

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

Ricardo Ramos Corrêa Cassól

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVA
EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

Santa Maria, RS.

2019

Ricardo Ramos Corrêa Cassól

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVA EMPREGANDO
MÉTODO QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau **Mestre em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

**Santa Maria, RS
2019**

Cassol, Ricardo Ramos Corrêa
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVA
EMPREGANDO MÉTODO QUECHERS E UHPLC-MS/MS / Ricardo Ramos
Corrêa Cassol.- 2019.
96 p.; 30 cm

Orientador: Osmar Damian Prestes
Coorientador: Renato Zanella
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2019

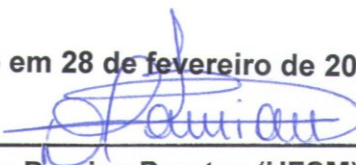
1. preparo de amostra, dilute and shoot, uva, resíduos
de agrotóxicos I. Prestes, Osmar Damian II. Zanella,
Renato III. Título.

Ricardo Ramos Corrêa Cassól

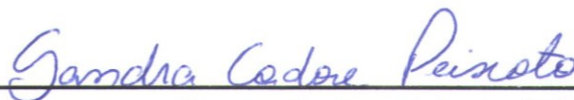
**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVA EMPREGANDO
MÉTODO QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau **Mestre em Química**.

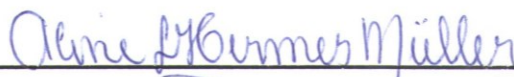
Aprovado em 28 de fevereiro de 2019:



Osmar Damian Prestes (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Sandra Cadore Peixoto (UFN)



Aline Lima Hermes Müller (UFSM)

Santa Maria, RS
2019

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Juarez e Laureana, ao meu irmão Paolo e a minha esposa Josiana que sempre estão ao meu lado, me incentivando para conquistar todos os meus objetivos.

Agradeço a cada um de vocês, porque uma parte dessa conquista também é de vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Osmar Damian Prestes, agradeço pela orientação, auxílio e cobrança. por aceitar esse desafio com comprometimento e com paciência. Agradeço pelos conhecimentos transmitidos e pelo apoio a todo momento no meu crescimento durante este tempo que desenvolvemos o trabalho.

Ao Prof. Renato Zanella, agradeço pela oportunidade e confiança de fazer parte do grupo e me inserir na pesquisa em análises de resíduos de agrotóxicos. Agradeço pelas conversas e conhecimentos transmitidos. Aprendi que sonhos podem ser alcançados e que a dedicação pode nos levar mais alto, você me inspirou com o que tornaste o LARP.

A Profa. Martha Bohrer Adaime, agradeço mais uma vez pela oportunidade e acolhida no grupo de pesquisa. Agradeço pelos conhecimentos transmitidos e pelas boas risadas em sala de aula. É de uma irreverência e instinto materno admiráveis. Seu modo de ver a vida é contagiante.

Aos membros da banca Profa. Sandra Peixoto, Profa. Aline Muller, pelas excelentes contribuições e comentários na banca examinadora da defesa desta dissertação.

A todos os meus colegas do LARP, agradeço a ajuda, o apoio, risadas e conversas na salinha do café. Agradeço a cada um que contribuiu de alguma forma para meu crescimento no laboratório. Ao Dílson, que apesar de ter chegado depois, foi um bom amigo para todos os momentos; agradeço as conversas e apoio em todos os momentos. Agradeço em especial agradeço a convivência da Marisa pelas nossas conversas, risadas e a convivência diária; ao Rômulo pelos inúmeros conhecimentos compartilhados seja em tecnologia ou em química; pela amizade gerada ao longo desse tempo muito obrigado, ao Nelson pelos

inúmeros conhecimentos acadêmicos e pela confiança em sala de aula, mas, principalmente, no apoio com desenvolvimento desse trabalho.

À Profa. Laureana Rosangela Ramos Corrêa Cassól, agradeço pelos anos dedicados a família e por me cuidar pelos momentos que mais precisei, pelas lutas diárias para conquistarmos nossos sonhos, pelos conselhos e por todo amor, pelo carinho, pelas cobranças e por nunca deixar de me dar força e ser minha inspiração como pessoa que desejo me tornar, amo você mãe.

Ao Enf. Juarez Iensen Cassól, pelo esforço e luta para nos dar o melhor sempre, pelos conselhos e cobranças para que hoje eu possa estar conquistando meus objetivos e futuros sonhos. Obrigado por estar sempre comigo.

Ao meu irmão Paolo, por todos esses anos juntos e vivenciados inúmeras experiências e lembranças. Pelas brigas e risadas, por todos os jogos de RPG juntos e pela amizade sincera e apoio inúmeras vezes muito obrigado. Sei que será meu companheiro por toda essa vida e que poderemos contar um com o outro.

À minha amada Josiana Hadlich de Oliveira, por esses anos juntos de muitas histórias e aventuras juntos, pelo amor e cumplicidade criados sobre um forte pilar de confiança. Pelo apoio diário para conquistar meus sonhos, pelo carinho e ternura diários. Agradeço por ser meu alento quando mais precisei e por ser a razão nos momentos de tempestade. Pelos quatro filhotes que adotamos, Joaquim, Pierrot, Olaf e Gandalf. E que muitos anos de boas lembranças possam ser conquistados juntos.

À minha cunhada Gabriela Irigaray, agradeço por todos esses anos de carinho, amizade, por todos os momentos de alegrias, pelas discussões, pelos aprendizados e conversas. Muito obrigado.

Aos professores do programa de pós-graduação em Química pela contribuição na minha formação acadêmica.

A Valéria, funcionária da coordenação do PPGQ pelo excelente trabalho e apoio no que fosse preciso.

Ao Ademir, funcionário da coordenação do PPGQ, agradeço pela amizade, aconselhamentos e apoio a todo o momento que fosse preciso.

Ao CNPq, CAPES, SIBRATEC e RENALI pelo auxílio financeiro e apoio a pesquisa.

EPÍGRAFE

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”
(Arthur Schopenhauer)

“A vida sem ciência é uma espécie de morte.”
(Sócrates)

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVA EMPREGANDO MÉTODO QUECHERS E UHPLC-MS/MS

Autor: Ricardo Ramos Corrêa Cassól

Orientador: Osmar Damian Prestes

Palavras-chave: preparo de amostra, dilute and shoot, uva, resíduos de agrotóxicos

