfós II	92	$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_6\text{P}$	224,1	-	0,13	72	2000
61	Miclobutanil	99	$\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{ClN}_4$	288,78	2,3	2,94	-	132
62	Monocrotofós	98	$\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_{11}$	670,9	6,6	5,43	-	$3,0 \times 10^{-3}$
63	Monolinuron	99,5	$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{NO}_5\text{P}$	223,16	-	0,22	19	$8,1 \times 10^5$
64	Oxamil	99	$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$	219,26	12,4	0,44	17	$1,5 \times 10^5$
65	Paraoxona etílica	99	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}_6\text{P}$	275,19	7,1	-	-	-
66	Pindimetalina	99,5	$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$	281,31	-	5,2	15744	0,33
67	Piraclostrobina	97,5	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_4$	387,82	-	3,99	9300	20
68	Pirazofós	97	$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_5\text{PS}$	373,36	-	3,8	646	4,2
69	Piridabem	99	$\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{ClN}_2\text{OS}$	364,9	-	6,37	66503	0,02
70	Piridafentiona	99	$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4\text{PS}$	340,33	-	3,1	7211	100
71	Piridato	96,5	$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$	378,92	-	4,01	55	1
72	Pirimetanil	99,5	$\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3$	199,28	3,52	2,84	301	121
73	Pirimicarbe	99,3	$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$	238,39	4,44	1,7	388	31000
74	Pirimifós metil	97,6	$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3\text{PS}$	305,33	4,3	4,2	1100	11
75	Piriproxifeno	99,9	$\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_3$	321	6,87	5,37	-	0,37
76	Procloraz	97	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_2$	376,7	3,8	4,13	500	26,5
77	Profenofós	98,5	$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{BrClO}_3\text{PS}$	373,63	-	4,44	2010	28
78	Propargito	94,5	$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{S}$	350,47	-	5,7	-	0,215
79	Propiconazol	97,5	$\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$	342,22	1,09	3,72	656	100
80	Propizamida	99	$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{NO}$	256,13	10,4	3,43	840	9
81	Propoxur	99,9	$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_3$	209,24	-	1,56	30	18000
82	Quincloraque	98,1	$\text{C}_{10}\text{H}_5\text{Cl}_2\text{NO}_2$	242,06	4,34	2,97	50	0,065
83	Quinoxifeno	99	$\text{C}_{15}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{FNO}$	308,13	-	4,66	22929	0,05
84	Simazina	98	$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{ClN}_5$	201,66	1,62	2,1	340	6
85	Tebuconazol	98,5	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}$	307,82	-	3,7	1000	32
86	Terbufós	99	$\text{C}_9\text{H}_{21}\text{O}_2\text{PS}_3$	288,4	-	4,48	500	4,5

Tabela 11 – Compostos a serem determinados, sua pureza, fórmula molecular, massa molecular (g mol^{-1}), pKa, log Kow, Koc (mg L^{-1}) e solubilidade em água (mg L^{-1})

Nº	Compostos	Pureza (%)	Fórmula molecular	Massa molecular (g mol^{-1})	pKa	log Kow	Koc (mg L^{-1})	(conclusão)
								Solubilidade (mg L^{-1})
87	Terbutilazina	99,5	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{ClN}_5$	229,71	2	3,21	219	6,6
88	Tetraconazol	98,3	$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{F}_4\text{N}_3\text{O}$	372,15	-	3,56	4680	187
89	Tiacloprido	98	$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{ClN}_4\text{S}$	252,72	-	-	615	184
90	Tiametoxam	99,5	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{ClN}_5\text{O}_3\text{S}$	291,71	-	0,13	64	41000
91	Tiodicarbe	97,4	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_3$	354,47	-	1,62	418	22
92	Tolclofós-metil	99	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{O}_3\text{PS}$	301,13	-	4,56	-	0,708
93	Triadimefon	99	$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{O}_2$	293,8	-	3,7	365	64
94	Triadimenol	98,5	$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_2$	295,76	-	3,08	273	72
95	Triclorfon	97	$\text{C}_4\text{H}_8\text{Cl}_3\text{O}_4\text{P}$	257,4	-	0,43	10	$1,2 \times 10^5$
96	Trifloxistrobina	98,8	$\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4$	408,37	-	4,5	2377	0,61
97	Triflumizol	98,5	$\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}$	345,75	3,7	5,06	1240	18
98	Vamidationa	98	$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{NO}_4\text{PS}_2$	287,34	-	-	70	4×10^6

Fonte: adaptação, 2022. Legenda: pKa - logaritmo negativo da constante de acidez do composto (Ka); log Kow - coeficiente de partição octanol/água; Koc - constante de sorção- teor de carbono orgânico.

3.5 UTILIZAÇÃO DO PADRÃO INTERNO (PI) E PADRÃO DE CONTROLE (PC)

Com o objetivo de assegurar a execução correta do procedimento de extração e de determinação para as amostras avaliadas no sistema cromatográfico e auxiliar na localização de fontes de erro, podem ser adicionados padrões em diferentes estágios do procedimento analítico (SANTE, 2015). Conforme a SANTE (2019), o padrão interno (PI) e o padrão de controle (PC) são substâncias químicas adicionadas nas amostras e no extrato final, em concentrações conhecidas.

Para verificar o desempenho da análise cromatográfica, utilizou-se a adição do composto trifenilfosfato (Sigma Aldrich, EUA) como padrão interno (PI) nas soluções a serem analisadas no sistema cromatográfico, sendo aceito valores de variação de área de até 20% (SANTE, 2019). Este padrão foi aplicado na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, ou seja, adição de $2 \mu\text{L}$ de uma solução de concentração 5mg L^{-1} , previamente preparada em acetonitrila. Ainda, de forma a garantir a eficiência do procedimento de extração, foi utilizado atrazina d-5 (Sigma Aldrich, EUA) como PC. A solução do PC deuterado foi preparada em acetonitrila na concentração de 10mg L^{-1} e foi adicionada previamente a etapa de extração dos analitos, na mesma concentração empregada para avaliação dos ensaios de recuperação ($0,5$; 1 ; 2 ; 10 e $20 \mu\text{g L}^{-1}$).

3.6 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAQUI

As condições de operação do sistema UHPLC-MS/MS Xevo TQ-XS foram estabelecidas através de otimizações de método realizadas no LARP-UFSM. Tais condições foram selecionadas com a aplicação de um planejamento experimental e são amplamente utilizadas em análises de rotina no laboratório. Estas condições do sistema de análise estão apresentadas na Tabela 12. Já o gradiente da fase móvel está demonstrado na Tabela 13.

Tabela 12 – Condições cromatográficas do sistema UHPLC-MS/MS Xevo TQ-XS

Parâmetro	Condição
Temperatura da coluna	45.0 °C
Voltagem do capilar (ESI+)	2,00 k V
Voltagem do capilar (ESI-)	2,53 k V
Temperatura de dessolvatação (N ₂)	600 °C
Temperatura da fonte	150 °C
Fluxo de gás - Dessolvatação	1000 L h ⁻¹
Fluxo de gás - Cone	150 L h ⁻¹
Fluxo de gás - Nebulização	7 bar
Vazão do gás de colisão	0,14 mL min ⁻¹
Volume de injeção	5 µL

Fonte: o autor, 2022.

Tabela 13 - Gradiente de fase móvel utilizado na determinação de resíduos de agrotóxicos em caqui por UHPLC-MS/MS Xevo TQ-XS

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
Inicial	95	5
0,25	95	5
7,75	0	100
8,5	0	100
8,51	95	5
10	95	5

Fonte: o autor, 2022.

Em relação à fase móvel utilizada, esta também é amplamente empregada na rotina do LARP-UFSM. A fase móvel foi composta por: (A) solução aquosa, com ácido fórmico 0,1% (v/v) e formiato de amônio 5 mmol L⁻¹, e (B) solução de acetonitrila:metanol (v/v) com ácido fórmico 0,1% e formiato de amônio 5 mmol L⁻¹. O tempo total de corrida foi de 10 min e vazão constante de 0,225 mL min⁻¹.

3.7 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAQUI UTILIZANDO UHPLC-MS/MS

3.7.1 Testes iniciais

Os métodos de preparo de amostra avaliados para serem utilizados neste trabalho foram estudados com base em trabalhos da literatura para determinação multirresíduo de agrotóxicos em frutas. Foram realizados testes iniciais utilizando as três versões do método QuEChERS: original (ANASTASSIADES et al., 2003), acetato (LEHOTAY et al., 2005) e citrato (ANASTASSIADES et al., 2007), apresentados na Tabela 14. Ainda, testes foram feitos empregando as técnicas de MSPD (T4) (KEMMERICH, 2017) e de extração com solvente, utilizando acetato de etila (T5) (CONSTANTINOU; LOUCA-CHRISTODOULOU; AGAPIOU, 2021), demonstrados na Figuras 2 e 3, respectivamente.

Neste caso, os testes foram feitos utilizando a amostra “branco analítico” de caqui, realizados em triplicata, no nível de fortificação de 25 µg kg⁻¹. Para a avaliação de tais testes, foram aplicadas etapas de adição de padrão na amostra antes (FA, fortificação na amostra) e após o procedimento de extração (PA, padrão na amostra), para verificar a interferência da matriz. Por isso, o cálculo de recuperação foi realizado de acordo com a Equação 5. Ainda, antes da injeção no equipamento, FA e PA foram filtradas com o auxílio de um filtro de nylon de 13 mm e porosidade de 0,2 µm.

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Área FA}}{\text{Área PA}} \times 100\% \quad (5)$$

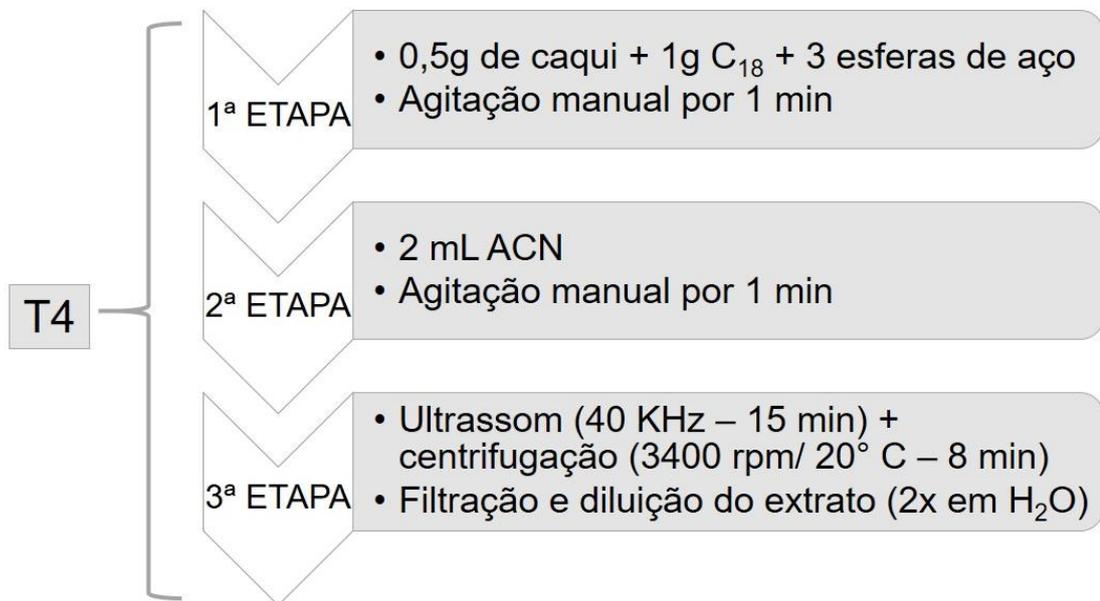
Tais testes de extração foram avaliados em relação ao número de compostos que apresentaram resultados aceitáveis (recuperação 70-120% e RSD ≤20%). Com a avaliação destes, optou-se por seguir os estudos iniciais utilizando apenas o método QuEChERS.

Tabela 14 – Resumo dos testes iniciais avaliados para a determinação de agrotóxicos em caqui através do método QuEChERS

Método QuEChERS			
Etapas	T1	T2	T3
Método	Acetato	Citrato	Original
Extração	15 g caqui + 15 mL ACN 1% HAc	10 g caqui + 10 mL ACN	10 g caqui + 10 mL ACN
Partição	6 g MgSO ₄ + 1,5 g CH ₃ COONa	4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl + 1 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O + 0,5 g C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ .1,5H ₂ O	4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl
Limpeza	4 mL sobrenadante + 600 mg MgSO ₄ + 100 mg PSA	4 mL sobrenadante + 600 mg MgSO ₄ + 100 mg PSA	4 mL sobrenadante + 600 mg MgSO ₄ + 100 mg PSA
Diluição	5x em H ₂ O	5x em H ₂ O	5x em H ₂ O

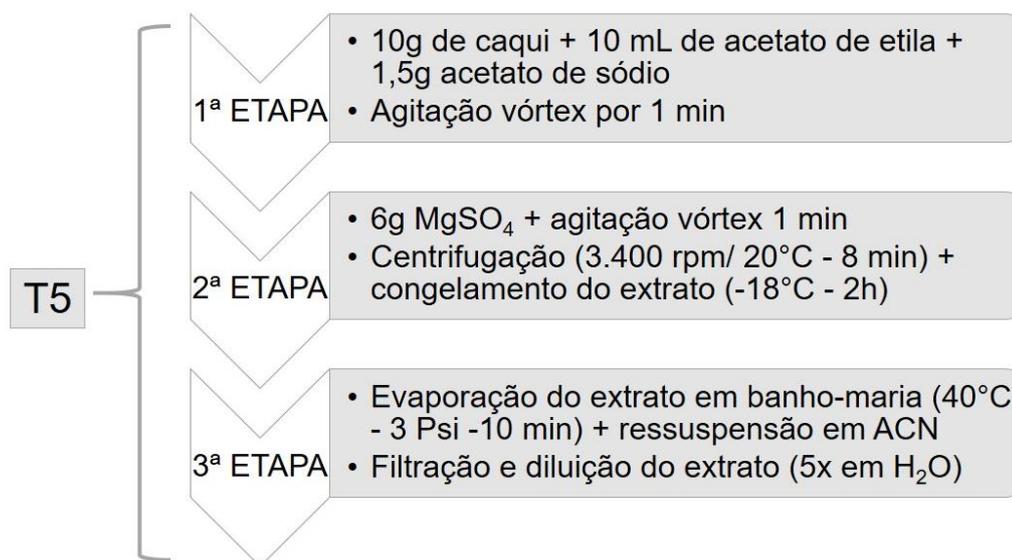
Fonte: o autor, 2022.

Figura 2 – Fluxograma do procedimento MSPD, avaliado para a determinação de agrotóxicos em caqui



Fonte: o autor, 2022.

Figura 3 – Fluxograma do procedimento de extração com acetato de etila, avaliado para a determinação de agrotóxicos em caqui



Fonte: o autor, 2022.

3.7.2 Avaliação gravimétrica dos coextrativos obtidos após realização da etapa de extração

Para verificar a quantidade de coextrativos da matriz, provenientes dos métodos de extração foram realizados testes gravimétricos (SAPOZHNIKOVA; LEHOTAY, 2013) para QuEChERS original, acetato e citrato, utilizando os métodos de extração citados na Tabela 14 (T1 a T3), com e sem a etapa de limpeza, como demonstrado na Tabela 15.

Tabela 15 – Identificação dos testes gravimétricos utilizando os métodos QuEChERS

Identificação	Método QuEChERS
T6	Acetato sem etapa de limpeza
T7	Acetato com etapa de limpeza
T8	Citrato sem etapa de limpeza
T9	Citrato com etapa de limpeza
T10	Original sem etapa de limpeza
T11	Original com etapa de limpeza

Fonte: o autor, 2022

Os testes gravimétricos foram feitos em triplicata, com amostra “branco analítico” de caqui. Para isso, tubos de vidro foram lavados com água, água Milli-Q e acetona e em seguida secos em estufa à 105 °C por 1 h. Em seguida, os tubos foram acomodados em dessecador até atingirem a temperatura ambiente (± 25 °C), na sequência foram devidamente identificados e cada tubo foi pesado 6 vezes em balança analítica e as massas foram anotadas. Para a análise transferiram-se 5 mL dos extratos obtidos nos testes T6, T7, T8, T9, T10 e T11 para cada tubo, e estes foram colocados em estufa para a evaporação do solvente, a temperatura da estufa foi elevada gradativamente, para evitar projeções, de 60 até 110 °C, até o solvente evaporar completamente. Por fim, os tubos foram colocados em dessecador novamente, até a temperatura ambiente e a pesagem foi repetida, 6 vezes para cada tubo, calculando a média destes valores para a obtenção da massa de coextrativos da matriz.

3.7.3 Avaliação do uso de C18 na etapa de limpeza

Após a análise do melhor procedimento de extração QuEChERS, que apresentou o maior número de compostos recuperados, avaliou-se o comportamento do sorvente C18 na efetividade de limpeza do extrato final por d-SPE. Para isso, foi realizado o teste 12 (T12), seguindo o mesmo procedimento do T1 (Tabela 14), porém, com a aplicação de 500 mg de C18 juntamente com o $MgSO_4$ e o PSA na etapa de limpeza. Esse teste foi feito utilizando a mesma amostra “branco analítico” de caqui, em triplicata, no nível de fortificação de 25 $\mu g\ kg^{-1}$. Para a avaliação deste foram aplicadas etapas de FA e PA, para verificar a interferência da matriz (Equação 5). Por fim, FA e PA foram filtradas em filtro de nylon de 13 mm e porosidade de 0,2 μm e injetados no equipamento cromatográfico. O T12 foi avaliado em relação ao número de compostos que apresentaram resultados aceitáveis de recuperação (70-120%).

Além disso, foi realizado o teste gravimétrico em triplicata para esse método de extração (teste 13 – T13), seguindo o mesmo procedimento do item 3.7.2, para a avaliação da interferência do sorvente C18 na quantidade de coextrativos da matriz. A massa de coextrativos obtida no T13 foi comparada com a massa de coextrativos atingida no T7, para a avaliação da necessidade da aplicação do sorvente C18 na etapa de limpeza.

3.7.4 Avaliação de diluições dos extratos obtidos após realização da etapa de extração e o efeito matriz relacionado

Para a versão do método QuEChERS que apresentou o maior número de compostos recuperados, foi avaliada a possibilidade de a extração ser aplicada sem a etapa de limpeza, avaliando para isso, diferentes diluições e o efeito matriz relacionado. Para isso foi utilizado o extrato da amostra “branco” de caqui, com o método QuEChERS original, sem a etapa de limpeza, fortificado nos níveis 2, 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foram avaliadas diluições de 10, 20, 40, 50 e 100 vezes (Tabela 16) utilizando água ultrapura. Como exemplo, para a diluição de 20 vezes, para a injeção de 1 mL, foram utilizados 50 μL do extrato fortificado obtido juntamente com 950 μL de água ultrapura. Os resultados foram comparados com os quatro níveis (2, 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$) de uma curva de trabalho em solvente (CTS) para a obtenção do efeito matriz através da Equação 6.

$$EM (\%) = (A_m - A_s) / A_m \times 100 \quad (6)$$

Em que:

A_m = área da solução analítica preparada extrato da matriz (caqui);

A_s = área da solução analítica preparada no solvente (acetoneitrila).

Tabela 16 – Resumo dos testes de diluição realizados para a determinação de agrotóxicos em caqui

Identificação	Método
	QuEChERS original sem etapa de limpeza
T14	diluição de 10x em água ultrapura
T15	diluição de 20x em água ultrapura
T16	diluição de 40x em água ultrapura
T17	diluição de 50x em água ultrapura
T18	diluição de 100x em água ultrapura

Fonte: o autor, 2022.

Por fim, para comparar a quantidade de coextrativos da matriz presentes nos extratos, foram realizados três testes gravimétricos (T19, T20 e T21) com os extratos obtidos nos testes T14, T15, T16 (QuEChERS original sem a etapa de limpeza, com diluições), respectivamente, e os resultados da quantidade de coextrativos provenientes da matriz foram comparadas com o resultado do T11 (gravimétrico

utilizando o extrato obtido por QuEChERS original com a etapa de limpeza). O procedimento para a realização dos testes gravimétricos seguiu-se da mesma forma como já citado no presente trabalho.

3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE PROPOSTO

O método QuEChERS otimizado utilizado para posterior determinação de resíduos de agrotóxicos em caqui por UHPLC-MS/MS no presente trabalho foi validado de acordo com os parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, efeito matriz, exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária), descritos no guia da SANTE (2019). Tais parâmetros estão descritos na Tabela 17, bem como suas definições e aplicações.

Tabela 17 – Parâmetros de validação avaliados no desenvolvimento do método analítico proposto

Parâmetro	Aplicação	Critério	Referência
Seletividade	Extração da matriz livre dos analitos de interesse (matriz branco)	Ausência de picos de interferentes nos tempos de retenção dos analitos de interesse	SANTE, 2019
Linearidade e faixa de trabalho	Curva analítica ($y = ax + b$). Faixa linear de 0,25 a 25 $\mu\text{g L}^{-1}$	$r^2 \geq 0,99$	INMETRO, 2020
Sensibilidade	Curva analítica ($y = ax + b$)	-	INMETRO, 2020
Efeito matriz	Comparação entre as inclinações das curvas preparadas em solvente (ACN) e na matriz "branco"	$EM \pm 20\%$	SANTE, 2019
Limite de detecção (LOD)	LOD 3,33 vezes menor que o valor de LOQ	-	INMETRO, 2020
Limite de quantificação (LOQ)	Menor concentração que, fortificada na matriz (n=6), apresente resultados aceitáveis de exatidão e precisão	Recuperações 70 - 120% e $RSD \leq 20\%$	INMETRO, 2020; SANTE, 2019
Exatidão	Ensaio de fortificação em extrato da matriz "branco" nos níveis 0,5, 1, 2, 10 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Recuperações entre 70 – 120%	INMETRO, 2020; SANTE, 2019
Precisão	Repetitividade: RSD para 7 replicatas. Precisão intermediária: execução em dias diferentes	$RSD \leq 20\%$	INMETRO, 2020; SANTE, 2019

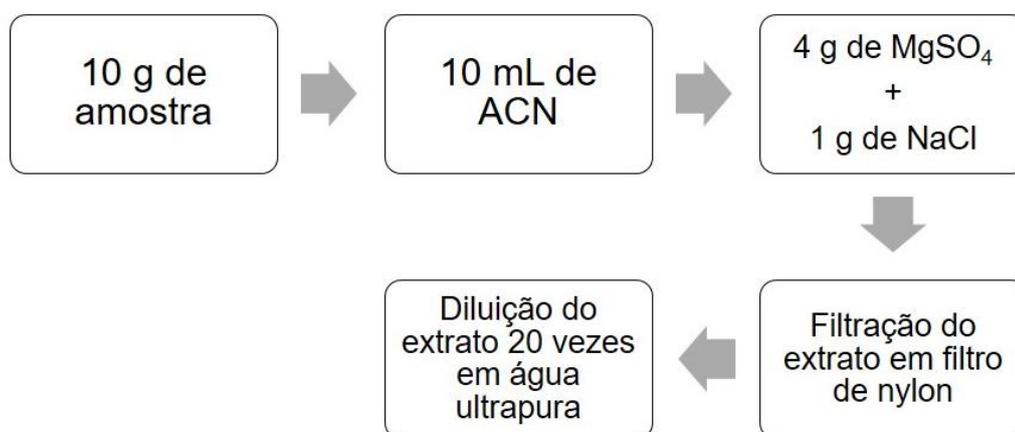
Fonte: o autor, 2022.

3.8.1 Método QuEChERS validado neste estudo

No procedimento de extração que foi validado no presente trabalho foram pesados 10 g de amostra de processado de caqui em um tubo de polipropileno com capacidade para 50 mL, em seguida foram adicionados 10 mL do solvente acetonitrila, seguido de agitação em vórtex por 1 min. Após, adicionaram-se os sais de partição, nesse caso, 4 g de $MgSO_4$ e 1 g de $NaCl$, seguido de agitação manual por 1 min e centrifugação a 3400 rotações por minuto (rpm) por 8 min.

O extrato obtido foi filtrado em filtro de nylon e armazenado em tubos de polipropileno, com capacidade de 15 mL para posterior uso. Por fim, para a injeção no sistema cromatográfico, em um vial de vidro este extrato foi diluído 20 vezes com água ultrapura. Com isso, foram avaliados 98 agrotóxicos no sistema UHPLC-MS/MS, utilizando o método de preparo de amostra proposto, conforme a Figura 4.

Figura 4 – Fluxograma do método QuEChERS proposto a ser validado neste estudo



Fonte: o autor, 2022.

3.8.2 Aplicação do método em amostras comerciais

O método desenvolvido e validado neste trabalho foi aplicado para determinação de resíduos de agrotóxicos em 15 amostras comerciais de caqui, apresentadas na Tabela 10, visando demonstrar a aplicabilidade do método proposto em análises de rotina.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAQUI

Utilizando o sistema UHPLC-MS/MS foi possível identificar e quantificar 86 agrotóxicos em caqui empregando o método QuEChERS, sem a etapa de limpeza. O uso deste sistema cromatográfico proporcionou alta seletividade, informação estrutural, sensibilidade e uma grande eficiência na separação dos compostos, em um curto período, visto que o tempo total de aquisição dos dados foi de 10 min.

Os parâmetros utilizados no sistema UHPLC-MS/MS para a determinação dos 98 agrotóxicos inicialmente avaliados, no modo de aquisição SRM e no modo de ionização ESI⁺, exceto para os compostos 2,4-D e fipronil, que foram determinados no modo de ionização ESI⁻, bem como o padrão de controle e o padrão interno estão apresentados na Tabela 18. A tabela demonstra os tempos de retenção (t_R), transições com os íons precursores e íons produtos, voltagem do cone (VC) e energias de colisão (EC) selecionados para cada composto, para as etapas de quantificação e identificação de cada analito em estudo.

Tabela 18 - Compostos determinados por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos tempos de retenção (t_R), voltagem do cone (VC), íons precursores e produto, e energias de colisão (EC) utilizados

(continua)

Nº	Analito	t_R (min)	VC (V)	Íon Precursor (m/z)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
					Íon produto (m/z)	EC (eV)	Íon produto (m/z)	EC (eV)
1	2,4 D	6,30	12	219	124,9	26	160,8	10
2	Acetamiprido	4,80	30	223	56,1	15	126	20
3	Atrazina	6,59	48	216,1	96	22	174,1	16
4	Azinfós-etil	7,73	14	346	77,1	36	132	16
5	Azinfós-metil	7,04	5	318	132	15	261	8
6	Azoxistrobina	7,20	15	404,1	328,9	30	372	16
7	Bentazona	5,65	21	241,1	107,2	26	199,1	12
8	Bitertanol	7,98	30	338,1	70,1	8	98,9	16
9	Boscalida	7,37	25	342,9	139,9	20	307	45
10	Bromuconazol I	8,11	15	376	70,1	20	158,9	30
11	Bromuconazol II	8,11	15	376	70,1	40	158,9	45

Tabela 18 - Compostos determinados por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos tempos de retenção (min), voltagem do cone (VC), íons precursores (m/z), íons produto (m/z) e energias de colisão (EC) utilizados

(continuação)

Nº	Analito	t _R (min)	VC (V)	Íon Precursor (m/z)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
					Íon produto (m/z)	EC (eV)	Íon produto (m/z)	EC (eV)
12	Buprofezin	8,92	20	306,1	115,9	16	201	12
13	Carbaril	6,21	30	202,1	117,1	24	145,1	10
14	Carbendazim	3,78	24	192,1	132,1	30	160,1	18
15	Carbofurano	6,09	5	222,1	123	20	165,1	10
16	Carbofurano-3-hidroxi	4,62	34	238	163	16	181	10
17	Carboxina	6,33	5	236	87	25	143	15
18	Ciantraniliprole	6,48	32	472,7	283,9	14	442	17
19	Cinazina	5,78	41	241	96	25	241	17
20	Ciprodinil	7,94	5	226	93	35	108	25
21	Cletodim	8,61	25	360	164	20	268,1	10
22	Clomazone	7,01	23	240	89	46	125	18
23	Clopiralida	3,20	30	191,9	145,9	20	173,9	10
24	Clorimuron etil	7,29	46	415,1	83	40	186	15
25	Clorpirifós	8,89	10	350,1	97	22	197,4	16
26	Clorpirifós-metil	8,33	34	321,8	125	20	289,9	16
27	Diazinona	8,27	20	305,1	96,9	35	169	22
28	Diclofuanida	7,80	19	333	123	24	224	48
29	Difenoconazol I	8,23	10	406	111,1	35	251,1	25
30	Dimetoato	4,79	20	230	124,8	22	230	10
31	Epoxiconazol	7,58	15	330	101	50	121	22
32	Espinetoram (J)	8,39	60	748,5	98	35	142,1	30
33	Espinetoram (L)	8,59	34	760,5	98	66	142	30
34	Espiromesifeno	9,18	35	371,1	255,1	25	273,1	5
35	Etefon	8,39	25	409	145	40	186	16
36	Etofenproxi	9,60	17	394,3	106,9	43	394,3	28
37	Fenarimol	7,48	40	331	81	30	268	25
38	Fenoxapro-p-etil	8,52	30	362	119	25	228	17
39	Fenpropatrina	8,89	24	350,1	97	34	125	14
40	Fentiona	8,01	25	279	104,9	25	168,9	18
41	Fipronil	7,81	34	434,9	249,9	28	329,9	16
42	Flupiradifurona	4,98	30	288,9	90	44	125,9	30
43	Fluquinconazol	7,53	25	376	306,9	25	348,8	20
44	Fluroxipir	5,48	28	254,9	180,8	22	208,8	16
45	Flutolanil	7,46	35	324,1	65	35	262,1	20
46	Imazali	6,27	31	297,1	69	18	159	22
47	Imidacloprido	4,54	25	256,1	174,9	20	209	12

Tabela 18 - Compostos determinados por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos tempos de retenção (min), voltagem do cone (VC), íons precursores (m/z), íons produto (m/z) e energias de colisão (EC) utilizados

(continuação)

Nº	Analito	t _R (min)	VC (V)	Íon Precursor (m/z)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
					Íon produto (m/z)	EC (eV)	Íon produto (m/z)	EC (eV)
48	Iprovalicarbe I	7,53	20	321,1	119,1	20	203,1	10
49	Iprovalicarbe II	7,53	20	321,1	119,1	20	203,1	10
50	Linuron	7,17	20	249	159,9	20	181,9	16
51	Malationa	7,53	30	331	98,9	25	126,9	12
52	Mecarban	7,78	21	330	97	35	227,1	8
53	Mepronil	7,51	15	270,1	91	35	119	25
54	Metalaxil	6,79	10	280,1	192,1	20	220,1	15
55	Metamidofós	2,45	30	141,9	93,9	12	124,8	14
56	Metconazol	8,06	5	320,1	70	25	125	30
57	Metiocarbe sulfona	4,98	31	258,1	107,1	38	122,1	19
58	Metsulfuron metil	5,93	28	382	167	16	198,9	22
59	Mevinfós I	4,64	15	225,1	127,1	15	193,1	10
60	Mevinfós II	5,10	30	225,1	127,1	15	193,1	5
61	Miclobutanil	7,41	25	289,1	70,2	15	125,1	30
62	Monocrotofós	3,79	15	224,1	98,1	12	224,1	16
63	Monolinuron	6,41	15	215	99	30	126,1	15
64	Oxamil	3,61	15	237	72	10	90	10
65	Paraoxona etílica	6,61	28	276,1	220,1	17	248,2	16
66	Pindimetalina	8,94	12	282,2	194,1	17	282,2	10
67	Piraclostrobina	8,18	25	388,1	163	25	193,9	12
68	Pirazofós	8,23	33	374	194	32	222,1	22
69	Piridabem	9,35	5	365,1	147,1	24	309,1	12
70	Piridafentiona	7,46	31	341	92	34	189	22
71	Piridato	9,57	28	379	207	18	351,1	10
72	Pirimetanil	7,13	25	200	82	24	107	24
73	Pirimicarbe	6,06	25	239,1	72,4	18	182,1	15
74	Pirimifós metil	8,42	42	306,3	108,1	30	164,1	22
75	Piriproxifeno	8,78	5	322,1	96	15	227,1	10
76	Procloraz	8,11	10	375,8	70,1	24	265,8	16
77	Profenofós	8,64	30	372,9	127,9	40	302,6	20
78	Propargito	9,00	10	368,3	175,2	15	231,2	9
79	Propiconazol	8,07	35	342,1	69,1	30	158,9	20
80	Propizamida	7,42	31	256,1	173	23	190	16
81	Propoxur	6,06	15	210,1	92,9	25	110,9	12
82	Quincloraque	5,25	20	241,9	161	36	193	28

Tabela 18 - Compostos determinados por UHPLC-MS/MS, com seus respectivos tempos de retenção (min), voltagem do cone (VC), íons precursores (m/z), íons produto (m/z) e energias de colisão (EC) utilizados.

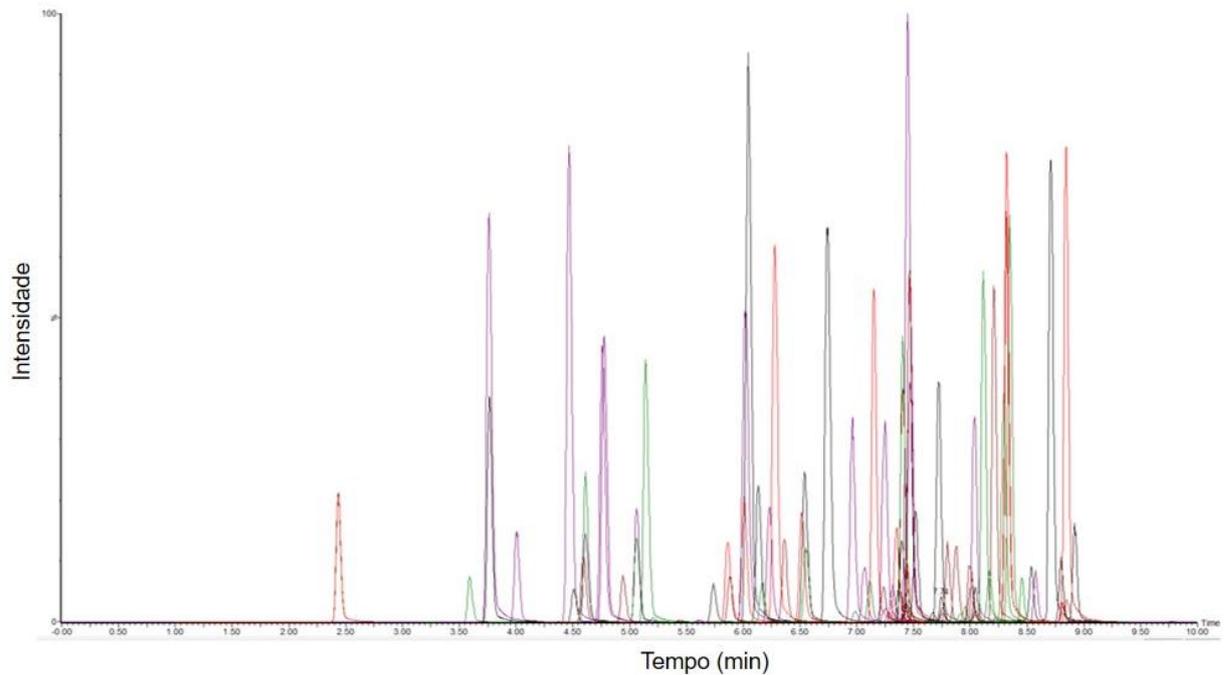
(conclusão)

Nº	Analito	t _R (min)	VC (V)	Íon Precursor (m/z)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
					Íon produto (m/z)	EC (eV)	Íon produto (m/z)	EC (eV)
83	Quinoxifeno	8,87	15	308	161,9	35	197	30
84	Simazina	5,91	40	202	96	22	124	16
85	Tebuconazol	7,86	30	308,2	70,1	24	124,9	40
86	Terbufós	8,76	12	289	103	8	233	2
87	Terbutilazina	7,30	28	230	96	28	174	16
88	Tetraconazol	7,50	15	372	70,1	20	159	25
89	Tiacloprido	5,18	35	253	90	40	125,8	20
90	Tiametoxam	4,03	25	292	132	20	211,2	10
91	Tiodicarbe	6,18	17	355	88,1	16	108,1	16
92	Tolclofós-metil	8,29	30	300,9	111	71	124,9	16
93	Triadimefon	7,46	30	294,1	69,1	20	196,9	16
94	Triadimenol	7,34	30	296,1	70	10	98,9	15
95	Triclorfon	4,56	25	256,9	108,8	20	126,8	18
96	Trifloxistrobina	8,39	25	409,2	145	40	185,9	14
97	Triflumizol	8,36	15	346,1	73,1	18	278	10
98	Vamidotiona	4,49	25	288	118	25	146	10

Fonte: o autor, 2022.