As uvas, classificadas como frutas desempenham importante papel na dieta e nutrição humana. São fontes de vitaminas, polifenóis, aminoácidos essenciais, além de uma vasta gama de benefícios a saúde. As uvas são extremamente ricas em pigmentos, como as antocianinas e as antocianidinas, responsáveis por conferir cor, característica utilizada como parâmetro de maturidade e qualidade. As preferências instintivas e a busca por uma vida mais saudável levam a prática do consumo de alimentos coloridos naturalmente. Embora, assim como muitas outras culturas, as uvas são susceptíveis a ataque de pragas, como fungos e outras doenças, sendo a aplicação de produtos fitossanitários uma prática comum na agricultura para contornar este problema e aumentar a produtividade. Assim, é necessário monitorar os produtos destinados ao consumo, os quais possam oferecer riscos para a saúde humana, resultantes da exposição dietética crônica. No entanto, a matriz da amostra contém abundantes quantidades de antocianinas, exigindo uma etapa preliminar de preparo de amostras capaz de fornecer extratos limpos e recuperações adequadas dos compostos de interesse. Este trabalho teve como objetivo principal otimizar a etapa de limpeza do preparo de amostras, através do uso de diferentes volumes de diluição através da técnica de *dilute and shoot* para a remoção de pigmentos, derivados das diferentes antocianinas presentes em extratos de amostras de uva. Os experimentos foram avaliados por testes gravimétricos, e análise qualitativa pelo sistema cromatográfico GC-MS/MS e por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta/visível (HPLC-UV/Vis). Após a otimização, foi desenvolvido e validado um método multirresíduos para a determinação de 36 agrotóxicos em uvas empregando método QuEChERS citrato modificado e avaliados por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS) o que permitiu a realização das análises com alta seletividade e sensibilidade. A limpeza dos extratos foi realizada pela técnica de *dilute and shoot*, aplicando diferentes diluições do extrato em 2, 5, 10, 20 e 40x sendo este último o método que apresentou melhor eficiência na remoção de coextrativos e recuperações adequadas dos compostos. Os resultados da validação foram satisfatórios com recuperações entre 70 e 120% e RSDs $\leq 20\%$. As curvas foram preparadas no extrato da matriz, devido à presença de efeito matriz acentuado para a maioria dos compostos. Os limites de detecção e quantificação foram de 7 e 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. O método proposto mostrou-se adequado à determinação multirresíduos de agrotóxicos em uvas, bem como, a etapa de diluição dos extratos demonstrou, eficiência, detectabilidade e seletividade satisfatórias ao método e também na aplicação de 20 amostras visto que todos os parâmetros sugeridos para a validação de métodos cromatográficos encontram-se dentro dos limites.

ABSTRACT

DETERMINATION OF PESTICIDES RESIDUES IN GRAPE EMPREGATING QUECHERS AND METHOD UHPLC-MS / MS

Author: Ricardo Ramos Corrêa Cassól
Advisor: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

Keywords: sample preparation, dilute and shoot, grape, pesticide residues

Grapes, classified as fruits play important role in human diet and nutrition. They are sources of vitamins, polyphenols, essential amino acids, and a wide range of health benefits. Grapes are extremely rich in pigments, such as anthocyanins and anthocyanidins, responsible for conferring color, a characteristic used as a parameter of maturity and quality. The instinctive preferences and the search for a healthier life lead to the practice of eating naturally colored foods. Although, like many other crops, grapes are susceptible to pest attack, such as fungi and other diseases, and the application of plant health products is a common practice in agriculture to circumvent this problem and increase productivity. Therefore, it is necessary to monitor the products intended for consumption, which may pose risks to human health, resulting from chronic dietary exposure. However, the sample matrix contains abundant quantities of anthocyanins, requiring a preliminary sample preparation step capable of providing clean extracts and suitable recoveries of the compounds of interest. The main objective of this work was to optimize the cleaning of sample preparation through the use of different dilution volumes through the dilution and shoot technique for the removal of pigments derived from the different anthocyanins present in extracts from grape samples. The experiments were evaluated by gravimetric tests, and qualitative analysis by the GC-MS / MS chromatographic system and by high performance liquid chromatography with ultraviolet / visible detection (HPLC-UV / Vis). After optimization, a multi-residue method was developed and validated for the determination of 36 agrochemicals in grapes using modified QuEChERS citrate method and evaluated by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass-mass spectrometry (UHPLC-MS / MS). allowed the accomplishment of the analyzes with high selectivity and sensitivity. The extracts were cleaned using the dilution and shoot technique, applying different dilutions of the extract in 2, 5, 10, 20 and 40x, the latter being the method that presented better efficiency in the removal of coextractives and adequate recoveries of the compounds. The validation results were satisfactory with recoveries between 70 and 120% and RSDs $\leq 20\%$. The curves were prepared in the matrix extract, due to the presence of a strong matrix effect for most of the compounds. The limits of detection and quantification were 7 and 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. The proposed method proved to be adequate for the determination of multi-residues of pesticides in grapes, as well as, the dilution stage of the extracts demonstrated satisfactory efficiency, detectability and selectivity to the method and also in the application of 20 samples since all the parameters suggested for the validation chromatographic methods are within the limits.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estruturas dos principais flavonóides.....	24
Figura 2- Estrutura do cátion flavílico	25
Figura 3- Estrutura genérica de algumas antocianinas	25
Figura 4- Transformações estruturais de ACYS com mudanças no pH do meio	27
Figura 5- Avaliação visual dos extratos obtidos pelos métodos QuEChERS original, acetato, citrato e citrato acidificado.	67
Figura 6- Comparação entre a quantidade de coextrativos, obtida pelos métodos QuEChERS original, acetato e citrato, após a etapa de secagem do extrato em estufa	67
Figura 7- Cromatogramas obtidos a partir de injeções no sistema GC-MS em modo <i>full scan</i> , do extrato "branco" de uva, sem realização de etapa de limpeza.....	68
Figura 8- Cromatograma da avaliação, por HPLC-UV/Vis, da presença de antocianinas provenientes da extração de amostra "branco" de uva empregando as diferentes versões do método QuEChERS.....	68
Figura 9- Comparação visual entre as diferentes proporções (5, 10, 20 e 40x) de diluição (com água ultrapurificada) do extrato obtido com o método QuEChERS citrato acidificado.	71
Figura 10- Rec (%) e RSD% para os compostos de interesse, após realização das diferentes versões do método QuEChERS (A) original, (B) acetato, (C) citrato e (D) citrato acidificado. Fator de diluição de 20x do extrato e posterior determinação por UHPLC-MS/MS.	72
Figura 11- Rec (%) e RSD% para os compostos de interesse, após realização das diferentes versões do método QuEChERS (A) original, (B) acetato, (C) citrato e (D) citrato acidificado. Fator de diluição de 40x do extrato e posterior determinação por UHPLC-MS/MS.	74
Figura 12- Resultados de precisão intermediária em termos de recuperação e RSD para os níveis de fortificação de 25, 50, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Exportação brasileira de uvas, sucos, vinhos e derivados	23
Tabela 2- Composição centesimal da uva	24
Tabela 3 - Limites Máximos de Resíduos (LMR) de agrotóxicos estabelecidos para uva pela ANVISA, União Europeia e <i>Codex Alimentarius</i>	32
Tabela 4– Diferentes aplicações do método QuEChERS empregadas para a determinação de resíduos e contaminantes em uva por empregando técnicas cromatográficas	38
Tabela 5- Parâmetros normalmente avaliados na etapa de validação de métodos cromatográficos	50
Tabela 6- Relação dos compostos em estudo, com informações de classe de ação, grupo químico e propriedades físico-químicas (pKa, Log Kow e solubilidade)..	55
Tabela 7- Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de agrotóxicos em uva no sistema UHPLC-MS/MS.	53
Tabela 8- Parâmetros utilizados no sistema UHPLC-MS/MS para determinação de resíduos de agrotóxicos em uva.....	56
Tabela 9- Parâmetros avaliados na etapa de validação do método, com respectivas formas de aplicação, equações (quando aplicável) e critérios de aceitação	57
Tabela 10– Tempos de retenção (t_R), íon precursor, íon produto, voltagem cone e energia de colisão para os agrotóxicos avaliados neste estudo, obtidos por UHPLC-MS/MS.	57
Tabela 11- Resultados de linearidade (coeficiente de determinação, r^2) obtidos durante a etapa de validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em uva	76
Tabela 12- Resultados de exatidão e precisão intermediária (recuperação (%)) e RSD (%) obtidos durante a etapa de validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em uva.	65
Tabela 13- Resultados de efeito matriz (%) obtidos durante a etapa de validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em uva.....	79
Tabela 14- Resultados (mg kg^{-1}) obtidos utilizando o método QuEChERS citrato acidificado e UHPLC-MS/MS para amostras de uva positivas para a presença de agrotóxicos.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APCI – ionização química a pressão atmosférica, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*
- APPI – fotoionização a pressão atmosférica, do inglês *atmospheric pressure photoionization*
- CI – ionização química, do inglês *chemical ionization*
- CID – dissociação induzida por colisão, do inglês *collision-induced dissociation*
- CV – coeficiente de variação
- DAD – detector por arranjo de diodos, do inglês *diode array detector*
- DC – corrente direta, do inglês *direct current*
- d. i. – diâmetro interno
- d. p. – diâmetro de partícula
- d-SPE – extração em fase sólida dispersiva, do inglês *dispersive solid phase extraction*
- ECD – detector por captura de elétrons, do inglês *electron capture detector*
- EI – ionização por elétrons, do inglês *electron ionization*
- ESI – ionização por eletronebulização, do inglês *electrospray ionization*
- FD – Detector de Fluorescência, do inglês *fluorescence detector*
- FE – fase estacionária
- FM – fase móvel
- GCB – carvão grafiteado, do inglês *graphitized carbon black*
- GC-MS – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês *gas chromatography coupled to mass spectrometry*
- GC-MS/MS – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em série, do inglês *gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry*
- HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *high performance liquid chromatography*
- IDA – ingestão diária aceitável
- IAs – ingredientes ativos
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LARP – Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas

LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série, do inglês *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*

LD – dose letal

LMR – limite máximo de resíduo

LOD – limite de detecção, do inglês *limit of detection*

LOQ – limite de quantificação, do inglês *limit of quantification* m/z – Razão massa por unidade carga

MAE – extração assistida por micro-ondas, do inglês *microwave assisted extraction*XI

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MS – espectrometria de massas, do inglês *mass spectrometry*

MS/MS – espectrometria de massas em série, do inglês *tandem mass spectrometry*

MSPD – dispersão da matriz em fase sólida, do inglês *matrix solid phase dispersion*

NPD – detector de nitrogênio e fósforo, do inglês *nitrogen phosphorus detector*

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos

pH – potencial hidrogeniônico

PI – padrão interno

PSA – amina primária secundária, do inglês *primary s amine*

QuEChERS – rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês *quick, easy, cheap, rugged and safe*

r² – coeficiente de determinação

RF – rádio frequência

RSD – desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*

RSD_{pi} – desvio padrão relativo para precisão intermediária

RSD_r – desvio padrão relativo para repetitividade

SANTE – Saúde e Proteção do Consumidor, do francês *Santé et protection des consommateurs*

SBSE – extração sortiva em barra de agitação, do inglês *stir-bar sorptive extraction*

SIM – monitoramento do íon selecionado, do inglês *selected ion monitoring*

SPE – extração em fase sólida, do inglês *solid phase extraction*

SRM – monitoramento de reação selecionada, do inglês *selected reaction monitoring*

TIC – cromatograma do íon total, do inglês *total ion chromatogram*

TPP – trifenilfosfato

t_R – tempo de retenção

UE – União Europeia

UHPLC – cromatografia líquida de ultra-alta eficiência, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*

UV – ultravioleta

UV-vis – detecção por absorção molecular na região do ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBJETIVOS	21
1.1.1	Objetivo geral	21
1.1.1.1	Objetivos específicos	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	VITICULTURA NO BRASIL	22
2.2	VITICULTURA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL.....	23
2.3	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA UVA.....	23
2.4	ANTOCIANINAS.....	24
2.4.1	Antocianinas na Uva	27
2.5	AGROTÓXICOS.....	28
2.5.1	Conceitos	28
2.5.2	Classificação	30
2.5.3	Limites máximos de resíduos para agrotóxicos	31
2.6	RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVAS	33
2.7	MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS	34
2.7.1	Método QuEChERS	35
2.7.1.1	Modificações no Método QuEChERS	37
2.8	ETAPAS DE LIMPEZA DO EXTRATO.....	38
2.8.1	Extração em fase sólida dispersiva	39
1.1.1.1	Sorventes	40
2.8.2	Técnica de <i>Dilute and Shoot</i>	41
2.8.3	Presença de coextrativos e efeito matriz nas determinações por LC-MS/MS	42
2.9	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS.....	43
2.9.1	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para determinação de resíduos de agrotóxicos	45
2.9.2	Técnicas analíticas empregadas para determinação de antocianinas em alimentos	48

2.9.3 Validação de métodos analíticos visando à determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	511
3.2 REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS UTILIZADOS	52
3.3 AMOSTRAS BRANCO DE UVA.....	53
3.4 COMPOSTOS SELECIONADOS PARA ESTE ESTUDO	53
3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS.....	53
3.6 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO.....	55
3.7 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVA.....	55
3.8 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVA... ..	57
3.9 AVALIAÇÃO GRAVIMÉTRICA DOS COEXTRATIVOS OBTIDOS APÓS REALIZAÇÃO DA ETAPA EXTRAÇÃO.....	59
3.9.1 Avaliação da presença de coextrativos empregando GC-MS (modo <i>full scan</i>).....	60
3.9.2 Avaliação da presença de coextrativos empregando HPLC-UV/Vis	60
3.9.3 Avaliação da influência do fator de diluição e da eficiência de extração de cada uma das versões do método QuEChERS	61
3.10 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVA POR UHPLC-MS/MS.....	611
3.11 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS.....	63
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
4.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVA.....	65
4.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVA	66

4.2.1 Avaliação gravimétrica dos coextrativos obtidos após realização da etapa extração.....	66
4.2.2 Avaliação da presença de coextrativos empregando GC-MS (modo <i>full scan</i>).....	68
4.2.3 Avaliação da presença de coextrativos empregando HPLC-UV/Vis.....	69
4.2.4 Avaliação da influência do fator de diluição e da eficiência de extração das diferentes versões do método QuEChERS avaliadas.....	70
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVA POR UHPLC-MS/MS.....	75
4.4 SELETIVIDADE.....	75
4.5 FAIXA DE TRABALHO E CURVA ANALÍTICA	75
4.6 EXATIDÃO (RECUPERAÇÃO) E PRECISÃO (REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA).....	76
4.7 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	78
4.8 EFEITO MATRIZ	78
4.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO EM AMOSTRAS REAIS	80
5 CONCLUSÕES	83
6 DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS	85
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	86
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

2 INTRODUÇÃO

No Brasil, a expansão do setor vitícola reflete em ganhos econômicos e sociais para o país. A viticultura ocupa 84.000 hectares (ha), com produção aproximada de 1.300.000 de toneladas, das quais 43,6% são destinadas ao processamento e o restante ao consumo. Dentre os estados produtores, destacam-se o Rio Grande do Sul, com uvas para processamento; São Paulo e Paraná, com produção de uvas finas de mesa, e Pernambuco e Bahia, com produção de uva destinada à exportação (UNIÃO BRASILEIRA DE VITIVINICULTURA - UVIBRA, 2011).