A Figura 5 apresenta um cromatograma de íon totais (TIC) obtido para uma solução padrão preparada em acetonitrila na concentração de 20 µg L⁻¹, utilizando o extrato da amostra branco de caqui, contendo todos os agrotóxicos avaliados neste estudo.

Figura 5 - Cromatograma de íons totais obtido por UHPLC-MS/MS a partir de uma solução padrão $20 \mu\text{g L}^{-1}$ em acetonitrila.



Fonte: o autor, 2022.

4.2 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CAQUI

4.2.1 Avaliação das condições de extração

Apesar de diversos estudos que vem sendo amplamente desenvolvidos para os métodos de análise de resíduos de agrotóxicos em frutas frescas, os resultados ainda são passíveis de variações, em função da grande variedade de frutas. O fruto de caqui, possui inúmeras variedades, e estas levam a diferenças no teor de açúcar, na acidez, quantidade de fibras e pigmentos, tais diferenças levam a alterações nos resultados analíticos. Assim, o desenvolvimento de procedimentos rápidos e simples de extração de resíduos de agrotóxicos de diferentes classes, com variadas propriedades físico-químicas em matrizes como frutas, representa um grande desafio.

Por isso, é necessário desenvolver um método para a análise multirresíduo de agrotóxicos em caqui, que remova os interferentes advindos da matriz minimizando problemas de coextrativos (MIN *et al.*, 2011). Por isso, inicialmente foram analisados

cinco diferentes métodos de extração, para determinação do mais eficiente, conforme os testes T1 a T5 (Tabela 14 e Figuras 2 e 3).

No teste 4 (Figura 2), o qual se realizou o método de MSPD (KEMMERICH, 2017), não houve recuperação adequada dos analitos, isso pode se dever ao fato que o C₁₈ é muito efetivo para promover a limpeza de diversas matrizes, especialmente para as que contém gordura, o que não é o caso do caqui. Esse fruto se destaca pela alta presença de açúcares, por isso, a recuperação tão baixa pode estar relacionada a falta do uso de outros sorventes, como o PSA, que é ótimo para remover açúcares e outros compostos polares. Outro fator é que o método foi realizado com uma pequena quantidade de amostra (0,5 g), o que pode ser uma fonte de erros na execução do processo de extração.

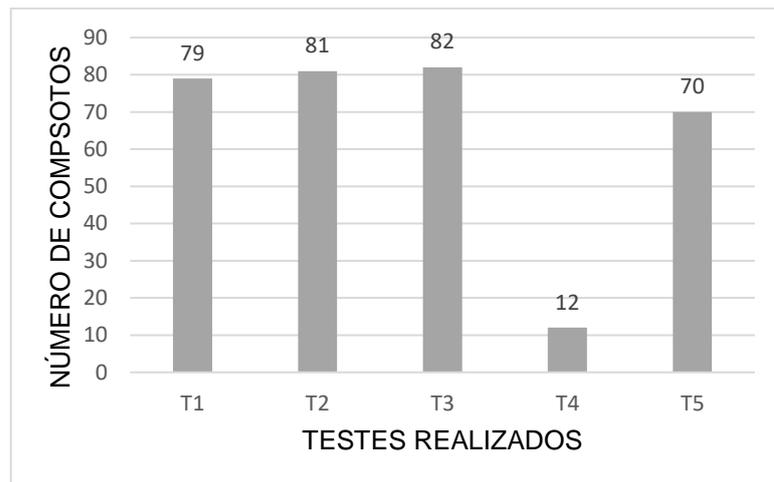
O método de extração com acetato de etila, teste 5 (Figura 3) obteve-se resultados satisfatórios, mas menos compostos foram recuperados, se comparados com o método QuEChERS. O acetato de etila é bastante aceitável como solvente de extração para diversas matrizes e é considerado especialmente adequado para a extração de matrizes com alto teor de açúcar, como é o caso do caqui, pois o açúcar possui solubilidade limitada em acetato de etila (CONSTANTINO; LOUCA-CHRISTODOULOU; AGAPIOU, 2021). Contudo, esse método foi originalmente desenvolvido para análises por GC, nesta análise existe a necessidade de uma etapa de evaporação, em que pode ocorrer perda dos analitos, causando uma diminuição nos resultados de recuperação que empregam a evaporação, como no caso desse método.

Em relação ao método QuEChERS, a diferença foi mínima entre as variações (Tabela 14) - acetato (T1), citrato (T2) e original (T3), sendo a técnica mais adequada para a determinação de resíduos de agrotóxicos em caqui. O método QuEChERS minimiza o manuseio da amostra, não é necessário evaporação, o analista não é exposto durante a análise e é um método simples e robusto para a análise de resíduos de agrotóxicos e vem sendo amplamente utilizado na rotina em laboratórios (KEMMERICH, 2017).

O QuEChERS original foi a modificação mais eficiente, recuperando 82 de 98 compostos analisados (> 80%), gerando bons resultados de recuperação e RSD na faixa esperada, esse método não possui uma etapa de tamponamento como os demais, sendo assim, é um método mais simples e utiliza menos reagentes, sendo mais barato e contribuindo para a química verde. Tais resultados estão detalhados na

Figura 6, que demonstra o número de compostos em que se obteve recuperações entre 70 e 120%, para todos os testes citados.

Figura 6 - Representativo do número de compostos com recuperações entre 70 a 120%, nos testes T1 a T5



Fonte: o autor, 2022. Legenda: T1= QuEChERS acetato, T2= QuEChERS citrato, T3= QuEChERS original, T4= MSPD e T5= Extração com acetato de etila.

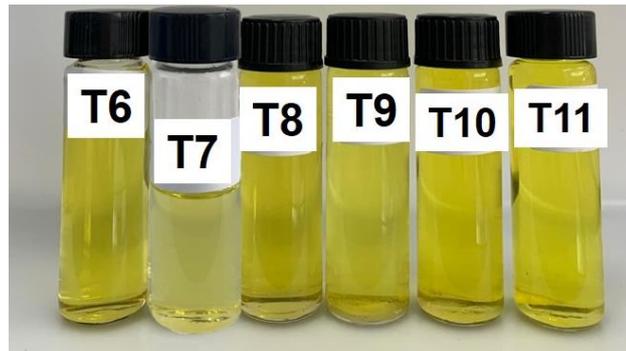
4.2.2 Avaliação gravimétrica dos coextrativos presentes no extrato

Após a verificação que as variações do método QuEChERS foram os métodos que apresentaram melhores níveis de recuperação foi realizada a avaliação da quantidade de coextrativos não-voláteis presentes no extrato final. Essa análise foi feita utilizando os métodos de extração QuEChERS, acetato (T1), citrato (T2) e original (T3), após etapa de limpeza por d-SPE (testes T7, T9 e T11, respectivamente). Ainda, avaliou-se o impacto da ausência da etapa de limpeza (testes T6, T8 e T10) na quantidade de coextrativos no extrato final. Os procedimentos de extração foram realizados, em triplicata, na amostra “branco” de caqui. A Figura 7 apresenta a aparência dos extratos após a realização das etapas de extração com e sem etapa limpeza por d-SPE.

Com essa figura, é possível verificar que não existe uma diferença significativa no aspecto visual com a realização da etapa de limpeza por d-SPE, o T7 foi o que demonstrou uma diminuição mais significativa na presença de pigmentos nos extratos

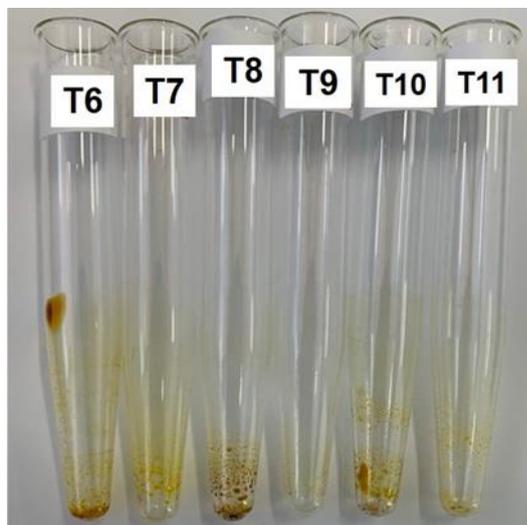
avaliados. A Figura 8 demonstra os coextrativos não-voláteis presentes no extrato final de cada teste (T6 a T11), após o procedimento descrito no item 3.7.2.

Figura 7 - Aparência dos extratos obtidos pela extração utilizando as variações do método QuEChERS com e sem a etapa de limpeza.



Fonte: o autor, 2022. Legenda: T6= QuEChERS acetato sem limpeza, T7= QuEChERS acetato com limpeza, T8= QuEChERS citrato sem limpeza, T9= QuEChERS citrato com limpeza, T10= QuEChERS original sem limpeza T11= QuEChERS original com limpeza.

Figura 8 - Avaliação visual dos extratos obtidos, após a análise gravimétrica, utilizando as variações do método QuEChERS com e sem etapa de limpeza por d-SPE



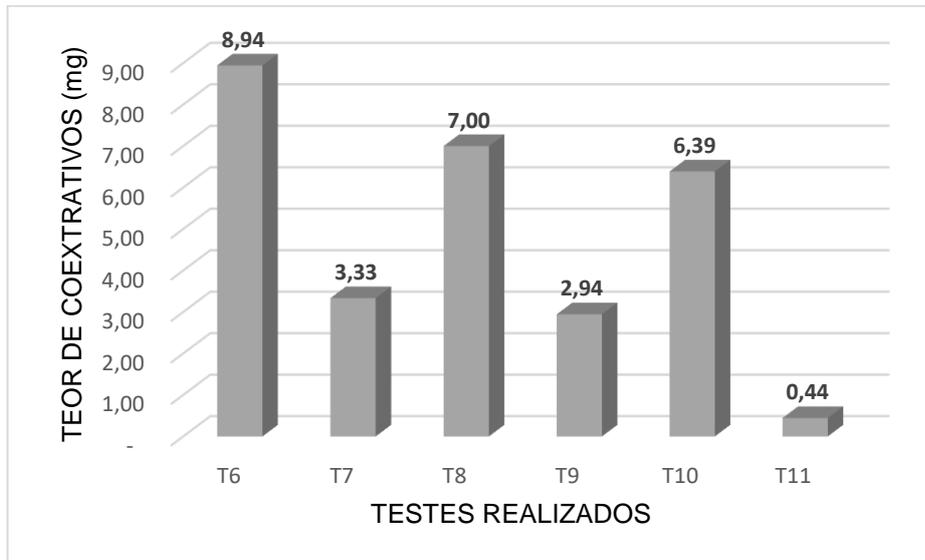
Fonte: o autor, 2022. Legenda: T6= QuEChERS acetato sem limpeza, T7= QuEChERS acetato com limpeza, T8= QuEChERS citrato sem limpeza, T9= QuEChERS citrato com limpeza, T10= QuEChERS original sem limpeza T11= QuEChERS original com limpeza.

Já nessa avaliação, diferente da Figura 7, é possível visualizar grande diferença na quantidade de coextrativos advindos da matriz. Neste caso, observa-se que as maiores quantidades de coextrativos estão presentes nos tubos de ensaio que continham os extratos provenientes dos testes T6, T8 e T10, onde não foi realizada a

etapa de limpeza por d-SPE. Esta avaliação teve como finalidade verificar a quantidade (em mg) de coextrativos não-voláteis remanescentes, em cada extrato seco.

Com isso, pode-se verificar as quantidades de coextrativos não-voláteis presentes nos extrativos obtidos utilizando as variações do método QuEChERS. Corroborando com a Figura 7, pode-se verificar que as menores quantidades de coextrativos não voláteis advindos da matriz estão presentes nos extratos obtidos com as versões do método QuEChERS original (T11; 0,44 mg) < citrato (T9; 2,94 mg) < acetato (T7; 3,33 mg) após a realização da etapa de limpeza por d-SPE. Ainda, na Figura 9, é possível verificar o resumo dos resultados do teor de coextrativos (em mg) obtidos com os testes gravimétricos das variações do método QuEChERS com e sem a etapa de limpeza (T6 a T11).

Figura 9 - Comparação entre as quantidades de coextrativos não-voláteis retidos em cada variação do método QuEChERS, com e sem etapa de limpeza



Fonte: o autor, 2022. Legenda: T6= QuEChERS acetato sem limpeza, T7= QuEChERS acetato com limpeza, T8= QuEChERS citrato sem limpeza, T9= QuEChERS citrato com limpeza, T10= QuEChERS original sem limpeza T11= QuEChERS original com limpeza.

Essa análise gravimétrica revelou a necessidade de uma etapa de limpeza, para que a quantidade de coextrativos não-voláteis no extrato final seja mínima, visto que esses compostos são considerados interferentes e estão relacionados com o efeito matriz, o qual pode acarretar em prejuízos na ionização dos analitos de interesse na análise por cromatografia líquida. Nos testes com a etapa de limpeza (T7, T9 e T11), juntamente com o MgSO₄ utilizou-se o sorvente PSA, que como já citado,

atua na remoção de pigmentos, ácidos graxos de cadeia curta, açúcares e compostos polares em função do seu elevado efeito quelante, fornecido por sua estrutura bidentada, sendo usado para remoção de diversos coextrativos interferentes (CABRERA *et al.*, 2012).

O caqui possui um nível elevado de açúcares, pigmentos e compostos polares, como os taninos, por isso o uso do PSA em uma etapa de limpeza se apresenta tão bem na remoção dos coextrativos não-voláteis advindos da matriz. Apesar das inúmeras vantagens, a utilização do sorvente PSA na etapa de limpeza por d-SPE precisa ser avaliada em função dos analitos de interesse e do pH do meio onde ocorre a extração, pois este sorvente pode atuar na retenção de agrotóxicos com características ácidas, como o 2,4-D (ALBARNAZ, 2021).

Com tais resultados da análise gravimétrica, bem como os resultados apresentados no item 4.2.1 ficou evidente que a versão QuEChERS original é a melhor variação para o método de extração multirresíduo de agrotóxicos no fruto de caqui, pois removeu a maior quantidade de coextrativos não-voláteis, diminuindo o efeito matriz e apresentou o maior número de compostos com níveis de recuperação satisfatórios (entre 70 e 120%).

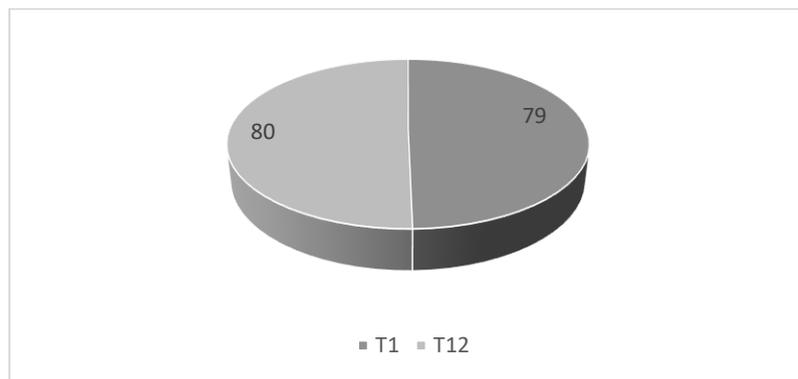
4.2.3 Avaliação do uso de C18 na etapa de limpeza do extrato

A partir de tais testes, que demonstraram o método QuEChERS como a melhor técnica para a extração de resíduos de agrotóxicos em caqui, com base em artigos publicados na literatura que demonstraram a variação acetato como a mais eficaz para determinação de agrotóxicos em frutas e fundamentado em estudos que realizaram a extração de agrotóxicos em caqui utilizando QuEChERS, aplicando o C18 na etapa de limpeza juntamente com o MgSO₄ e o PSA, foi realizada a avaliação do uso desse sorvente. Para verificar se o uso do C18 se destacava na remoção de coextrativos interferentes e principalmente pigmentos, testou-se esta variação com o método QuEChERS acetato (T12 e T13).

Como já citado, o C18 é conhecido por promover uma limpeza mais efetiva de algumas matrizes, principalmente aquelas com grande quantidade de gordura, pois remove com eficiência interferentes apolares (CABRERA *et al.*, 2012). Em relação aos níveis de recuperação, o T12 (QuEChERS acetato com uso de C18 na etapa de limpeza), recuperou um composto a mais que o T1 (QuEChERS acetato sem o uso

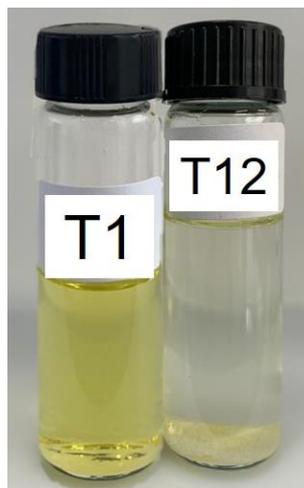
de C18 na etapa de limpeza), conforme a Figura 10, não sendo tão vantajosa esta aplicação, já que aumenta o custo e a quantidade de sorventes na análise. A Figura 11 apresenta os resultados do teste utilizando d-SPE com a adição do sorvente C18, para a limpeza do extrato obtido através da extração com o método QuEChERS acetato.

Figura 10 - Níveis de recuperações satisfatórias (70-120%) para os T1 e T12



Fonte: o autor, 2022. Legenda: T1= QuEChERS acetato; T12= QuEChERS acetato com C18.

Figura 11 - Aspecto dos extratos obtidos utilizando QuEChERS acetato com e sem a adição de C18



Fonte: o autor, 2022. Legenda: T1= QuEChERS acetato; T12= QuEChERS acetato com C18.

Visualmente, é possível verificar uma grande mudança na coloração, comprovando que o C18 atuou fortemente na remoção de pigmentos. Com relação ao teste gravimétrico (T13), a utilização desse sorvente removeu uma parte maior de coextrativos não voláteis advindos da matriz, que interferem na análise, conforme

pode ser verificado na comparação com o T7, demonstrada na Figura 12. O T7 (gravimétrico - QuEChERS acetato sem a aplicação de C18 na etapa de limpeza) produziu um teor de coextrativos de 3,33 mg, já o T13 (gravimétrico - QuEChERS acetato com a aplicação de C18 na etapa de limpeza) gerou 0,5 mg de coextrativos não-voláteis. Contudo, mesmo com a aplicação do sorvente C18 na etapa de limpeza, o QuEChERS original continua sendo o método com o menor teor de coextrativos (0,44 mg – T9), e com a maior quantidade de compostos com níveis de recuperação satisfatórios, totalizando 82 de 98 compostos (T3), sendo a técnica mais adequada, por isso, este foi o método escolhido para ser validado.

Figura 12 - Aspecto visual dos testes gravimétricos para QuEChERS acetato com e sem o uso de C18



Fonte: o autor, 2022. Legenda: T7= gravimétrico - QuEChERS acetato sem a aplicação de C18 na etapa de limpeza; T13= gravimétrico - QuEChERS acetato com a aplicação de C18 na etapa de limpeza.

4.2.4 Avaliação de diluições dos extratos da etapa de extração e o efeito matriz relacionado

Após o método QuEChERS original com etapa de limpeza por d-SPE utilizando $MgSO_4$ e PSA ser demonstrado como a melhor técnica para determinar resíduos de agrotóxicos em caqui, visto que retém menor teor de coextrativos interferentes e apresenta níveis de recuperação para uma maior quantidade dos compostos em estudo, optou-se por fazer testes de diluições (T14, T15 e T16).

É preciso considerar algumas desvantagens da etapa de limpeza do extrato, como o custo elevado de sorventes como o PSA e a possível ocorrência da retenção

de alguns analitos de interesse por estes sorventes, interferindo o resultado da análise (CABRERA *et al.*, 2012). Ainda, é preciso avaliar o tempo que a etapa de limpeza por d-SPE leva para ser executada e a possibilidade desta etapa ser mais uma fonte de erros durante a análise. Por isso, a possibilidade de um método sem a etapa de limpeza, com apenas a diluição do extrato obtido após a partição foi proposto e avaliado, visando um preparo de amostra mais rápido e com um menor custo.

É sabido que o efeito matriz pode ser reduzido pela diluição do extrato da amostra, contudo, estudos sobre como as diluições influenciam na diminuição deste efeito ainda são raros na literatura (GUO *et al.*, 2019). Uma análise com a diluição do extrato substituindo a etapa de limpeza, que produza resultados com compostos que não apresentam efeito matriz, ou seja, um percentual entre - 20% e + 20% (variação próxima dos valores de repetitividade) pode ser amplamente utilizada em métodos de rotina para a determinação de agrotóxicos.

Com isso, o extrato sem a etapa de limpeza, obtido pela extração da amostra “branco” de caqui, com o método QuEChERS original, foi testado com diferentes diluições de 10, 20, 40, 50 e 100 vezes em água ultrapura. Estes extratos foram injetados no equipamento, fortificados em quatro níveis (2, 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$), além de soluções analíticas com as mesmas fortificações nos quatro níveis, preparadas no solvente.

Para a avaliação do efeito matriz do extrato de caqui foram comparadas as áreas obtidas com as soluções analíticas preparadas no solvente (acetonitrila) com as soluções analíticas preparadas no extrato da matriz e a Equação 5 foi utilizada para a obtenção da porcentagem do efeito matriz (STRINGHINI, 2020). Para esse percentual é preciso considerar que valores entre -50 e -20% ou +20 e +50% demonstram um efeito matriz médio e valores abaixo de -50% e acima de +50% indicam um efeito matriz alto (FERRER *et al.*, 2011).

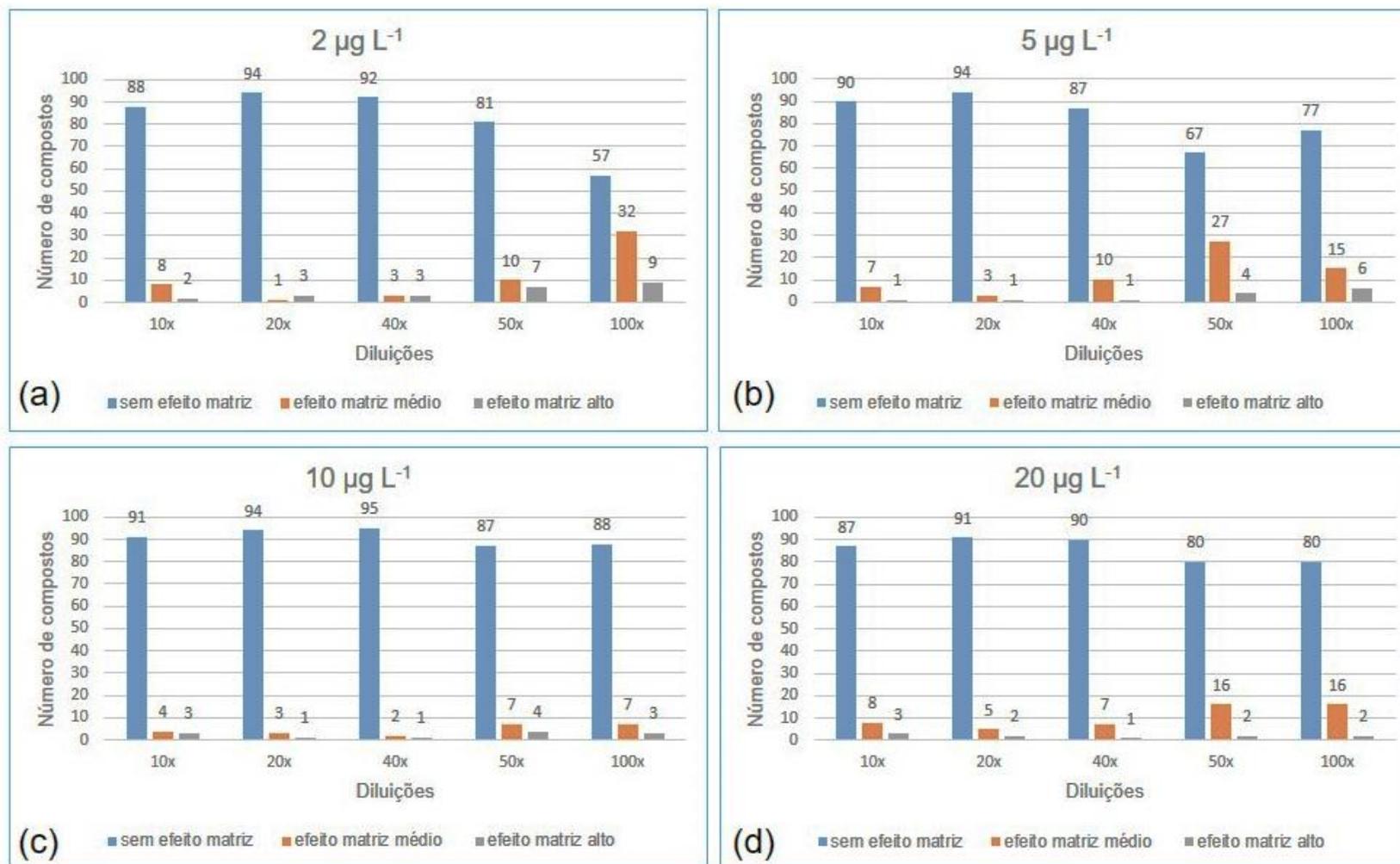
A Figura 13, de (a) a (d), demonstra os resultados dos testes de diluições. Como é possível observar, dos 98 compostos estudados, o maior número de compostos distribuídos na faixa de -20% a +20% foi obtido através das diluições de 20 vezes dos extratos, nas concentrações de 2, 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, como pode-se verificar através da média dos resultados:

- Diluição de 10 vezes: 89 compostos;
- Diluição de 20 vezes: 93 compostos;
- Diluição de 40 vezes: 91 compostos;

- Diluição de 50 vezes: 79 compostos;
- Diluição de 100 vezes: 76 compostos.

Com isso, a diluição de 20 vezes foi definida como a ideal para a etapa de preparo de amostra.

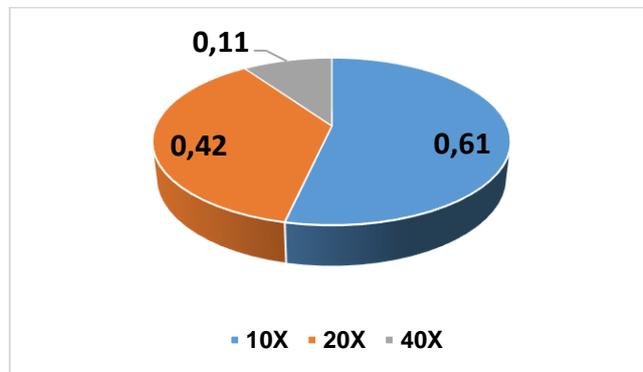
Figura 13 – Número de compostos obtidos com os testes de diluições de 10, 20, 40, 50 e 100 vezes sem efeito matriz, com efeito de matriz médio e alto para as concentrações de 2 (a), 5 (b), 10 (c) e 20 (d) $\mu\text{g L}^{-1}$



Fonte: o autor, 2022. Legenda: sem efeito matriz (-20% a +20%), com efeito matriz médio (-50 e -20% ou +20 e +50%), com efeito matriz alto (abaixo de -50% e acima de +50%).

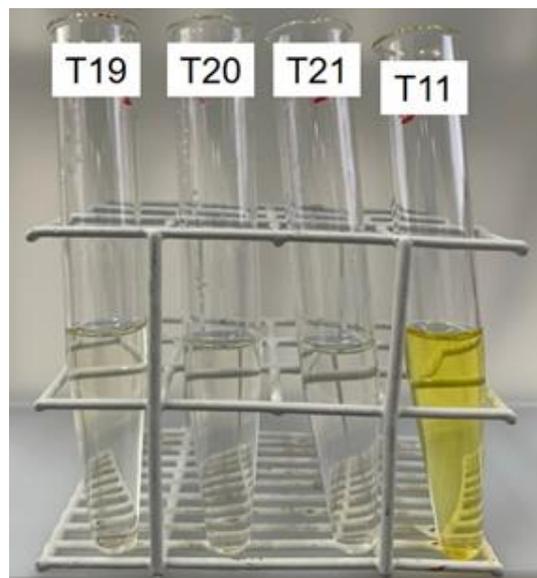
Além disso, foram feitos testes gravimétricos (T19, T20 e T21) com os extratos obtidos nos testes T14, T15, T16 (QuEChERS original sem a etapa de limpeza, com diluições de 10, 20 e 40 vezes) para verificar a quantidade de coextrativos não voláteis e se este teor é menor que o obtido no T11 (gravimétrico utilizando o extrato obtido por QuEChERS original com a etapa de limpeza) – 0,44 mg. Com isso, foi possível confirmar que o teor de coextrativos da matriz realmente diminuiu com as diluições, conforme a Figura 14, e ainda, foi possível verificar a mudança de coloração dos extratos, com as diluições, conforme a Figura 15.

Figura 14 - Teor de coextrativos, em mg, para as diluições de 10, 20 e 40 vezes.



Fonte: o autor, 2022.

Figura 15 - Mudança no aspecto visual das colorações dos extratos conforme as diluições.



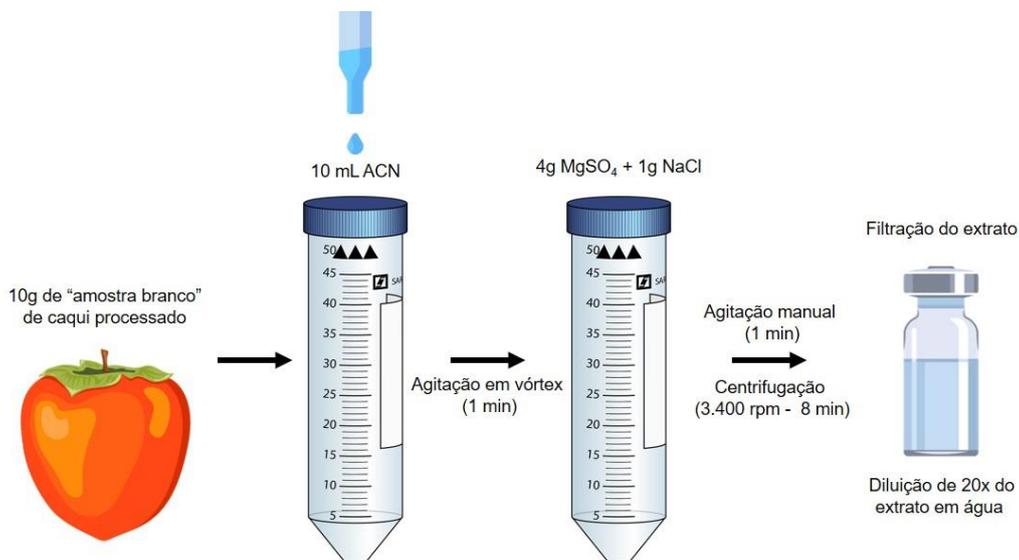
Fonte: o autor, 2022. Legenda: T19= gravimétrico 10x diluído; T20= gravimétrico 20x diluído; T21= gravimétrico 40 vezes diluído; T11= QuEChERS original com limpeza.

Portanto, com a eficiência, a simplicidade, a rapidez e o baixo custo da técnica de diluição de 20 vezes do extrato obtido após a etapa de partição, em contrapartida à etapa de limpeza do extrato com sorvetes, optou-se por eliminar essa etapa do preparo de amostra. Assim, a partir destes testes o extrato obtido após a partição foi encaminhado diretamente para a filtração e diluição, e após isso injetado no equipamento de UHPLC-MS/MS.

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

A validação do método QuEChERS utilizado neste estudo foi realizada com um processado de caqui, utilizando o sistema UHPLC-MS/MS, nas condições descritas no item 4.1. As soluções analíticas para o preparo da curva e fortificações foram feitas em solvente (acetonitrila). Já no início da validação quatro compostos foram retirados do método (diclofuanida, espinetoram (J), espinetoram (L) e metiocarbe-sulfona), pois não apresentaram valores satisfatórios e presença de picos desde a execução dos testes. A partir disso, pode-se avaliar os parâmetros de validação do método analítico para 94 compostos com base na RDC 166/2017 (BRASIL, 2017). Com a aplicação do método foi possível validar 86 destes 94 compostos através do método demonstrado na Figura 16 e os resultados estão apresentados na Tabela 19.

Figura 16 – Procedimento QuEChERS validado, envolvendo etapas de extração, partição e diluição dos extratos



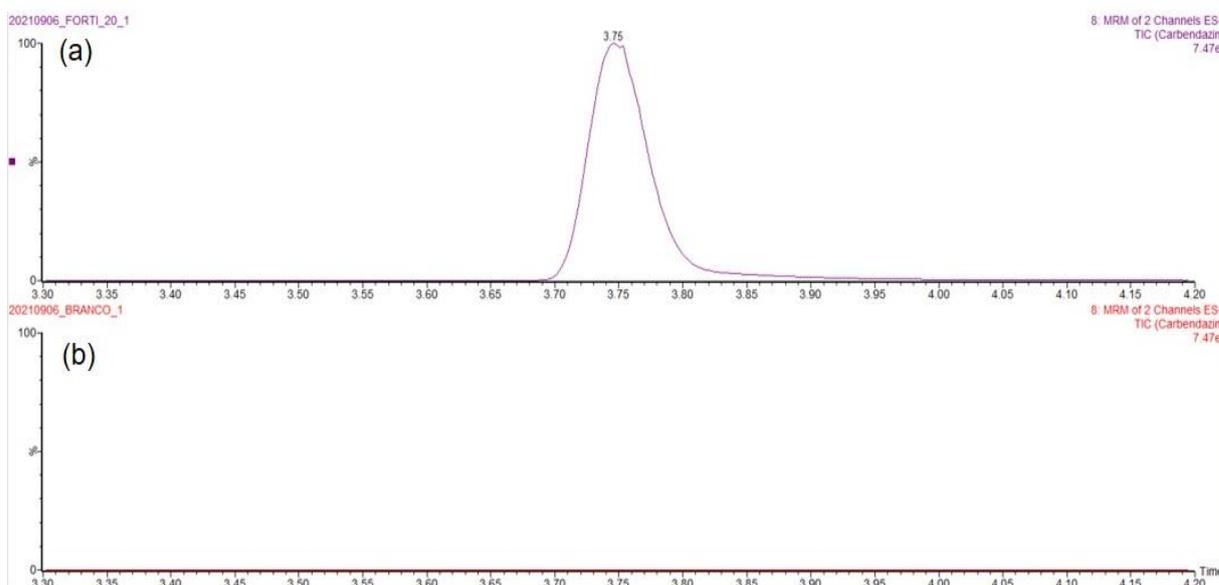
Fonte: o autor, 2022.