Para FENOLL e colaboradores (2007) devido a elevada produção anual, ocorre um aumento dos riscos de contaminação das uvas com os agrotóxicos que são usados para o controle de pragas em diferentes etapas do cultivo das videiras. O atual sistema de produção de uvas é altamente dependente da aplicação de agrotóxicos. Estes compostos auxiliam no controle de insetos, fungos, bactérias, ervas daninhas, entre outras pragas e, conseqüentemente, estão relacionados aumento da produtividade e da qualidade na colheita. Assim, programas de monitoramento que avaliam a quantidade de resíduos de agrotóxicos em alimentos são necessários. As amostras devem apresentar concentrações de agrotóxicos dentro dos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pela legislação. Níveis de concentração acima dos valores de LMR estabelecidos por órgãos nacionais como a Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA, 2018), ou outros órgãos internacionais como o Codex Alimentarius, indicam a aplicação incorreta dos agrotóxicos.

Nas últimas décadas, os métodos e a instrumentação analítica passaram por grandes avanços tecnológicos. No entanto, o preparo de amostra ainda permanece como uma etapa fundamental para garantir a eficiência do processo analítico. Neste sentido, uma variedade de métodos de preparo de amostra tem sido desenvolvida (BORGES et al., 2015). Segundo Oellig & Schwack (2012), o método de preparo de amostras ideal para a determinação de resíduos e contaminantes deve ser seletivo, eficaz, barato, automatizado quando possível e aplicável a um amplo escopo de compostos e amostras. No entanto, a amostra pode conter quantidades significativas de interferentes e/ ou coextrativos, como por exemplo, açúcares, antocianinas, clorofila, lipídios e outros componentes que podem comprometer o resultado final (WILLKOSKA & BIZUK, 2011). Conseqüentemente, é necessário empregar uma

etapa de limpeza com o objetivo de isolar os analitos de interesse e remover interferentes presentes em matrizes complexas (HOU et al., 2014).

Segundo MANN e colaboradores (2017) entre os muitos métodos existentes para a extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos destacam-se a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) e o método QuEChERS. Este, acrônimo do inglês para *quick, easy, cheap, effective, rugged e safe*, foi proposto por Anastassiades et al. (2003) e tornou-se uma excelente alternativa para determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. Atualmente, o método original e as modificações propostas por Lehotay et al. (2005) e Anastassiades et al. (2007) são um dos métodos mais utilizados para determinação de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais. Estes, foram propostos como alternativa aos métodos tradicionais de análise de resíduos, que apresentavam como características a morosidade de suas diversas etapas, emprego de grandes volumes de solvente e alto custo.

Dentre os métodos de limpeza, a extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid phase extraction*) tem sido um dos métodos mais utilizados para remoção de impurezas. Para amostras de alta complexidade, pode-se utilizar uma mistura de dois ou mais sorventes a fim de se conseguir uma limpeza eficiente de diversos coextrativos sem afetar severamente a recuperação dos analitos. Os sorventes mais utilizados são etilenodiamino-N-propilsilano (PSA, do inglês *primary secondary amine*), o octadecilsilano (C18), o carbono grafitizado (GCB, do inglês *graphitized carbono black*) e, mais recentemente, sorventes à base de dióxido de zircônio (Z-Sep, Z-Sep⁺, Z-Sep/C18), ChloroFiltr®, Florisil®, alumina neutra, grafeno, nanotubos de carbono com paredes múltiplas, quitina, quitosana e terra diatomácea (MANN et al., 2017).

Para a determinação de resíduos de agrotóxicos são empregadas técnicas cromatográficas bem estabelecidas como a cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida (LC) e a cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC) associadas a diferentes tipos de detectores, em especial, aos espectrômetros de massas.

A utilização da UHPLC-MS/MS (do inglês, *ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry*), tem possibilitado análises mais rápidas e com maior seletividade, podendo-se quantificar resíduos em concentrações na ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$ ou $\mu\text{g L}^{-1}$ (MALDANER & JARDIM, 2012; HOU et al., 2014).

Desta maneira, o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos, torna-se ferramenta essencial para garantir a qualidade e segurança dos alimentos,

especialmente, em um momento em que os valores de LMR estão tornando-se cada vez mais restritos na maioria dos países.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivos avaliar, empregar e aplicar as diferentes versões do método QuEChERS (original, acetato, citrato e citrato acidificado) para a determinação multiresíduo de agrotóxicos em uva por UHPLC-MS/MS.

1.2.1.1 Objetivos específicos

- Estudar as melhores condições para a determinação dos resíduos de agrotóxicos por UHPLC-MS/MS;
- Avaliar quatro versões do método QuEChERS (original, acetato, citrato e citrato acidificado) em relação a quantidade de coextrativos extraída da amostra de uva;
- Determinar por análise gravimétrica a quantidade de coextrativos extraída para cada versão do método QuEChERS avaliada;
- Avaliar a utilização das técnicas de GC-MS e HPLC-UV/vis como procedimentos complementares para determinação de coextrativos;
- Avaliar a eficiência de extração e o efeito de diferentes fatores de diluição em cada uma das versões do método QuEChERS avaliada;
- Validar o método desenvolvido;
- Aplicar o método na determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de uva comercializadas na região central do estado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 VITICULTURA NO BRASIL

A cultura da uva foi introduzida no Brasil pelos primeiros imigrantes europeus que iniciaram o cultivo na Região Sul. Nesta região, as terras e o clima se apresentavam características semelhantes a seus países de origem. Mais tarde, com os avanços tecnológicos e desenvolvimento de novos cultivares verificou-se que a viticultura poderia ser realizada em regiões de clima quente como a do Semiárido brasileiro. Na região Nordeste o cultivo de uvas teve início na década de 80 (GIOVANINI, 2014).

A viticultura brasileira ocupa, atualmente, uma área de 84 mil hectares, com vinhedos desde o extremo Sul até regiões próximas à Linha do Equador. Dentre as regiões produtoras, destacam-se: Serra Gaúcha, Campanha, Serra do Sudeste e Campos de Cima da Serra, todas situadas no RS. Além dessas, o Planalto Catarinense, em Santa Catarina, e o Vale do São Francisco, no Nordeste do país (GIOVANINI, 2014).

Da totalidade de uvas cultivadas no país, 88% são comuns (*Vitis labrusca* e *Vitis bourquina*) e/ou híbridas como a uva Niágara rosada (*Vitis labrusca*). Essas variedades são destinadas, principalmente, à elaboração de suco e vinho. A comercialização de suco no mercado interno cresceu mais de 400%, nos últimos 10 anos (UVIBRA, 2011). Em relação a produção de uvas de mesa no Brasil, esta pode ser dividida em dois grandes grupos: um formado pelas uvas finas (*Vitis vinifera*), representado, principalmente, por cultivares como a Itália e suas mutações (Rubi, Benitaka e Brasil) e outro pelas uvas comuns ou rústicas (*Vitis labrusca*), cuja representante principal é a cultivar niágara rosada (LAZZAROTTO, 2013).

Nas últimas duas décadas a produção de uvas para atender a demanda de consumo *in natura* tem crescido a taxas anuais próximas de 13%. Além disso, as exportações deste produto aumentaram em cerca de 26% ao ano. Sendo, Holanda, Estados Unidos e Reino Unido, os maiores importadores de uva de mesa do Brasil. Quanto às importações, o Brasil importa grande quantidade uvas e de mesa e vinhos da Argentina e do Chile (LAZZAROTTO, 2013, MAPA, 2014).

2.2 VITICULTURA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

O Rio Grande do Sul é responsável pela produção, em média, de 777 milhões de quilos de uva por ano, onde são elaborados 330 milhões de litros de vinhos e mostos (sumo de uvas frescas que ainda não tenham passado pelo processo de fermentação). A maior parte da produção nacional de uva é destinada à elaboração de vinhos, cerca de mais de 90% (MAPA, 2014).