4.3.1 Seletividade

O método proposto validado apresentou uma seletividade adequada, visto que foi feita uma comparação entre a amostra “branco” de caqui com uma amostra “branco” fortificada com uma solução padrão de concentração $20 \mu\text{g L}^{-1}$ e não foi verificada a presença de interferentes na amostra “branco” do fruto de caqui.

A Figura 17 apresenta (a) um cromatograma do composto carbendazim, composto escolhido aleatoriamente, em uma e (b) o cromatograma da amostra “branco”, ambos obtidos por UHPLC-MS/MS. É possível verificar que na amostra “branco” de caqui não há interferentes com os mesmos íons de quantificação e identificação, e nos mesmos tempos de retenção dos analitos em estudo, isto comprova a garantia da seletividade do método proposto.

Figura 17 - Cromatogramas representativos para avaliação da seletividade para o composto (a) carbendazim (solução padrão de $20 \mu\text{g L}^{-1}$), preparada na amostra “branco” de caqui e (b) extrato branco da matriz caqui.



Fonte: o autor, 2022.

4.3.2 Linearidade e faixa de trabalho

A linearidade e a faixa de trabalho do método proposto foram avaliadas, o critério para essa avaliação foi o coeficiente de determinação (r^2), obtido através da

regressão linear dos pontos da curva analítica, que foi preparada com o extrato da amostra “branco” de caqui. A faixa da curva analítica foi com oito pontos, em concentrações de 0,25; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($n=5$), preparadas em solvente (acetonitrila). Conforme demonstrado na Tabela 19, 90 dos 94 compostos analisados para a validação neste estudo apresentaram um $r^2 \geq 0,99$. Etofenpróxi, ciantraniliprole, piridato e piridabem não obtiveram um coeficiente de determinação satisfatório, não sendo possível validar a determinação destes compostos. Além disso, a faixa de trabalho ficou entre 0,25 a 25 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.3.3 Sensibilidade

A sensibilidade do método validado foi avaliada através da inclinação da curva analítica (b), obtida através da equação da reta. Segundo o INMETRO, o método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em uma maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação (INMETRO, 2020). O método avaliado apresentou uma boa sensibilidade, principalmente pela alta eficiência do sistema UHPLC-MS/MS.

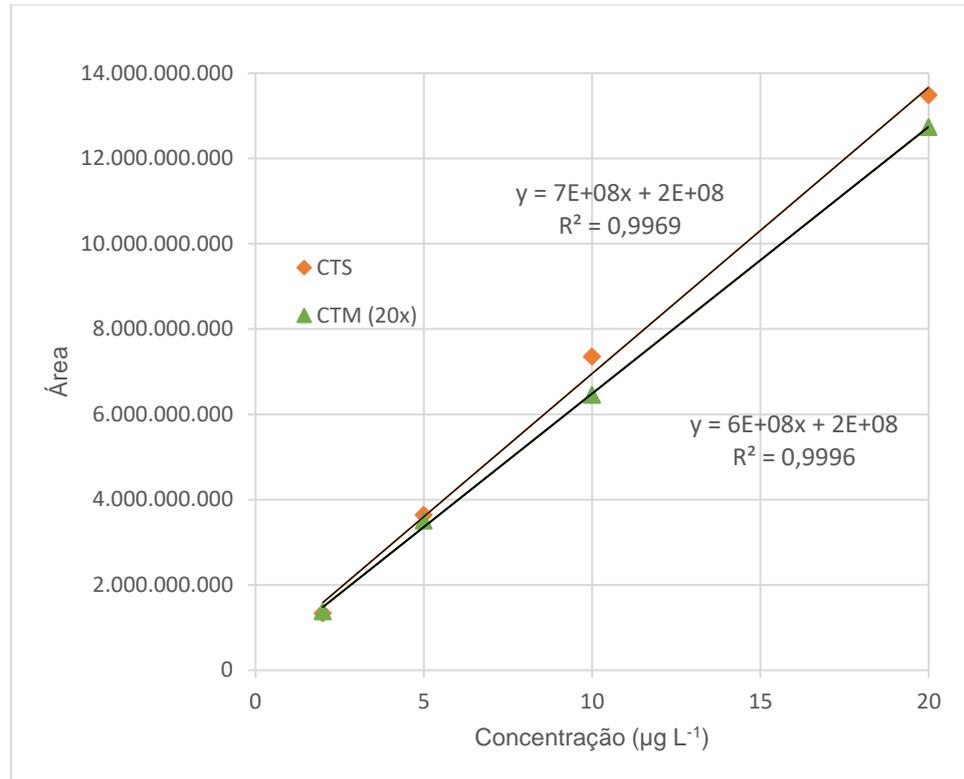
4.3.4 Efeito matriz

Para a avaliação do efeito matriz (EM, %) comparou-se as inclinações das curvas de calibração obtidas no solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz (caqui), conforme os testes realizados no item 4.2.5. Como pode ser verificado na Figura 18 e como esperado em análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série, no extrato da matriz a resposta é menor, o que é confirmado pela inclinação mais baixa da CTM, no gráfico. Ainda, como já demonstrado na Figura 13, observa-se que cerca de 93, dos 94 agrotóxicos (aproximadamente 99%), apresentaram efeito matriz de $\pm 20\%$, que é considerado um efeito matriz baixo, apenas o ciantraniliprole não obteve efeito matriz baixo para pelo menos 3 dos 5 níveis de fortificação, evidenciando que o método de preparo de amostra demonstrou-se muito efetivo.

A partir destes resultados foi possível preparar as curvas analíticas para a validação no solvente (CTS), o que é extremamente vantajoso, pois proporciona um menor uso de reagentes e um menor tempo de preparo de amostra, com isso, a

identificação e quantificação dos analitos foi realizada utilizando CTS (n= 5). Os valores de efeito matriz estão apresentados no item 4.2.5.

Figura 18 – Gráfico representativo do efeito matriz ao comparar as curvas de trabalho em solvente (acetonitrila - CTS) e na matriz (caqui - CTM), para o composto atrazina, com diluição de 20 vezes.



Fonte: o autor, 2022.

4.3.5 Limite de detecção e de quantificação

Os limites de quantificação e de detecção do método foram obtidos de acordo com a Tabela 17. O limite de quantificação (LOQ) foi considerado como sendo o menor nível de fortificação (µg kg⁻¹), com sinal/ruído >10, no qual a precisão e a exatidão dos compostos de interesse encontraram-se dentro dos níveis aceitáveis de recuperação e desvio padrão relativo (70 a 120%; RSD ≤ 20%) (SANTE, 2019). A variação do LOQ foi de 10 a 40 µg kg⁻¹, o cálculo deste limite leva em consideração o fator de diluição do método validado, sendo um fator de 20 vezes. Já o limite de detecção (LOD) foi calculado a partir da divisão do valor de LOQ por 3,33. A variação do LOD foi de 3 a 12 µg kg⁻¹. Os valores de LOD e LOQ estão apresentados na Tabela 19. Para os

compostos que possuem valores de LMRs estabelecidos para a cultura de caqui (ANVISA, 2020), os valores de LOQ obtidos na validação do método proposto estão abaixo dos LMRs estabelecidos pela ANVISA e UE.

4.3.6 Exatidão e precisão

A exatidão e precisão do método foram avaliadas através dos valores de recuperação e de desvio padrão relativo recomendados pela legislação internacional (SANTE, 2019) (valores entre 70 e 120% e $RSD \leq 20\%$, respectivamente), conforme a Tabela 17, utilizando diferentes fortificações em cinco níveis finais (0,5, 1, 2, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$; $n = 7$). Para o método ser aceito em termos de exatidão e precisão, os resultados precisam estar entre os critérios recomendados pela legislação. Os valores destes parâmetros estão apresentados na Tabela 19.

Inicialmente, a exatidão do método proposto foi avaliada considerando a recuperação dos compostos em estudo nos níveis de fortificação acima citados, para o cálculo da recuperação ainda foi utilizada a curva analítica, preparada em solvente. Para a avaliação da precisão (repetitividade) do método foram realizados os ensaios de recuperação nos mesmos níveis de fortificação, com base nas 7 replicatas, considerando os resultados que atenderam aos parâmetros estabelecidos, de $RSD \leq 20\%$. Ainda, foi avaliada a precisão intermediária, onde o mesmo teste de validação foi repetido pelo mesmo analista, nas mesmas condições, com o mesmo equipamento e no mesmo local, porém em dias diferentes, em um intervalo de 7 dias em relação ao primeiro teste.

Em relação aos níveis de recuperação, cerca de 35 dos 94 agrotóxicos em estudo apresentaram valores de recuperações adequados ao critério estabelecido no nível de fortificação mais baixo, de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, 72 agrotóxicos apresentaram recuperações adequadas no nível de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, 90 agrotóxicos para recuperaram adequadamente para o nível de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$, 88 agrotóxicos para o nível de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 89 agrotóxicos para o nível mais alto, de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Já os valores de RSD estão dentro do critério estabelecido, em pelo menos três níveis, para os 94 agrotóxicos. É possível observar que, com o aumento da concentração da fortificação, aumentaram o número de compostos com recuperações e RSD dentro da faixa aceitável, apenas o nível 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ não seguiu essa lógica, contudo, suspeita-se que pode ter ocorrido algum pequeno erro durante a execução do método.

Os inseticidas ciantraniliprol e etofenpróxi, o herbicida clopiralida, os fungicidas organofosforados pirazofós e triclofon, o acaricida e inseticida piridabem e o herbicida piridato não apresentaram recuperações satisfatórias (entre 70 e 120%) em nenhum nível, ou em pelo menos três níveis, com isso estes compostos não puderam ser validados. Isso pode ser explicado pois alguns compostos são bastante sensíveis ao pH. O composto clopiralida apresentou recuperações satisfatórias com o preparo de amostra utilizando o T2 (QuEChERS citrato), ainda, todos os outros compostos apresentaram recuperações satisfatórias com o T1 (QuEChERS acetato), o que sugere que esses compostos necessitem de um ajuste de pH das versões destes métodos para serem estáveis.

Além disso, o etofenpróxi possui elevada lipofilicidade, motivo pelo qual o composto pode sofrer interações com os sorventes ou com compostos da matriz, diminuindo suas recuperações (MAY, 2016). Já os agrotóxicos organofosforados possuem características polares, e a utilização de $MgSO_4$ favorece a extração de principalmente compostos apolares (PRESTES *et al.*, 2009), o que também pode se revelar como uma suspeita para os valores de recuperação inadequados.

Já nos resultados de precisão intermediária foram obtidos valores de recuperação e de desvio padrão relativo recomendados pela legislação internacional para os mesmos compostos, com exceção do fungicida procloraz, que não obteve pelo menos três níveis de recuperação satisfatórios.

Para os compostos com uso registrado no país para caqui, apenas os inseticidas etofenpróxi e espinetoram não puderam ser determinados no presente trabalho. Estes compostos possuem características que dificultam a quantificação. Contudo, os resultados obtidos revelaram que a exatidão e a precisão do método estão adequadas e atendem aos parâmetros. Ainda, com a utilização do padrão de controle atrazina d5, foi possível assegurar que não ocorreram perdas durante a extração. Com isso, 86 dos 94 compostos avaliados apresentaram resultados considerados adequados, de recuperação e de desvio padrão relativo, durante a etapa de validação do método.

Tabela 19 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS desenvolvido no presente trabalho: LOQ, LOD, linearidade (coeficiente de determinação, r^2), exatidão e precisão em termos de repetitividade e precisão intermediária

(continua)

Nº	Agrotóxicos	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	Nível de Repetitividade ($\mu\text{g L}^{-1}$), n=7					Precisão Intermediária ($\mu\text{g L}^{-1}$), n=7				
					Recuperação \pm RSD					Recuperação \pm RSD				
					0,5	1	2	10	20	0,5	1	2	10	20
1	2,4 D	20	6	0,9962	56 \pm 7	71 \pm 9	89 \pm 7	93 \pm 3	83 \pm 8	27 \pm 60	62 \pm 4	84 \pm 7	94 \pm 3	86 \pm 7
2	Acetamiprido	20	6	0,9989	38 \pm 16	71 \pm 4	85 \pm 4	90 \pm 4	81 \pm 6	43 \pm 14	72 \pm 6	86 \pm 4	90 \pm 4	81 \pm 6
3	Atrazina	20	6	0,9992	55 \pm 5	78 \pm 5	89 \pm 3	93 \pm 4	84 \pm 6	57 \pm 7	79 \pm 5	89 \pm 3	92 \pm 4	83 \pm 6
4	Azinfós-etil	20	6	0,9955	54 \pm 13	71 \pm 5	83 \pm 9	91 \pm 7	84 \pm 6	38 \pm 29	72 \pm 3	84 \pm 9	94 \pm 7	87 \pm 6
5	Azinfós-metil	20	6	0,9995	70 \pm 10	79 \pm 6	90 \pm 6	95 \pm 7	86 \pm 7	64 \pm 13	79 \pm 9	88 \pm 6	91 \pm 7	82 \pm 8
6	Azoxistrobina	20	6	0,9984	47 \pm 15	71 \pm 8	87 \pm 6	90 \pm 6	81 \pm 7	37 \pm 24	71 \pm 8	86 \pm 6	90 \pm 5	81 \pm 7
7	Bentazona	10	3	0,9998	89 \pm 8	90 \pm 7	92 \pm 6	88 \pm 6	83 \pm 7	83 \pm 7	91 \pm 6	91 \pm 5	89 \pm 5	82 \pm 7
8	Bitertanol	20	6	0,9999	69 \pm 5	78 \pm 6	88 \pm 3	96 \pm 7	99 \pm 12	74 \pm 7	84 \pm 6	90 \pm 3	97 \pm 7	99 \pm 12
9	Boscalida	10	3	0,9995	74 \pm 8	81 \pm 7	87 \pm 4	84 \pm 4	79 \pm 7	62 \pm 10	76 \pm 8	86 \pm 4	85 \pm 4	80 \pm 7
10	Bromuconazol I	20	6	0,9993	57 \pm 17	73 \pm 10	91 \pm 6	99 \pm 8	70 \pm 8	46 \pm 23	72 \pm 10	92 \pm 6	99 \pm 8	90 \pm 8
11	Bromuconazol II	20	6	0,9990	54 \pm 13	78 \pm 8	89 \pm 7	96 \pm 8	89 \pm 8	43 \pm 29	76 \pm 10	90 \pm 7	98 \pm 8	90 \pm 8
12	Buprofezin	40	12	0,9974	6 \pm 54	56 \pm 5	77 \pm 6	89 \pm 4	80 \pm 6	19 \pm 37	58 \pm 5	79 \pm 6	89 \pm 4	79 \pm 6
13	Carbaril	20	6	0,9992	59 \pm 10	82 \pm 5	96 \pm 3	100 \pm 4	90 \pm 6	72 \pm 8	87 \pm 4	98 \pm 2	99 \pm 4	89 \pm 6
14	Carbendazim	20	6	0,9990	46 \pm 6	72 \pm 3	82 \pm 3	86 \pm 4	78 \pm 6	49 \pm 7	73 \pm 2	80 \pm 9	86 \pm 4	78 \pm 6
15	Carbofurano	20	6	0,9986	43 \pm 10	77 \pm 4	89 \pm 4	90 \pm 3	81 \pm 6	63 \pm 6	83 \pm 2	90 \pm 3	91 \pm 3	81 \pm 6
16	Carbofurano-3-OH	20	6	0,9995	62 \pm 5	81 \pm 2	93 \pm 3	99 \pm 3	89 \pm 5	45 \pm 18	81 \pm 4	94 \pm 3	98 \pm 3	88 \pm 5
17	Carboxina	20	6	0,9990	45 \pm 7	73 \pm 5	85 \pm 3	90 \pm 4	81 \pm 5	47 \pm 10	73 \pm 7	86 \pm 3	90 \pm 4	81 \pm 5
18	Ciantraniliprole	n.d.	n.d.	0,9853	147 \pm 4	97 \pm 12	81 \pm 8	52 \pm 5	52 \pm 6	73 \pm 18	67 \pm 7	66 \pm 4	47 \pm 8	54 \pm 6
19	Cinazina	10	3	0,9998	79 \pm 4	86 \pm 3	89 \pm 3	89 \pm 3	82 \pm 6	79 \pm 5	87 \pm 3	90 \pm 3	90 \pm 3	81 \pm 8
20	Ciprodinil	20	6	0,9998	62 \pm 4	72 \pm 6	84 \pm 5	87 \pm 4	77 \pm 6	71 \pm 6	78 \pm 5	86 \pm 5	86 \pm 4	76 \pm 6
21	Cletodim	10	3	0,9994	71 \pm 9	85 \pm 17	96 \pm 9	97 \pm 10	83 \pm 8	79 \pm 20	94 \pm 14	100 \pm 8	97 \pm 10	82 \pm 7
22	Clomazone	20	6	0,9987	51 \pm 10	77 \pm 5	91 \pm 3	91 \pm 8	76 \pm 11	52 \pm 10	78 \pm 5	91 \pm 3	95 \pm 3	85 \pm 6
23	Clopivalida	n.d.	n.d.	0,9999	70 \pm 6	63 \pm 3	54 \pm 3	48 \pm 3	47 \pm 2	62 \pm 4	53 \pm 4	50 \pm 5	46 \pm 6	47 \pm 2
24	Clorimuron etil	10	3	0,9999	74 \pm 8	79 \pm 6	84 \pm 7	85 \pm 4	80 \pm 7	79 \pm 9	84 \pm 6	86 \pm 6	85 \pm 4	80 \pm 7