A produção de uvas destinada ao processamento (vinho, suco e derivados) vem gerando um aumento na exportação e melhoria na economia e comércio de seus produtos no Brasil e exterior (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2018).

O balanço do setor vitivinícola brasileiro demonstra que as exportações somaram US\$ 109,94 milhões em 2017, 42,11% acima do verificado no ano anterior. As uvas de mesa apresentaram crescimento de 44,4% na quantidade exportada e de 47,43% no valor obtido, nesse mesmo ano. Os vinhos também obtiveram aumento nas exportações, de 61,78% em quantidade e 59,58% em valor (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2018). Na Tabela 1, apresentam-se os dados de quantidades de uvas e produtos derivados nos anos de 2015 a 2017, no setor vitícola.

Tabela 1- Exportação brasileira de uvas, sucos, vinhos e derivados

Exportações	2015	2016	2017
Uvas frescas (ton)	34.385	30.813	44.493
Sucos (ton)	2.610	2.809	2.273
Vinhos (1000 L)	1.254	1.787	2.891
Espumantes (1000 L)	145	174	184

Fonte: Anuário Brasileiro da Fruticultura, 2018; ton: toneladas; L: litros.

2.3 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA UVA

No aspecto nutritivo, a uva é apreciada por seu sabor agradável e peculiar, na Tabela 2 apresenta-se sua composição. Os flavonóides, os taninos e o resveratrol, são substâncias que podem auxiliar a reduzir os riscos de doenças cardíacas, câncer e derrame cerebral. A maioria dos taninos são pigmentos que dão a coloração características das uvas vermelhas e roxas. As uvas contêm, ainda, ácido elágico e ácido málico, que torna o seu sabor “ácido” quando ainda não estão maduras. Por

tudo isso, a uva está associada a alimentos que protegem a saúde, prevenindo e até tratando doenças, entre elas o câncer e os problemas cardiovasculares.

Tabela 2- Composição centesimal da uva

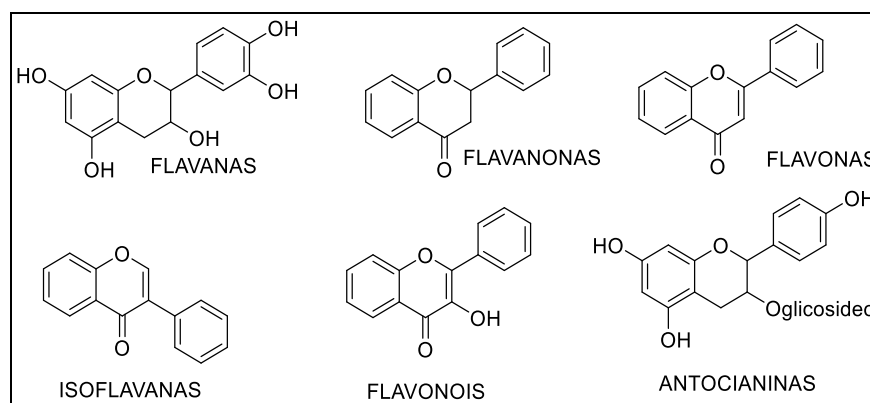
Tipos	Umidade (%)	Energia (Kcal)	Proteína (g)	Lipídeos (g)	Carboidrato (g)	Fibra (g)	Cálcio (g)	Magnésio (g)
Itália	85,0	53	0,7	0,2	13,6	0,9	7	5
Rubi	86,1	49	0,5	0,2	12,7	0,9	8	6
suco	85,1	58	0,1	0,1	14,7	0,2	9	7

Fonte: Taco, 2014; Kcal: quilocalorias; g: gramas; %: porcentagem.

2.4 ANTOCIANINAS

Os pigmentos naturais que são responsáveis pela coloração de flores, frutas e vegetais são chamados de agentes cromóforos e estão inseridos em três importantes classes, as porfirinas, os carotenóides e os flavonóides. Os flavonóides são subdivididos em 11 classes menores, sendo que as mais importantes são: flavanas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonóis e antocianinas (ACYS), ilustradas na Figura 1.

Figura 1- Estruturas dos principais flavonóides

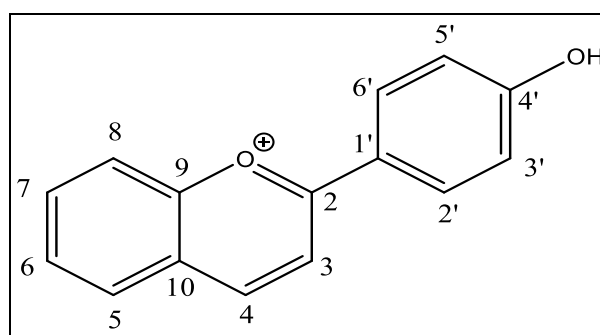


ACYS são importantes flavonóides que apresentam cores visíveis ao olho humano. O termo antocianina (do grego anthos = flores; kianos = azul) foi proposto em 1835 por Marquat, referindo-se a pigmentos azuis, violetas e vermelhos encontrados em flores. Atualmente, sabe-se que estes pigmentos são responsáveis pelas cores: laranja, rosa, vermelha, violeta e azul de flores, frutas e também de folhas. Uma das principais funções das ACYS em flores e frutas é o poder de atrair agentes

polinizadores e dispersores de sementes, além de proteger diversos tecidos da planta de processos oxidativos, durante diversas etapas de seu ciclo de vida, principalmente em fases iniciais do crescimento.

ACYS ocorrem na natureza como glicosídeos de antocianidinas e podem ser aciladas com ácidos orgânicos ou alifáticos como, coumarico, caféico, p-hidroxibenzóico, acético, malônico, succínico, oxálico e ácidos málicos. Sua estrutura geral é derivada do cátion flavílico (Figura 2).

Figura 2- Estrutura do cátion flavílico



Nas ACYS, as posições ocupadas por açúcares, em ordem de preferência, são: 3, 5, 7, 3', 4' e 5'. Quando há apenas uma substituição com glicosídeo, a posição 3 é preferencial. Quando dois açúcares estão presentes, geralmente um está na posição 3 e o outro pode estar em 3 como um dissacarídeo ou nas posições 5, 7, 3', 4' e 5'.

Os diglicosídeos podem ser constituídos de isômeros do mesmo açúcar ou combinações de dois açúcares distintos; o mesmo ocorrendo com triglicosídeos. Quando é comparada a estabilidade das ACYS substituídas com di e/ou triglicosídeos, observa-se que estas são mais estáveis que suas correspondentes monoglicosiladas.

O açúcar presente nas moléculas das ACYS confere maior solubilidade e estabilidade a estas substâncias, quando comparadas às antocianidinas.

Na Figura 3, o grupo R₂ é sempre representado por açúcares, o que caracteriza as ACYS; quando este grupo é um H, trata-se de uma molécula de antocianidina.