Tabela 19 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS desenvolvido no presente trabalho: LOQ, LOD, linearidade (coeficiente de determinação (r^2), exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária)

(continuação)

Nº	Agrotóxicos	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	Nível de Repetitividade ($\mu\text{g L}^{-1}$), n=7					Precisão Intermediária ($\mu\text{g L}^{-1}$), n=7				
					Recuperação \pm RSD					Recuperação \pm RSD				
					0,5	1	2	10	20	0,5	1	2	10	20
25	Clorpirifós	40	12	0,9984	43 \pm 8	69 \pm 4	81 \pm 8	88 \pm 4	83 \pm 7	39 \pm 16	70 \pm 4	81 \pm 8	89 \pm 4	83 \pm 7
26	Clorpirifós-metil	10	3	0,9989	86 \pm 14	91 \pm 14	94 \pm 8	92 \pm 5	82 \pm 6	76 \pm 18	89 \pm 15	93 \pm 8	92 \pm 5	83 \pm 6
27	Diazinona	40	12	0,9989	44 \pm 14	68 \pm 5	80 \pm 5	90 \pm 4	84 \pm 6	49 \pm 15	71 \pm 4	82 \pm 5	89 \pm 4	83 \pm 6
28	Difenoconazol I	10	3	0,9992	86 \pm 23	117 \pm 17	118 \pm 9	120 \pm 7	105 \pm 8	102 \pm 8	120 \pm 17	118 \pm 9	120 \pm 7	103 \pm 8
29	Dimetoato	20	6	0,9989	46 \pm 7	76 \pm 4	89 \pm 3	94 \pm 3	84 \pm 5	50 \pm 6	78 \pm 3	90 \pm 3	93 \pm 3	84 \pm 5
30	Epoconazol	20	6	0,9991	58 \pm 11	71 \pm 9	83 \pm 7	87 \pm 5	82 \pm 7	55 \pm 16	73 \pm 9	85 \pm 7	87 \pm 5	83 \pm 7
31	Espiromesifeno	40	12	0,9902	78 \pm 3	44 \pm 9	92 \pm 10	108 \pm 1	118 \pm 10	61 \pm 9	50 \pm 14	97 \pm 10	116 \pm 13	118 \pm 10
32	Etefon	40	12	0,9939	79 \pm 5	51 \pm 8	82 \pm 4	100 \pm 3	88 \pm 6	76 \pm 6	53 \pm 9	85 \pm 4	100 \pm 3	88 \pm 6
33	Etofenproxi	n.d.	n.d.	0,9874	82 \pm 10	68 \pm 2	119 \pm 11	153 \pm 6	141 \pm 10	75 \pm 13	73 \pm 10	120 \pm 11	147 \pm 7	135 \pm 9
34	Fenarimol	10	3	0,9993	72 \pm 14	78 \pm 9	86 \pm 6	88 \pm 5	82 \pm 6	73 \pm 13	83 \pm 8	87 \pm 6	87 \pm 5	82 \pm 6
35	Fenoxapro-p-etil	20	6	0,9990	68 \pm 9	88 \pm 8	99 \pm 5	104 \pm 5	95 \pm 7	58 \pm 10	84 \pm 9	97 \pm 5	105 \pm 6	96 \pm 7
36	Fenpropatrina	40	12	0,9987	32 \pm 20	68 \pm 5	80 \pm 6	88 \pm 3	81 \pm 6	38 \pm 17	70 \pm 5	81 \pm 6	88 \pm 3	81 \pm 6
37	Fentiona	10	3	0,9994	76 \pm 11	87 \pm 7	91 \pm 4	93 \pm 5	85 \pm 7	72 \pm 12	85 \pm 8	89 \pm 3	95 \pm 5	86 \pm 7
38	Fipronil	40	12	0,9977	19 \pm 52	70 \pm 7	90 \pm 5	93 \pm 5	84 \pm 9	25 \pm 38	71 \pm 6	89 \pm 5	91 \pm 5	81 \pm 9
39	Flupiradifurona	10	3	1,0000	89 \pm 6	88 \pm 5	89 \pm 4	86 \pm 4	79 \pm 6	83 \pm 7	85 \pm 5	88 \pm 4	87 \pm 4	79 \pm 6
40	Fluquinconazol	40	12	0,9966	69 \pm 13	55 \pm 15	77 \pm 8	89 \pm 4	77 \pm 7	64 \pm 15	49 \pm 20	79 \pm 8	90 \pm 4	78 \pm 7
41	Fluroxipir	10	3	0,9999	94 \pm 6	94 \pm 5	92 \pm 4	86 \pm 3	78 \pm 6	90 \pm 4	89 \pm 5	88 \pm 5	84 \pm 3	77 \pm 7
42	Flutolanil	20	6	0,9962	26 \pm 25	71 \pm 7	91 \pm 5	97 \pm 6	86 \pm 6	17 \pm 39	71 \pm 7	89 \pm 5	97 \pm 6	86 \pm 6
43	Imazali	10	3	0,9998	71 \pm 14	71 \pm 5	74 \pm 5	72 \pm 6	71 \pm 10	69 \pm 4	68 \pm 3	72 \pm 6	71 \pm 4	71 \pm 8
44	Imidacloprido	10	3	0,9999	83 \pm 8	89 \pm 5	93 \pm 4	92 \pm 4	84 \pm 6	82 \pm 9	89 \pm 5	93 \pm 4	92 \pm 4	85 \pm 7
45	Iprovalicarbe I	20	6	0,9974	35 \pm 16	71 \pm 6	89 \pm 3	95 \pm 3	84 \pm 5	30 \pm 19	72 \pm 3	89 \pm 3	96 \pm 3	85 \pm 5
46	Iprovalicarbe II	20	6	0,9978	26 \pm 22	71 \pm 6	90 \pm 3	96 \pm 3	86 \pm 5	34 \pm 15	71 \pm 6	90 \pm 3	96 \pm 3	85 \pm 5
47	Linuron	20	6	0,9995	63 \pm 11	79 \pm 6	93 \pm 5	95 \pm 4	87 \pm 6	74 \pm 4	83 \pm 6	94 \pm 5	94 \pm 4	85 \pm 6

Tabela 19 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS desenvolvido no presente trabalho: LOQ, LOD, linearidade (coeficiente de determinação (r^2)), exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária)

(continuação)

Nº	Agrotóxicos	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	Nível de Repetitividade ($\mu\text{g L}^{-1}$), n=7					Precisão Intermediária ($\mu\text{g L}^{-1}$), n=7				
					Recuperação \pm RSD					Recuperação \pm RSD				
					0,5	1	2	10	20	0,5	1	2	10	20
48	Malationa	0	12	0,9974	39 \pm 13	42 \pm 8	71 \pm 7	92 \pm 5	88 \pm 5	44 \pm 11	39 \pm 14	71 \pm 6	91 \pm 5	88 \pm 5
49	Mecarban	20	6	0,9993	32 \pm 25	76 \pm 7	100 \pm 4	110 \pm 4	100 \pm 6	82 \pm 9	99 \pm 5	108 \pm 4	107 \pm 4	97 \pm 6
50	Mepronil	40	12	0,9955	7 \pm 106	66 \pm 6	90 \pm 4	98 \pm 2	86 \pm 5	3 \pm 280	65 \pm 6	89 \pm 4	98 \pm 2	87 \pm 5
51	Metalaxil	20	6	0,9992	63 \pm 9	78 \pm 6	90 \pm 4	94 \pm 5	84 \pm 6	59 \pm 9	77 \pm 6	90 \pm 4	94 \pm 5	84 \pm 6
52	Metamidofós	40	12	0,9990	45 \pm 6	69 \pm 2	76 \pm 2	79 \pm 3	73 \pm 5	41 \pm 7	67 \pm 2	74 \pm 2	79 \pm 3	72 \pm 5
53	Metconazol	10	3	0,9998	78 \pm 10	89 \pm 6	104 \pm 6	114 \pm 10	106 \pm 10	75 \pm 11	88 \pm 6	104 \pm 6	115 \pm 10	107 \pm 10
54	Metsulfuron metil	20	6	1,0000	80 \pm 6	86 \pm 4	87 \pm 4	88 \pm 5	83 \pm 6	85 \pm 5	88 \pm 4	88 \pm 4	89 \pm 4	83 \pm 6
55	Mevinfós I	20	6	0,9998	67 \pm 3	80 \pm 4	87 \pm 3	90 \pm 4	83 \pm 6	72 \pm 4	83 \pm 4	88 \pm 3	90 \pm 4	82 \pm 6
56	Mevinfós II	20	6	0,9998	60 \pm 6	78 \pm 4	85 \pm 3	89 \pm 3	83 \pm 6	69 \pm 3	81 \pm 4	87 \pm 3	89 \pm 3	82 \pm 6
57	Miclobutanil	10	3	0,9999	75 \pm 4	82 \pm 7	88 \pm 6	89 \pm 3	82 \pm 7	84 \pm 7	87 \pm 6	89 \pm 5	89 \pm 3	82 \pm 7
58	Monocrotofós	20	6	0,9991	61 \pm 4	80 \pm 3	87 \pm 3	89 \pm 4	81 \pm 5	54 \pm 5	77 \pm 4	86 \pm 4	90 \pm 4	81 \pm 5
59	Monolinuron	10	3	0,9997	87 \pm 5	92 \pm 4	95 \pm 2	92 \pm 3	84 \pm 6	85 \pm 5	91 \pm 4	95 \pm 2	92 \pm 3	84 \pm 6
60	Oxamil	20	6	0,9995	50 \pm 7	74 \pm 4	87 \pm 4	91 \pm 4	82 \pm 4	65 \pm 5	82 \pm 4	90 \pm 4	91 \pm 4	82 \pm 4
61	Paraoxona etílica	20	6	0,9990	50 \pm 12	73 \pm 6	86 \pm 4	92 \pm 4	84 \pm 6	48 \pm 13	73 \pm 6	87 \pm 4	93 \pm 4	85 \pm 6
62	Pindimetalina	40	12	0,9978	26 \pm 23	65 \pm 6	80 \pm 7	87 \pm 4	79 \pm 6	28 \pm 23	67 \pm 6	82 \pm 7	89 \pm 3	81 \pm 6
63	Piraclostrobina	40	12	0,9972	22 \pm 19	59 \pm 14	78 \pm 10	89 \pm 4	83 \pm 7	17 \pm 32	57 \pm 9	78 \pm 10	89 \pm 4	83 \pm 7
64	Pirazofós	n.d.	n.d.	0,9991	118 \pm 35	153 \pm 33	170 \pm 19	148 \pm 17	120 \pm 7	146 \pm 23	154 \pm 30	158 \pm 19	159 \pm 13	120 \pm 7
65	Piridabem	n.d.	n.d.	0,9754	64 \pm 12	35 \pm 15	120 \pm 11	166 \pm 2	141 \pm 8	62 \pm 12	36 \pm 22	117 \pm 10	162 \pm 3	139 \pm 8
66	Piridafentiona	20	6	0,9995	54 \pm 9	74 \pm 8	87 \pm 4	93 \pm 3	86 \pm 7	68 \pm 7	80 \pm 8	90 \pm 4	92 \pm 3	86 \pm 7
67	Piridato	n.d.	n.d.	0,9593	65 \pm 20	83 \pm 18	183 \pm 10	277 \pm 5	255 \pm 8	88 \pm 14	93 \pm 15	202 \pm 10	267 \pm 5	246 \pm 8
68	Pirimetanil	10	3	0,9999	74 \pm 9	85 \pm 8	89 \pm 4	89 \pm 4	82 \pm 7	80 \pm 9	87 \pm 8	89 \pm 4	88 \pm 4	80 \pm 7
69	Pirimicarbe	20	6	0,9988	61 \pm 11	76 \pm 10	89 \pm 6	91 \pm 3	83 \pm 6	47 \pm 17	71 \pm 10	88 \pm 6	92 \pm 3	84 \pm 6
70	Pirimifós metil	20	6	0,9995	64 \pm 9	79 \pm 3	88 \pm 5	90 \pm 4	82 \pm 7	71 \pm 8	83 \pm 3	89 \pm 5	89 \pm 5	82 \pm 7
71	Piriproxifeno	40	12	0,9944	76 \pm 5	46 \pm 6	79 \pm 6	98 \pm 5	87 \pm 7	73 \pm 14	50 \pm 6	81 \pm 6	99 \pm 4	88 \pm 7

Tabela 19 – Resultados da validação por UHPLC-MS/MS para o método QuEChERS desenvolvido no presente trabalho: LOQ, LOD, linearidade (coeficiente de determinação (r^2)), exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária)

Nº	Agrotóxicos	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	Nível de Repetitividade ($\mu\text{g L}^{-1}$), n=7					Precisão Intermediária ($\mu\text{g L}^{-1}$), n=7				
					Recuperação \pm RSD					Recuperação \pm RSD				
					0,5	1	2	10	20	0,5	1	2	10	20
72	Procloraz	n.d.	n.d.	0,9987	51 \pm 15	68 \pm 10	73 \pm 7	73 \pm 12	72 \pm 1	41 \pm 20	38 \pm 23	67 \pm 4	74 \pm 12	74 \pm 1
73	Profenofós	10	3	0,9984	72 \pm 10	83 \pm 9	87 \pm 3	84 \pm 7	71 \pm 7	36 \pm 20	72 \pm 9	84 \pm 3	88 \pm 7	75 \pm 7
74	Propargito	40	12	0,9911	90 \pm 10	58 \pm 5	98 \pm 7	114 \pm 4	110 \pm 7	80 \pm 11	56 \pm 8	95 \pm 8	118 \pm 6	116 \pm 7
75	Propiconazol	10	3	0,9994	74 \pm 11	85 \pm 9	98 \pm 4	106 \pm 9	97 \pm 9	72 \pm 12	84 \pm 9	99 \pm 4	107 \pm 9	99 \pm 9
76	Propizamida	20	6	0,9985	49 \pm 4	74 \pm 8	89 \pm 4	92 \pm 3	83 \pm 6	40 \pm 13	72 \pm 8	88 \pm 4	93 \pm 3	84 \pm 6
77	Propoxur	20	6	0,9985	46 \pm 9	79 \pm 5	94 \pm 4	98 \pm 3	88 \pm 5	47 \pm 10	81 \pm 5	95 \pm 4	99 \pm 3	89 \pm 5
78	Quincloraque	20	6	0,9999	69 \pm 5	72 \pm 3	74 \pm 4	75 \pm 4	71 \pm 6	67 \pm 5	71 \pm 5	73 \pm 4	74 \pm 4	71 \pm 2
79	Quinoxifeno	40	12	0,9986	35 \pm 14	68 \pm 1	81 \pm 7	89 \pm 6	82 \pm 8	32 \pm 18	64 \pm 8	81 \pm 7	89 \pm 6	83 \pm 8
80	Simazina	20	6	0,9995	65 \pm 6	84 \pm 5	92 \pm 3	94 \pm 4	87 \pm 6	62 \pm 7	82 \pm 5	92 \pm 4	93 \pm 4	86 \pm 6
81	Tebuconazol	10	3	0,9998	73 \pm 9	81 \pm 9	90 \pm 5	90 \pm 3	83 \pm 7	71 \pm 9	80 \pm 9	90 \pm 5	90 \pm 3	83 \pm 7
82	Terbufós	10	3	0,9998	78 \pm 27	81 \pm 11	88 \pm 10	91 \pm 11	79 \pm 9	74 \pm 25	80 \pm 12	89 \pm 10	90 \pm 12	80 \pm 9
83	Terbutilazina	20	6	0,9983	39 \pm 15	71 \pm 5	82 \pm 5	84 \pm 5	77 \pm 6	27 \pm 20	64 \pm 6	79 \pm 5	83 \pm 5	76 \pm 6
84	Tetraconazol	20	6	0,9985	48 \pm 12	81 \pm 10	89 \pm 5	93 \pm 4	84 \pm 6	42 \pm 16	72 \pm 10	88 \pm 5	93 \pm 4	84 \pm 6
85	Tiacloprido	20	6	0,9990	48 \pm 18	74 \pm 3	86 \pm 5	89 \pm 3	83 \pm 7	53 \pm 17	74 \pm 7	87 \pm 5	89 \pm 3	82 \pm 7
86	Tiametoxam	10	3	0,9997	77 \pm 7	92 \pm 4	99 \pm 3	99 \pm 5	89 \pm 6	79 \pm 7	93 \pm 4	99 \pm 3	99 \pm 5	89 \pm 6
87	Tiodicarbe	20	6	0,9996	59 \pm 16	73 \pm 9	83 \pm 6	84 \pm 6	78 \pm 7	55 \pm 17	71 \pm 9	81 \pm 6	83 \pm 6	77 \pm 7
88	Tolclofós-metil	10	3	0,9999	79 \pm 4	85 \pm 7	88 \pm 6	88 \pm 3	81 \pm 5	83 \pm 16	89 \pm 6	90 \pm 4	87 \pm 3	79 \pm 5
89	Triadimefon	10	3	0,9998	81 \pm 8	87 \pm 5	92 \pm 4	91 \pm 3	86 \pm 7	78 \pm 8	85 \pm 5	91 \pm 4	92 \pm 3	86 \pm 6
90	Triadimenol	10	3	0,9999	71 \pm 7	83 \pm 5	91 \pm 3	91 \pm 3	84 \pm 7	87 \pm 7	88 \pm 3	91 \pm 4	87 \pm 5	79 \pm 5
91	Triclorfon	n.d.	n.d.	0,9967	17 \pm 39	100 \pm 4	139 \pm 1	160 \pm 2	148 \pm 6	135 \pm 2	143 \pm 2	147 \pm 1	140 \pm 2	120 \pm 6
92	Trifloxistrobina	40	12	0,9956	96 \pm 8	58 \pm 9	83 \pm 7	99 \pm 4	89 \pm 7	8 \pm 107	60 \pm 8	86 \pm 7	99 \pm 4	88 \pm 7
93	Triflumizol	40	12	0,9984	25 \pm 19	62 \pm 2	77 \pm 7	86 \pm 3	80 \pm 6	32 \pm 20	63 \pm 7	79 \pm 6	86 \pm 3	79 \pm 6
94	Vamidotiona	20	6	0,9996	67 \pm 4	81 \pm 4	87 \pm 3	89 \pm 4	81 \pm 5	65 \pm 4	80 \pm 4	87 \pm 3	89 \pm 4	81 \pm 5

Fonte: o autor, 2022. Legenda: n.d.- não determinado.

4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO EM AMOSTRAS COMERCIAIS

O método validado proposto neste estudo foi aplicado à 15 amostras (A1 a A15) de fruto de caqui, de diferentes variedades, comercializados em mercados e feiras em Santa Maria outros municípios do Estado do Rio Grande do Sul, como Farroupilha, Caxias do Sul, Bento Gonçalves, entre outros. De acordo com a Tabela 20, das 15 amostras avaliadas todas apresentaram resíduos de pelo menos um agrotóxico. Dos 86 agrotóxicos avaliados no presente trabalho, 6 foram quantificados e/ou detectados nas amostras analisadas, são eles: acetamiprido; azoxistrobina; carbendazim; dimetoato; pirimetanil e tebuconazol. O agrotóxico que apareceu com maior frequência, em 14 de 15 amostras, foi o fungicida carbendazim, em concentrações entre 7,57 e 103,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

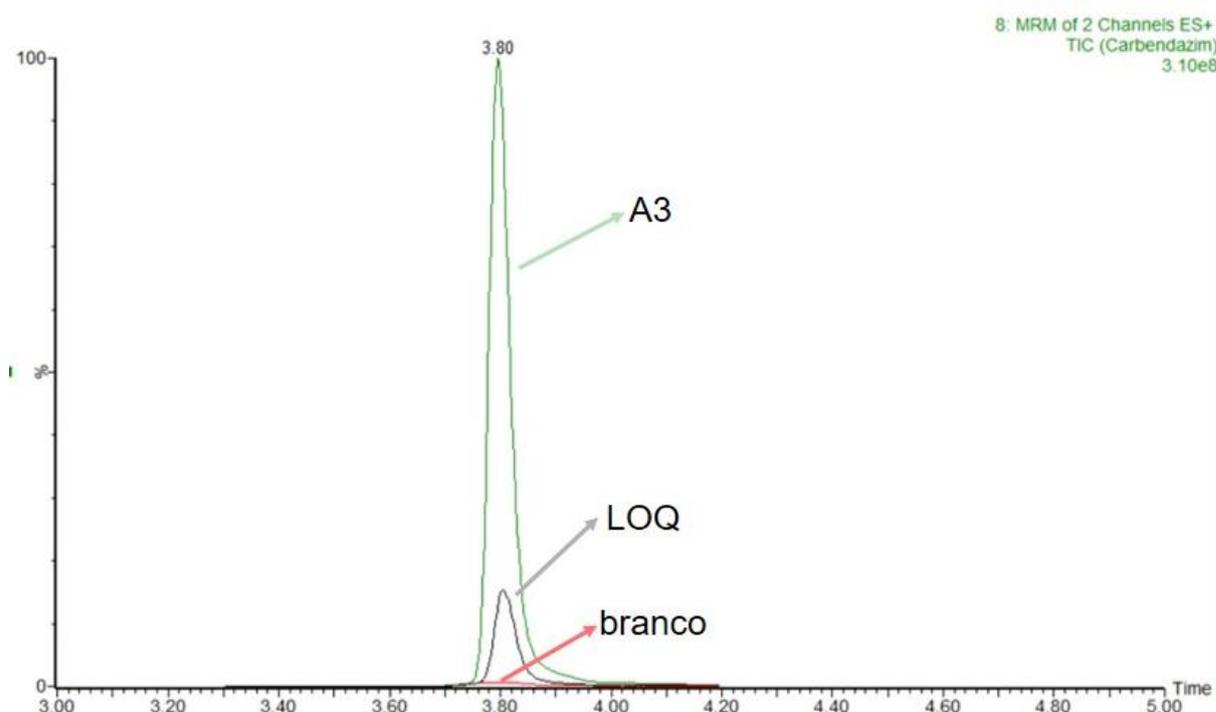
Tabela 20 -Resíduos de agrotóxicos, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, encontrados nas amostras de caqui analisadas através do método validado, utilizando QuEChERS e UHPLC-MS/MS

Resíduos de agrotóxicos ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						
Amostra	Acetamiprido	Azoxistrobina	Carbendazim	Dimetoato	Pirimetanil	Tebuconazol
A1	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
A2	n.d.	n.d.	49,3	n.d.	n.d.	<LOQ
A3	<LOQ	<LOQ	103,6	n.d.	n.d.	<LOQ
A4	n.d.	n.d.	62,7	n.d.	n.d.	<LOQ
A5	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ	n.d.	n.d.
A6	n.d.	n.d.	77,1	n.d.	n.d.	n.d.
A7	n.d.	<LOQ	47,7	n.d.	n.d.	n.d.
A8	n.d.	n.d.	23,1	n.d.	n.d.	<LOQ
A9	n.d.	n.d.	23,9	n.d.	n.d.	n.d.
A10	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	<LOQ
A11	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
A12	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
A13	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
A14	n.d.	n.d.	52,8	n.d.	n.d.	n.d.
A15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	81,9	n.d.
			LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
-	6	6	6	6	3	3
			LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
ANVISA	300	200	-	-	700	200
UE	-	-	-	-	1500	-

Fonte: o autor, 2022. Legenda: n.d.- não detectado.

O carbendazim é um fungicida sistêmico e não tem registro para ser utilizado na produção de caqui no Brasil. Ainda, esse agrotóxico não possui LMR definido na ANVISA e na UE. Entretanto, o carbendazim é um produto de degradação do também fungicida tiofanato metílico (ALBARNAZ, 2021), o que pode sugerir que exista também a aplicação deste composto na cultura de caqui, contudo, esse agrotóxico não foi analisado no presente trabalho. Ainda, o carbendazim é um agrotóxico que está fortemente associado a doenças de pele, doenças cancerígenas, problemas no fígado, infertilidade, malformações fetais e distúrbios hormonais (MPF, 2013). Em relação a relatórios do PARA, não existe nenhuma análise no fruto de caqui, inclusive para carbendazim. Ademais, este agrotóxico teve seu uso proibido nos Estados Unidos da América, e os resultados obtidos nas amostras de caqui revelam altas concentrações. A Figura 19 apresenta os picos cromatográficos do carbendazim na amostra A3 sobreposto ao seu LOQ (20 µg kg⁻¹) e a amostra branco.

Figura 19 – Cromatograma positivo para o fungicida carbendazim da amostra A3, sobreposto ao seu LOQ e amostra branco de caqui.



Fonte: o autor, 2022.

Além do carbendazim, foi encontrado o inseticida acetamiprido na amostra A3, e o fungicida azoxistrobina nas amostras A3 e A7. Ambos em concentrações menores

que o LOQ. Esses compostos tem seu uso registrado para a cultura de caqui no Brasil e possuem LMR estabelecido pela ANVISA de 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para acetamiprido e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para azoxistrobina.

O tebuconazol é um fungicida de aplicação foliar e foi o segundo composto mais encontrado, em 5 de 15 amostras de caqui analisadas (A2, A3, A4, A8 e A10). Contudo, em todas as amostras a concentração foi menor que o LOQ. Esse composto é autorizado para caqui pela ANVISA, com um LMR de 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, porém não possui o limite definido pela UE.

Na amostra A5 foi encontrado o inseticida dimetoato que não possui uso autorizado no Brasil para caqui e não possui LMR determinado pela UE. O agrotóxico foi encontrado em níveis menores que o LOQ. Ainda, vale ressaltar que a UE vetou o uso deste composto e para atender a essa organização, em 2019 o comitê da Lista de Produção Integrada de Citros proibiu o uso deste composto na produção brasileira de frutas cítricas para indústria de suco e exportação in natura (FUNDECITRUS, 2019).

O pirimetanil foi encontrado na amostra A15 em uma concentração de 81,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Esse composto não está registrado para uso na cultura de caqui no país com LMR de 700 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Na EU o LMR é 1500 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Portanto a concentração encontrada está abaixo dos limites da legislação. O pirimetanil é outro fungicida de aplicação foliar.

Das amostras analisadas a mais contaminada foi a A3, de caqui Taubaté, em que foram encontrados quatro agrotóxicos (acetamiprido, azoxistrobina, carbendazim e tebuconazol), sendo carbendazim o agrotóxico em maior concentração na amostra, se comparada com as demais.

Cabe destacar que nenhuma amostra possuía o selo de alimento orgânico. Ainda, os resultados do presente trabalho estão de acordo com outros estudos publicado para a determinação de agrotóxicos em caqui. Anwar, Ahmad e Tahir (2011) encontraram resíduos de dimetoato em caqui (42 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Shim e colaboradores (2007) determinaram pirimetanil em amostras de caqui em níveis de 440, 480 e 530 $\mu\text{g kg}^{-1}$ após aplicações do agrotóxico. Min e colaboradores (2011) encontraram resíduos de carbendazim (22 a 38 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e tebuconazol (2, 31 e 29 $\mu\text{g kg}^{-1}$) em seis amostras de caqui. Carbendazim foi encontrado em dez amostras de caqui por Ciscato, Gerbara e Monteiro, em 2009. Jardim e colaboradores (2014) encontraram resíduos de dimetoato em caqui.

5 CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento do presente trabalho foi possível o estabelecimento de um método baseado no preparo de amostra por QuEChERS sem a necessidade da etapa de limpeza do extrato para determinar uma ampla gama de agrotóxicos em caqui utilizando UHPLC-MS/MS. Com os resultados obtidos foi possível concluir que as modificações realizadas durante o desenvolvimento do método foram extremamente positivas, tornando a análise mais rápida, garantindo resultados confiáveis e atingindo os objetivos propostos neste estudo.

Na validação do método QuEChERS foi possível substituir a etapa de limpeza do extrato pela diluição do mesmo em água ultrapura. Essa proposta é muito vantajosa visto que torna a etapa de preparo de amostra mais simples e rápida, não demanda sorventes, tornando o método ainda mais barato e diminui possíveis fontes de erro. O extrato analisado após a diluição de 20 vezes apresenta menor quantidade de coextrativos, o que é essencial para manter o sistema UHPLC-MS/MS em boas condições. Ainda, a diluição com um fator alto aumenta a eficiência de ionização da fonte ESI e influencia na recuperação dos analitos. Outro fato positivo foi a análise do efeito matriz relacionado, que possibilitou o uso de uma curva analítica preparada em solvente, proporcionando inúmeras vantagens e diminuindo ainda mais o tempo e custo da análise pois evita a necessidade de preparo da curva analítica em matriz branco, muito comum para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

As condições do sistema UHPLC-MS/MS foram otimizadas, proporcionando a separação e determinação dos analitos de interesse com seletividade e detectabilidade. O método desenvolvido foi validado de acordo com o guia de validação SANTE (2019), avaliando parâmetros de seletividade, linearidade, sensibilidade, efeito matriz, exatidão e precisão. Com isso, resultados satisfatórios para todos esses quesitos foram obtidos, sendo possível validar 86 de 94 compostos estudados, selecionados com base na utilização e em legislações. O método proporcionou valores adequados de LOQ (10 a 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e LOD (3 a 12 $\mu\text{g kg}^{-1}$), estando estes valores de acordo para observar o atendimento aos LMRs estabelecidos pelos órgãos de controle. A recuperação obtida na validação do método foi de 70 a 120% e o RSD foi $\leq 20\%$.

O método proposto foi eficiente para analisar amostras comerciais de caqui e foram encontrados resíduos de agrotóxicos em todas as 15 amostras analisadas. Para

os compostos que possuem LMR estabelecido, os resultados estão de acordo com a legislação. O agrotóxico que se destacou foi o carbendazim, sendo encontrado em 14 das 15 amostras avaliadas. A ausência de valores de LMR para esse e outros compostos presentes nas amostras de caqui revelam a necessidade de avaliações e monitoramento de resíduos para essa cultura.

Desta forma, concluiu-se que o método proposto, empregando QuEChERS original modificado e quantificação UHPLC-MS/MS, é eficaz para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em caqui, podendo ser amplamente utilizado em análises de rotina.

6 DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos gerados durante a execução do presente trabalho foram separados em sólidos e líquido e identificados. Em seguida tais resíduos foram encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. Do almoxarifado os resíduos são encaminhados para uma empresa terceirizada, a qual realiza o tratamento e descarte adequado.

Os resíduos líquidos foram divididos em halogenados e não halogenados e acondicionados em frascos identificados, de acordo com recomendação do departamento. Já os resíduos sólidos foram colocados em sacos plásticos identificados como material contaminado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAFRUTAS (Brasília). Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frutas e Derivados. **Dados estatísticos**. 2021. Disponível em: <https://abrafrutas.org/dados-estatisticos/>. Acesso em: 10 ago. 2021.

AGROFIT. **Consulta aberta**: ministério da agricultura, pecuária e abastecimento - coordenação-geral de agrotóxicos e afins/dfia/sda. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/SDA. 2021. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.>. Acesso em: 01 nov. 2021.

AGUIAR, C. A. S. J. *et al.* Extração em fase sólida de resíduos de agrotóxicos de água superficial, empregando um sorvente de menor retenção. **Química Nova**, v. 6, n. 41, p. 643-647, 2018.

ALBARNAZ, K. S. da. **Desenvolvimento de método multirresíduo para determinação de agrotóxicos em suco de uva integral utilizando método QUECHERS acetato e LC-MS/MS**. 2021. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Química Analítica, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2021.

ANASTASSIADES, M., *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANASTASSIADES, M., *et al.* Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. **Crop protection, public health, environmental safety**, v. 439. Wiley-vch, Weinheim. Germany, 2007.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Marco regulatório**: publicada reclassificação toxicológica de agrotóxicos. Publicada reclassificação toxicológica de agrotóxicos. 2019a. Disponível em: <<http://antigo.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 10 set. 2021.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Ministério da Saúde**: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). 2019b. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>. Acesso em: 15 set. 2021.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Ministério da Saúde**: O Brasil no Codex Alimentarius. 2016. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/alimentos/participacao-em-foruns-internacionais/o-brasil-no-codex-alimentarius>>. Acesso em: 15 set. 2021.

ANWAR, T.; AHMAD, I.; TAHIR, S. Determination of pesticides residues in fruits of Nawbshah district, Sindh, Pakistan. **Pak. J. Bot**, Pakistan, v. 2, n. 43, p. 1133-1139, 2011.

ARRUDA, M. A. Z.; SANTELLI, R. E. Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 638-646, 1997.

BARKER, S. A.; HSIEH, L. C.; SHORT, C. R. Methodology for the analysis of fenbendazole and its metabolites in plasma, urine, feces and tissue homogenates. **Anal. Biochem.** 155, 112-118, 1989.

BARREDA, M. *et al.* Residue Determination of Captan and Folpet in Vegetable Samples by Gas Chromatography/Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 4, p. 1080-1087, 2006.

BASSO, C.; SIQUEIRA, A. C. F.; RICHARDS, N. S. P. dos S. Impactos na saúde humana e no meio ambiente relacionados ao uso de agrotóxicos: uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, [S.L.], v. 10, n. 8, p. 1-14, 15 jul. 2021. Research, Society and Development.

BERRADA, H. *et al.* Exposure assessment of fruits contaminated with pesticide residues from Valencia, 2001–03. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n. 7, p. 674-682, 2006.

BLOOD, R. R. Y.; ROZWALKA, L. C.; MIO, L. L. M. de. ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO CAUSADA POR *Colletotrichum horii*: incidência em ramos, folhas, flores e frutos em campo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 2, p. 335-345, 2015.

BLUM, J. *et al.* Destanização do caqui “Giombo” com etanol e ethephon. **Ceres**, Ponta Grossa, v. 55, n. 1, p. 54-59, 2008.

BORGES, K.B.; FIGUEIREDO, E.C.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**, Universidade de São Paulo, [S.l.: s.n.], 2015.

BRASIL, 2017. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano de Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pncrcvegetal>>. Acesso em: 16 set. 2021.

BRASIL, 2017. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166 de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 de julho de 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 15 nov. 2021.

BRASIL, 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 05**, de 23 de abril de 2019. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-econtaminantes/InstruoNormativa N05.2019PNCRC2019.pdf/view>>. Acesso em: 15 set. 2021.

BRASIL. Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 11 jul. 1989. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm>. Acesso em: 15 set. 2021.

BUBBA, M. del, *et al.* Changes in tannins, ascorbic acid and sugar content in astringent persimmons during on-tree growth and ripening and in response to different post-harvest treatments. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 7-8, p. 668-677, 2009.

BUTT, M. S., *et al.* Persimmon (*Diospyros kaki*) fruit: hidden phytochemicals and health claims. **Experimental and Clinical Sciences Journal**. ISSN 1611-2156, [S.L.], v. 14, p. 542-561, 2015. IfADo - Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors, Dortmund.

CABRERA, L. da C. *et al.* Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 227-240, 2012.

CALDAS, S. S. *et al.* Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CHANG, H.- R. *et al.* Residue Studies of Difenoconazole and Thiamethoxam during Cultivation of Sweet Persimmon for Export. **Korean Journal Of Environmental Agriculture**, v. 31, n. 3, p. 248-254, 2012.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CIA, P. *et al.* Quitosana no controle pós-colheita da podridão mole em caqui 'rama forte'. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 745-752, 2010.

CIOLA, R. **Fundamentos de Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 1998. 178 p.

CISCATO, C. H. P.; GEBARA, A. B.; MONTEIRO, S. H. Pesticide residue monitoring of Brazilian fruit for export 2006–2007. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v. 2, n. 2, p. 140-145, 2009.