Figura 3- Estrutura genérica de algumas antocianinas

Antocianina	Grupo R	Grupo R ₁	Grupo R ₂	Estrutura
Cianidina	OH	H	glicose	
Cianidina	OH	H	galactose	
Cianidina	OH	H	rutinose	
Delfinidina	OH	OH	glicose	
Pelargonidina	H	H	glicose	
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	glicose	

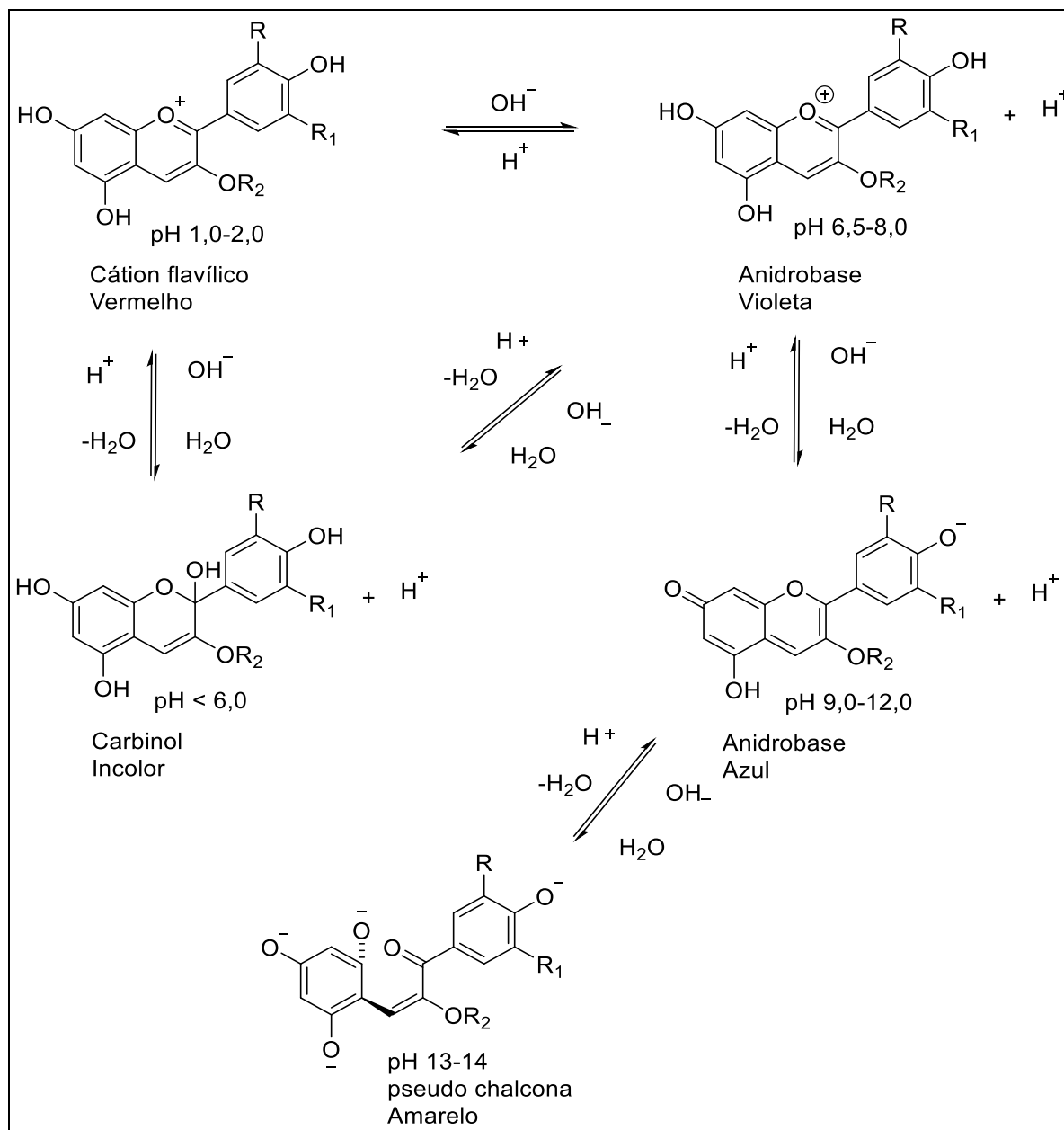
A coloração das soluções de ACYS sofre influência do número de hidroxilas, grupos metoxilas e glicólicos presentes na estrutura. Quanto maior o número de metoxilas, mais intensa é a cor vermelha; enquanto que mais hidroxilas e grupos glicólicos intensificam a cor azul.

No início do século XX, Willstätter e Robinson relacionaram as ACYS como sendo pigmentos responsáveis pela coloração de diversas flores e que seus extratos apresentavam cores que variavam em função do pH do meio em que se encontravam.

A propriedade das ACYS apresentarem diferentes cores, dependendo do pH do meio, faz com que esses pigmentos possam ser utilizados como indicadores naturais de pH. A Figura 4 ilustra as transformações estruturais das ACYS em solução com a mudança de pH do meio.

Variações do pH do meio, por exemplo, causam alterações de cor, com quebra de suas moléculas em meio fortemente alcalino, com a formação de chalconas. Em meio ácido, ACYS são mais estáveis na forma predominante do cátion flavílio. Com o aumento do pH para valores em torno de 6 predomina a anidrobases de cor violeta, e com aumentos sucessivos do pH em torno de 14, ocorre a quebra do anel pirílio (ADAMS, 1973) com a conversão irreversível de ACYS a uma molécula de chalcona de cor amarela.

Figura 4- Transformações estruturais de ACYS com mudanças no pH do meio



2.4.1 Antocianinas na Uva

A quantidade e a composição das antocianinas presentes nas uvas diferem de acordo com a espécie, variedade, maturidade, condições climáticas e cultivar. O conteúdo de antocianinas em uvas tintas varia de 30 a 750 mg para cada 100 g da fruta madura. Em uvas Concord varia entre 61-112 mg 100 g⁻¹, enquanto que uvas viníferas como Pinot Noir, Cabernet Sauvignon e Vincent apresentam concentrações médias de antocianinas de 33, 92 e 439 mg 100 g⁻¹, respectivamente (MAZZA, 1995).

As uvas contêm complexa variedade de antocianinas. VAN BUREN *et al.* (1970) examinaram os pigmentos de 151 variedades de uvas híbridas e encontraram como antocianinas predominantes a malvidina monoglicosídeo e a malvidina diglicosídeo. Segundo RIBÉREAU-GAYON (1982), as principais antocianinas presentes em uvas da espécie *Vitis rotundifolia* (variedade Muscadine) são 3,5-diglicosídeo de malvidina, peonidina, cianidina, petunidina e delphinidina, sendo que as duas últimas perfazem juntas 67% do total de antocianinas.

GOLDY, BALLINGER e MANESS (1986) verificaram a presença de 31 antocianinas diferentes em uvas da espécie *Vitis labrusca* (variedade Concord). Desse total, apenas 12 foram completamente caracterizadas: 3-glicosídeo e 3,5-diglicosídeo de cianidina, 3-glicosídeo e 3,5-diglicosídeo de peonidina, 3-glicosídeo e 3,5-diglicosídeo de delphinidina, 3-glicosídeo e 3,5-diglicosídeo de petunidina, 3-glicosídeo e 3,5-diglicosídeo de malvidina, 3- acetilglicosídeo de malvidina e 3-cumarilglicosídeo de malvidina.

As antocianinas na determinação de resíduos de agrotóxicos podem gerar um efeito matriz (ME) devido sua complexa estrutura química como citado no item 2.4, por ser de origem natural ao fruto podem gerar competição com os agrotóxicos na etapa de extração dos analitos de interesse para esse estudo, isso para análise laboratorial de resíduos é uma das principais fontes de interferência no momento da identificação e quantificação de contaminantes, porque afeta diretamente a reprodutibilidade e precisão do método (AHUMADA *et al.*, 2012).

2.5 AGROTÓXICOS

2.5.1 Conceitos

Segundo a Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, consideram-se agrotóxicos ou afins:

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;

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

Conforme o *Codex Alimentarius*, o termo agrotóxico, refere-se a qualquer substância ou mistura que tenha como objetivo prevenir, eliminar ou controlar qualquer tipo de praga incluindo espécies de plantas ou animais presentes durante a produção, estocagem, transporte, distribuição ou processamento de alimentos ou rações animais. O termo inclui substâncias utilizadas como reguladores de crescimento para plantas, desfolhantes, dessecantes, agentes promotores de amadurecimento de frutos, inibidores de germinação e substâncias que são aplicadas aos grãos antes e depois da colheita para evitar a deterioração do alimento durante o armazenamento e transporte (FAO, 2010).

No Brasil, de acordo com a legislação vigente (Decreto Federal Brasileiro n°. 4.074, de 4 de janeiro de 2002 que regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de Julho de 1989) agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e 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, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento das plantas (BRASIL, 2002).

O uso de agrotóxicos para a proteção de diferentes culturas representou um aumento no volume de produção de alimentos, entretanto o aparecimento de resíduos destes compostos em alimentos é um dos grandes desafios para a atual saúde pública, uma vez que os resíduos permanecem no meio ambiente. Em termos de toxicidade, no Brasil o Ministério da saúde classifica os agrotóxicos de acordo com a dose letal (LD50), ou seja, a dose de uma substância química que provoca a morte de, pelo menos, 50% das espécies estudadas (geralmente, ratos ou camundongos), quando administrada pela mesma via. A LD50 é representada em mg kg^{-1} de massa viva (m.v.). Desta forma, compostos extremamente tóxicos ($\text{LD50} < 5 \text{ mg kg}^{-1}$ de m.v.) são considerados de classe I, os altamente tóxicos ($5 < \text{LD50} < 50 \text{ mg kg}^{-1}$ de m.v.) são os de classe II e os medianamente tóxicos ($50 < \text{LD50} < 500 \text{ mg kg}^{-1}$ de m.v.) classe III. Existem ainda os pouco ou muito pouco tóxicos, ($\text{LD50} > 5000 \text{ mg kg}^{-1}$ de m.v) sendo esses considerados de classe IV (BARBOSA, 2004; ANVISA, 2014). É importante ressaltar que desde o ano de 2008 o Brasil lidera o consumo mundial de agrotóxicos com 300 mil toneladas ao ano de ingredientes ativos (IAs). As razões para

a grande utilização são diversas, mas incluem o fato de o Brasil ser um grande produtor mundial de grãos e também de frutas (CARNEIRO, 2015).

O consumo de agrotóxicos difere nas diversas regiões do país, nas quais se misturam atividades agrícolas intensivas e tradicionais, sendo que estas últimas não incorporam o uso intensivo de defensivos químicos. As regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste são as que mais empregam agrotóxicos, destacando-se os estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, e Mato Grosso do Sul (PIGNATI et al., 2017).

2.5.2 Classificação

Em relação à classificação, os agrotóxicos podem ser agrupados de diferentes maneiras entre elas, quanto ao seu emprego, por exemplo: Inseticidas (para o controle de insetos), Herbicidas (para o controle de ervas daninhas), Fungicidas (para o controle de fungos), acaricidas (para o controle de ácaros), moluscidas (para o controle de moluscos), rodenticidas (para o controle de ratos), entre outros (BAIRD, 2002).

Para estes compostos também podem ser classificados em orgânicos: carbamatos (nitrogenados), clorados, organofosforados e clorofosforados e inorgânicos: compostos que apresentam em sua composição química arsênio, tálio, bário, nitrogênio, fósforo, cádmio, ferro, selênio, chumbo, cobre, mercúrio e zinco. Podem ainda ser botânicos: compostos de nicotina, piretrina, sabadina e rotenona (extraídas do timbó planta tóxica usada por índios brasileiros no preparo de arpões para pegar peixes). Quanto à composição química, os agrotóxicos possuem uma enorme diversidade estrutural, sendo classificados em um mesmo grupo quando apresentam alguma característica em comum, ou seja, quanto à natureza dos elementos químicos presentes e da maneira como estão rearranjados (BAIRD, 2002).

Os agrotóxicos ainda podem ser avaliados devido a sua diversidade estrutural e por suas características físico-químicas únicas de cada espécie. Desta maneira, quando possuem alguma característica e comum são classificados dentro de um grupo, sendo organoclorados, carbamatos, benzoiluréias, sulfoniluréias, triazinas e piretróides, os grupos mais representativos (BARBOSA, 2004).

Ainda podem conter em sua estrutura: halogênios, fósforo, enxofre ou nitrogênio, heteroátomos que possuem uma grande relevância no método de detecção destes compostos. Um grande número de agrotóxicos é muito volátil, outros

não, e está grande diversidade causa sérios problemas no desenvolvimento de um método “universal” para análise de resíduos destas substâncias (PRESTES et al., 2011).

2.5.3 Limites máximos de resíduos para agrotóxicos

Os agrotóxicos, além de protegerem as culturas agrícolas das pragas, doenças e de plantas daninhas, podem oferecer riscos à saúde humana e ao meio ambiente. O uso frequente, e muitas vezes incorreto, de agrotóxicos oferece riscos, tais como, de contaminação dos solos (SOARES et al., 2015), das águas superficiais (DONATO et al., 2015) e subterrâneas (SCHIPPER et al., 2008) e dos alimentos (WHO., 2018), apresentando, riscos a organismos terrestres e aquáticos e de intoxicação humana pelo consumo de água ou alimentos contaminados, assim como o risco de intoxicação ocupacional de trabalhadores e produtores rurais (SPADOTTO et al., 2004).

O processo brasileiro de registro de agrotóxicos envolve entre outros órgãos, o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), responsável pela avaliação do impacto dos agrotóxicos na saúde humana e pelo estabelecimento dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) (ANVISA, 2016).

Os LMR referem-se a valores provenientes de experimentos de campo, exigidos para cada cultura, levando em consideração a Ingestão Diária Aceitável (IDA), que é a quantidade máxima de uma substância, que ingerida diariamente durante toda a vida, não oferece risco apreciável a saúde (FERMAM & ANTUNES, 2009). A fim de acompanhar a situação de resíduos de agrotóxicos em alimentos são estabelecidos os programas de monitoramento. O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) foi iniciado em 2001 pela ANVISA com o objetivo de avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor, fortalecendo a capacidade do Governo em atender a segurança alimentar, evitando assim, possíveis agravos à saúde da população. Mediante os resultados obtidos pelo programa são traçadas estratégias em conjunto com outras instituições, com o objetivo de diminuir os riscos advindos da presença dos resíduos não autorizados ou acima dos limites (ANVISA, 2016).

Na Tabela 3 estão listados os compostos monitorados pelo PARA e seus respectivos limites máximos de resíduos (LMR), estabelecidos pela ANVISA, União Europeia e pelo *Codex Alimentarius* para os compostos de uso permitido para uva.

Tabela 3 - Limites Máximos de Resíduos (LMR) de agrotóxicos estabelecidos para uva pela ANVISA, União Europeia e *Codex Alimentarius*.