CODEX ALIMENTARIUS. Method validation, joint FAO/WHO food standards programme. **Codex on Methods of Analysis and Sampling**, Budapeste, 2001.

CODEX ALIMENTARIUS. **Pesticides**. 2010. Disponível em: <<https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/themes/pesticides/es/>>. Acesso em: 07 set. 2021.

COLLINS, C. H., et al. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 456 p.

CONSTANTINOU, M.; LOUCA-CHRISTODOULOU, D.; AGAPIOU, A. Method validation for the determination of 314 pesticide residues using tandem MS systems (GC-MS/MS and LC-MS/MS) in raisins: focus on risk exposure assessment and respective processing factors in real samples (a pilot survey). **Food Chemistry**, v. 360, p. 129964, 2021.

CORSATO, C.E.; SCARPARE FILHO, J.A.; VERDIAL, M.F. **Fenologia do caquizeiro “Rama Forte” em clima tropical**. *Bragantia*, Campinas, v.64, n.3, p. 323-329, 2005.

DEGANI, A. L.; CASE, Q. L.; VIERA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21-25, 1998.

DÍAZ, L. D. *et al.* Potential Nutrition and Health Claims in Deastringed Persimmon Fruits (*Diospyros kaki* L.), Variety ‘Rojo Brillante’, PDO’ Ribera del Xúquer’. **Nutrients**, v. 1397, n. 12, p. 1-15, 2020.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). **Pest and Pesticide Management**: - about. 2005. Disponível em: <<https://www.fao.org/pest-and-pesticide-management/about/understanding-the-context/en/>>. Acesso em: 07 set. 2021.

FAOSTAT (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). **Indicators**: commoditys balances. 2018. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/CB>>. Acesso em: 11 ago. 2021.

FAOSTAT (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). **Indicators**: products - persimmons. Products - Persimmons. 2021. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>>. Acesso em: 11 ago. 2021.

FELIPPE, G. **Frutas: sabor à primeira dentada**. São Paulo: Senac, 2004. 302 p.

FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L. *et al.* Field-Incurred Fenitrothion Residues in Kakis: comparison of individual fruits, composite samples, and peeled and cooked fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 860-863, 2004.

FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L. *et al.* Residue levels of captan and trichlorfon in field-treated kaki fruits, individual versus composite samples, and after household processing. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n. 6, p. 591-600, 2006.

FERRER, C. *et al.* Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7634-7639, 2011.

FIORAVANÇO, J. C.; PAIVA, M. C. CULTURA DO CAQUIZEIRO NO BRASIL E NO RIO GRANDE DO SUL: situação, potencialidade e entraves para o seu desenvolvimento. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 37, p. 43-51, abr. 2007
FUNDECITRUS (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA). Araraquara. **Protecitrus**. 2019. Disponível em:<<https://www.fundecitrus.com.br/protecitrus>>. Acesso em: 11 fev. 2022.

GALLI, A. *et al.* Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.

GRIMALT, S. *et al.* Analytical Study of Trichlorfon Residues in Kaki Fruit and Cauliflower Samples by Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1188-1195, 2006.

GUO, J. *et al.* Analysis of multiple pesticide residues in polyphenol-rich agricultural products by UPLC-MS/MS using a modified QuEChERS extraction and dilution method. **Food Chemistry**, v. 274, p. 452-459, 2019.

HORTIFRUTI. Santa Cruz do Sul: **Gazeta**, 2021. Anual. Disponível em: <https://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wpcontent/uploads/2021/04/HORTIFRUTI_2021.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2021.

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). **Agrotóxicos**: Relatórios de comercialização. Brasil, 2019. Disponível em:<<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos#Painel-comercializacao>>. Acesso em: 15 set. 2021.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Produção agropecuária**: produção de caqui. Produção de Caqui. 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/caqui/br>. Acesso em: 15 ago. 2021.

INMETRO. Norma nº DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos. rev. 09. Rio de Janeiro. Jun. 2020.

ITTAH, Y. Sugar content changes in persimmon fruits (*Diospyros kaki* L.) during artificial ripening with CO₂: a possible connection to de astringency mechanisms. **Food Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 25-29, 1993.

JARDIM, A. N. O. *et al.* Pesticide residues in cashew apple, guava, kaki and peach: gc-μecd, gc-fpd and lc-ms/ms multiresidue method validation, analysis and cumulative acute risk assessment. **Food Chemistry**, v. 164, p. 195-204, 2014.

JEONG, D-K. *et al.* Chlorfenapyr Residue in Sweet Persimmon from Farm to Table. **Journal of Food Protection**, v. 82, n. 5, p. 810-814, 2019.

JIAO, W. *et al.* Optimized combination of dilution and refined QuEChERS to overcome matrix effects of six types of tea for determination eight neonicotinoid insecticides by

ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 210, p. 26-34, 2016.

KEMMERICH, M. **Resíduos de agrotóxicos em ameixa, maçã, pera e pêssago: desenvolvimento de métodos de análise e monitoramento**. 2017. 141 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Química Analítica, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

KLUGE, R. A.; TESSMER, M. A. Caqui — Diospyroskaki. **ExoticFruits**, [S.L.], p. 113-119, 2018. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-803138-4.00016-2>>.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry-based techniques: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 6, p. 1663-1683, 2007.

LANÇAS, F.M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27-46, 2009.

LEE, D.-Y. *et al.* Establishment of Pre-Harvest Residue Limit of Fungicides Pyrimethanil and Trifloxystrobin during Cultivation of Persimmon. **Korean Journal of Environmental Agriculture**, v. 31, n. 1, p. 45-51, 2012.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA 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, p. 615-629, 2005.

LIU, Y. *et al.* Pesticides in persimmons, jujubes and soil from China: residue levels, risk assessment and relationship between fruits and soils. **Science of The Total Environment**, v. 542, p. 620-628, 2016.

LOOSE, Roberta Fabricio. **Desenvolvimento de método para determinação multirresíduo de agrotóxicos em ovos empregando método QuEChERS e UHPLC-MS/MS**. 2020. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Química Analítica, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2020.

LOPES, P. R. C. *et al.* Cultivo do Caquizeiro no Vale do São Francisco. **Circular Técnica Online**: Embrapa, Petrolina, v. 107, p. 1-10, 2014.

MAFFEI, D. F.; NOGUEIRA, A. R. de A.; BRONDI, S. H. G. Determinação de resíduos de pesticidas em plasma bovino por cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1713-1716, 2009.

MARTÍNEZ-CALVO, J.; BADENEZ M. L.; LLÁCER, G. **Descripción de variedades de caqui, Diospyros kaki Thunb. del Banco de Germoplasma del IVIA**: agrícola.

28. ed. Espanha: Inia - Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, 2014. 78 p.

MARTINS, M. L. *et al.* Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 29-45, 2012.

MAY, M. M. **Determinação multirresíduo de agrotóxicos em bebidas à base de soja empregando método QuEChERS e UHPLC-MS/MS**. 2017. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Química Analítica, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

MIN, Z. W. *et al.* Development and validation of a quick easy cheap effective rugged and safe-based multi-residues analysis method for persimmon, grape and pear using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal Of The Korean Society For Applied Biological Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 771-777, 2011.

MORAIS, E. H. da C.; BEGNINI, F. R.; JARDIM, I. C. S. F. Técnicas de preparo de amostra empregadas na determinação de agrotóxicos carbamatos em água e solo. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 2, p. 146-162, 2013.

MPF (Ministério Público Federal). **MPF/DF quer suspender registro de agrotóxicos com carbendazim no Brasil**: Processo 0051862-73.2013.4.01.3400. 2013. Disponível em: <http://www.mpf.mp.br/df/@_@search?path=&SearchableText=0051862-73.2013.4.01.3400>. Acesso em: 11 fev. 2022.

MOWAT, A. D.; GEORGE, A. P.; COLLINS, R.J. Cultivation of persimmon (*Diospyros kaki* L.). **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 409, p. 141-149, 1995.

NEUWALD *et al.* PERSIMMON PRODUCTION AND COMMERCIALIZATION IN BRAZIL: an overview. **Acta Horticulturae**, n. 833, p. 51-56, 2009.

OPS (Organização Pan-americana da Saúde). Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. **Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância Sanitária. Brasília: Organização Pan-americana da Saúde/OMS, 1996.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. COMPARISON OF METHODS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDE MULTIRESIDUES IN STRAWBERRIES. **Química Nova**, v. 10, n. 38, p. 1273-1281, 2015.

PARK, K. J. *et al.* Estudo da secagem de caqui 'Giombo' com encolhimento e sem encolhimento. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 6, n. 1, p. 71-86, 2004.

PARVEEN, T. *et al.* Monitoring of multiple pesticide residues in some fruits in Karachi, Pakistan, Pakistan. **Pak. J. Bot**, Pakistan, v. 4, n. 43, p. 1915-1918, 2011.

PELAEZ, V. M. *et al.* A (des)coordenação de políticas para a indústria de agrotóxicos no Brasil. **Revista Brasileira de Inovação**, 14, p. 153-178, 2015.

PERES, F.; MOREIRA, J.C.; DUBOIS, G.S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F.; MOREIRA, J.C.; orgs. **É veneno ou é remédio? agrotóxicos, saúde e ambiente**. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. p. 21-41.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Instituto Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002. Disponível em: <http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/bio/v64_2/peres.pdf>. Acesso em: 29 set. 2021

PEREZ, M. A. F. Validação de métodos analíticos: Como fazer. **Instituto de tecnologia de alimentos**. Cetea: Informativo, v. 22. n. 3, p.1-9, 2010. Disponível em: <https://ital.agricultura.sp.gov.br/arquivos/cetea/informativo/v22n3/v22n3_artigo2.pdf>. Acesso em: 11 out. 2021.

PIGNATI, W. Entenda por que o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo. [Entrevista cedida a] Mariana Lucena. **Galileu**, [s.l.]: Notícias/perigo, dez. 2018. Disponível em: <<http://revistagalileu.globo.com/Revista/Common/0,,ERT150920-17770,00.html>>. Acesso em: 22 set. 2021.

PRESTES, O. D. **Desenvolvimento e validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em arroz polido utilizando método QuEChERS modificado, clean-up dispersivo e GC-MS (NCI-SIM)**. 2007. 117 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 51-64, 2011.

PRESTES, Osmar D. *et al.* QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

REBELO, R. M.; CALDAS, E. D. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1199-1208, 2014.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, 2004. Disponível em: <http://static.sites.s bq.org.br/quimicanova.s bq.org.br/pdf/Vol27No5_771_16-RV03165.pdf>. Acesso em: 15 out. 2021

SANTE, EUROPEAN COMMISSION. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. **Document nº SANTE/12682/2019**. 01 jan. 2020.

SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Review of recent developments and applications in low-pressure (vacuum outlet) gas chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 899, p. 13-22, 2015.

SHIM, J.-H. *et al.* Determination of field-incurred pyrimethanil residues in persimmon (*Diospyros kaki* Linn) by liquid chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 21, n. 12, p. 1279-1283, 2007.

SILVA, E. P.; SOUZA, J. R. de; CALDAS, Eloisa Dutra. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 111-122, 2014.

SILVA, M. C. da *et al.* QUALIDADE PÓS-COLHEITA DE CAQUI 'FUYU' COM UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE COBERTURA COMESTÍVEL. **Ciências e Agrotecnologia**, v. 35, n. 1, p. 144-151, 2011.

SILVA, P.R.; BAPTISTELA, C.S.L.; FRANCISCO, V.L.F.S. **A cultura do caqui e São Paulo**. São Paulo: IEA, 2005.

SKOOG, D. A. *et al.* **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

SOUZA, R.T. In: Uso de equipamentos de proteção individual na pulverização de videiras. EMBRAPA, **Circular Nº 67**. Bento Gonçalves, 2006. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/circular/cir067.pdf>>. Acesso em: 07 set. 2021.

STRINGHINI, F. M. **Determinação multirresíduo de agrotóxicos em tomate, beterraba e cenoura empregando QuEChERS modificado e UHPLC-MS/MS**. 2020. 114 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Química Analítica, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2020.

TECCHIO, M. A.; PEREIRA, R. T.; MOTTA, V. M. de. Pragas e doenças: ameaça ao caquizeiro. **Campo & Negócios**, 24 mai. 2019.

UNICAMP (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS). **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO**. 4. ed. UNICAMP: Campinas, 2011. Disponível em: <https://www.cfn.org.br/wpcontent/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf>. Acesso em: 09 set. 2021.

VIEITES, Rogério Lopes. Caqui. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 3, p. 653-955, 2012.

VINHA, A. F., *et al.* Chemical Composition and Antioxidant Activity of Portuguese Diospyros Kaki Fruit by Geographical Origins. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 2, p. 281-289, 2012.

WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 803-812, 2011.

YONEMORI, K.; SUGIURA, A.; YAMADA, M. Persimmon genetics and breeding. **Plant Breeding Reviews**, v. 19, p. 119-225, 2000.

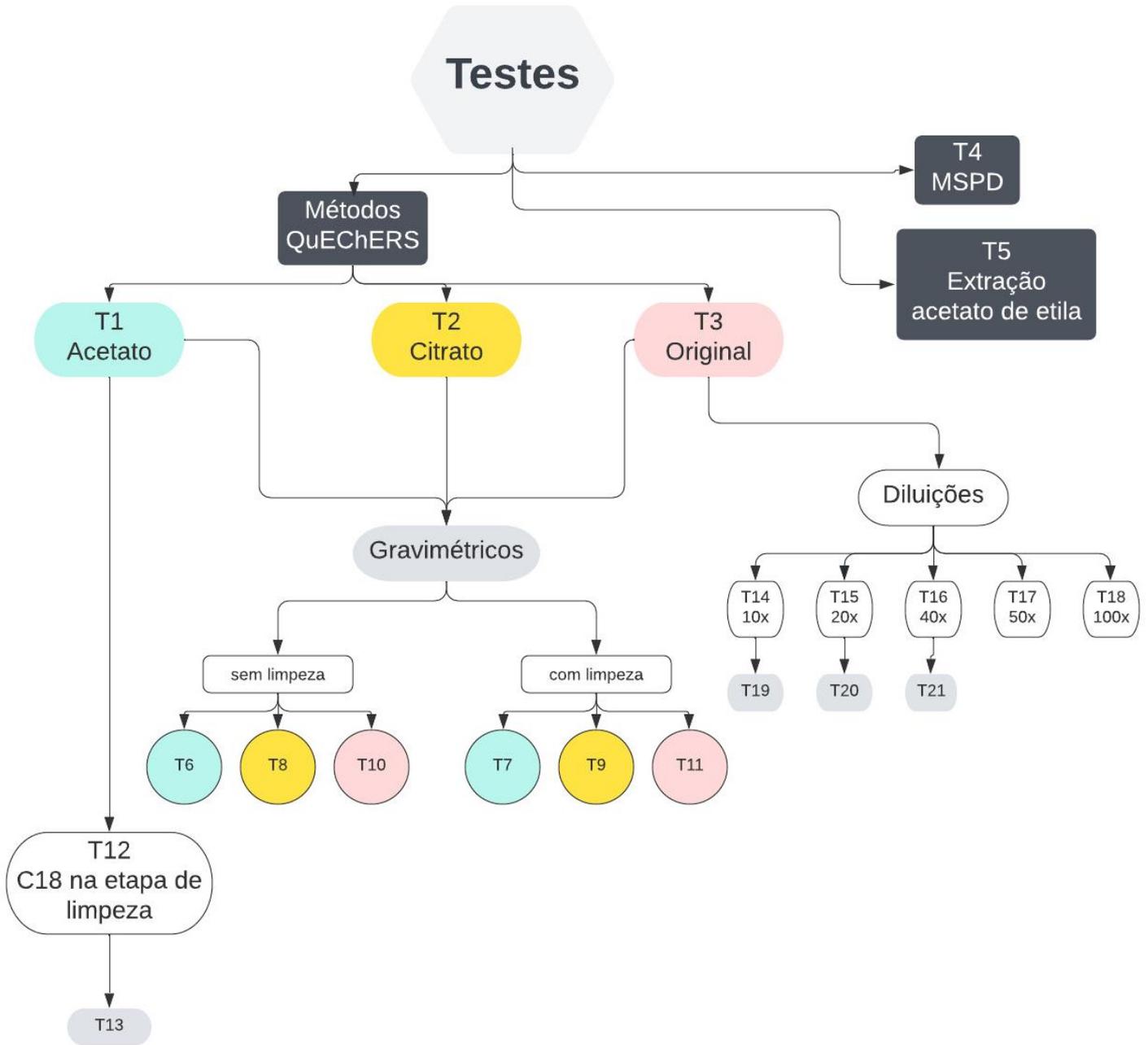
ZANELLA, R.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; MARTINS, M. L. QuEChERS. In: BORGES, K. B. *et al.* **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1. ed. Rio de Janeiro, LTC, 2015. cap. 24.

ZYWITZ, D.; ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM, E. Analysis of Macrocyclic Lactone Insecticides in Fruits and Vegetables using LC-MS/MS. **Chemisches und**

Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, Germany, v. 3, n. 2, 2004a. Disponível em: <http://cvuas.xn--untersuchungsamt-bw-nzb.de/pdf/poster_macrocylic_insecticides_eprw.pdf>. Acesso em: 04 ago. 2021.

ZYWITZ, D.; ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM, E. Analysis of Neonicotinoid Insecticides in Fruits and Vegetables using LC-MS/MS. **Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart**, Germany, v. 3, n. 2, 2004b. Disponível em: <http://www.rfb.it/bastaveleni/documenti/poster_neonicotinoid_insecticides_eprw.pdf>. Acesso em: 04 ago. 2021.

ANEXO A – FLUXOGRAMA CONTENDO TODOS OS TESTES REALIZADOS NA OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA DA PRESENTE PESQUISA



Legenda:

- Acetato
- Citrato
- Original
- Teste gravimétrico