Agrotóxicos	LMR (mg kg ⁻¹)		
	ANVISA	UE	CODEX
abamectina	-	0,005	-
ametrina	-	0,02	-
azoxistrobina	2	0,5	-
benalaxil	0,3	0,1	0,3
bifentrina	0,2	0,1	-
boscalida	5	3	-
captana	0,02	2	-
carbendazim	0,5	0,7	-
carbofurano	0,01	1	-
carbosulfano	0,01	1	-
cialotrina-lambda	0,2	0,3	-
cimoxanil	-	0,2	-
ciproconazol	-	0,1	-
clorotalonil	3	5	-
clotianidina	0,7	0,01	0,7
cresoxim-metílico	-	0,5	-
difenoconazol	0,5	0,2	0,1
dimetomorfe	3	2	-
ditiocarbamatos	-	3	-
diurom	0,01	0,1	-
etefom	2	0,1	-
famoxadona	2	0,5	-
fenamidona	0,5	0,2	-
fenarimol	0,3	0,05	0,3
fentiona	0,01	0,5	-
folpete	10	1,5	-
imibenconazol	-	2	-
imidacloprido	-	1	-
indoxacarbe	2	0,02	-
iprodiona	10	1	-
iprovalicarbe	2	0,1	-
metalaxil	1	1	-
metconazol	0,02	1	-
miclobutanil	1	0,5	-
permetrina	0,05	0,05	-
piraclostrobina	0,01	2	-
pirazofós	0,05	0,2	-
pirimetanil	5	5	-
piriproxifem	-	5	-
procimidona	0,01	5	-
simazina	0,01	0,02	-
tebuconazol	1	2	-
tetraconazol	-	0,3	-
tiametoxam	0,9	0,5	-
triadimefom	2	2	-
triadimenol	-	0,1	-
triflumizol	3	0,1	-
zoxamida	5	0,5	-

Fonte: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons

2.6 RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVAS

No Brasil, o monitoramento dos níveis de resíduos de agrotóxicos em alimentos é realizado através de dois programas. O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA), criado em 2001 como uma ação do sistema Nacional de Vigilância Sanitária e coordenado pela ANVISA, e o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), criado em 2006 pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (ANVISA, 2016).

O PARA tem o objetivo de avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos, afim de promover a segurança do alimento e evitar possíveis agravos à saúde da população. Este programa, objetivando reduzir os riscos provenientes da presença dos resíduos não autorizados ou acima dos limites e ainda orientar as cadeias produtivas sobre as inconformidades em seu processo produtivo e incentivar a adoção das (BPA) boas práticas para a agricultura (ANVISA, 2016).

No ano de 2016, o PARA divulgou os resultados do monitoramento realizado entre os anos de 2013 e 2015. Foram analisadas 224 amostras de uva. Destas, 57 amostras foram consideradas satisfatórias, sendo que 11 não apresentaram resíduos dos agrotóxicos pesquisados e 46 apresentaram resíduos em concentrações iguais ou inferiores ao LMR (ANVISA, 2016).

No total, foram detectados 51 agrotóxicos diferentes dentre os 73 pesquisados. Acefato (138 amostras), dimetomorfe (122 amostras) e difenoconazol (115 amostras) foram os que apresentaram maior número de detecções nas amostras analisadas.

Em 20 das amostras analisadas foi detectada a presença de resíduos acima do LMR. Clotianidina, indoxacarbe, difenoconazol, dimetomorfe, ciproconazol, pimimetanil e carbendazim foram os agrotóxicos detectados nessa situação (ANVISA, 2016).

Das amostras analisadas, 161 amostras apresentaram agrotóxicos não autorizados para a cultura de uva. Destas, 58 amostras foram consideradas insatisfatórias exclusivamente por conter resíduos não autorizados em concentrações inferiores a $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$. Dentre os agrotóxicos detectados como não autorizado para a cultura, destacou-se o dimetoato, detectado em 13,8% das amostras analisadas de uva (ANVISA, 2016).

Com relação ao metamidofós, as detecções desse agrotóxico podem estar relacionadas à presença de acefato na amostra, visto que o acefato se converte em

metamidofós. O uso de acefato não é autorizado para a cultura de uva (ANVISA, 2016).

Na literatura encontram-se exemplos que ilustram a presença de resíduos de agrotóxicos em uvas:

Estudos publicados por Bizhang e colaboradores (2017) analisaram amostras de uvas na China onde foram detectados os compostos carbendazim, tebuconazol e tiofanato metílico. Estes podem gerar alteração no sistema endócrino e são considerados com potencial carcinogênico. O limite de detecção (LOD) foi obtido na faixa de $2,1 \times 10^{-5}$ a $8,7 \times 10^{-4}$ mg L⁻¹, e o limite de quantificação foi de 0,1 mg kg⁻¹. Sendo que os resíduos de todos os analitos em uva foram inferiores ao limite máximo de resíduos (LMR) estabelecido pela China (2 mg kg⁻¹ para o tebuconazol; 3 mg kg⁻¹ para o tiofanato-metílico e carbendazim).

Li e colaboradores (2017) determinaram resíduos de agrotóxicos em diferentes tipos de frutas. Nas amostras de uva foram encontrados boscalida, fluopicolida flonicamida, desfluran, dinotefuran, imidacloprido, tiacloprido, azoxistrobina em concentrações de 135 ng g⁻¹, sendo que os limites são de até 5 mg kg⁻¹.

Os resultados dos trabalhos citados evidenciam a ocorrência de resíduos de agrotóxicos em uvas. Assim, destaca-se importância do desenvolvimento de métodos multirresíduo que possibilitem a investigação da presença destes compostos no cultivo de uvas produzidas no Brasil. Devido as baixas concentrações em que os compostos são, muitas vezes encontrados, muito por causa das dissipações no meio ambiente seja por processos naturais como lixiviação, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos com baixos limites de detecção com capacidade para extrair de maneira eficiente os compostos mesmo estando estes, em baixas concentrações (FLAMINI & TRALDI, 2010).

2.7 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

A etapa de preparo de amostra é uma parte essencial durante a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos e bebidas. Este processo destina-se a fornecer um extrato final representativo da amostra e que também seja adequado para as injeções nos sistemas cromatográficos. Além disso, quando possível o método de preparo de amostra deve envolver um número mínimo de etapas fornecendo

resultados significativos de recuperação dos compostos que estão sendo avaliados (ZHANG et al., 2012). A determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos e bebidas apresenta certo grau de dificuldade devido à complexidade da matriz e às baixas concentrações em que estes compostos estão normalmente presentes. Assim, apesar dos avanços no desenvolvimento de instrumentação analítica a etapa de preparo de amostra continua sendo fundamental para a obtenção de resultados quantitativos precisos (REJCZAK & TUZIMSKI, 2015).

Desde o desenvolvimento do primeiro método multirresíduo para extração de agrotóxicos em 1963 (MILLS et al., 1963), várias modificações foram propostas para tornar os métodos mais eficientes para um maior número de compostos. Além disso, os métodos de preparo de amostra passaram a apresentar uma tendência a menor utilização de solventes orgânicos, execução em menor tempo, porém, com sequência analítica adequada (REJCZAK & TUZIMSKI, 2015).

Seguindo essa tendência, durante os anos 90, houve um grande desenvolvimento de métodos alternativos de extração como por exemplo, a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) (Anastassiades et al., 2007). Outros métodos surgidos durante esse período visavam também a simplificação de etapas, como por exemplo, dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *matrix solid phase dispersion*) (BARKER et al., 1989).

Para todas as amostras, foram amostrados e transportados até o laboratório em sacos plásticos até o processamento e análise. O processamento das amostras foi realizado conforme o *Codex Alimentarius* (CODEX, 1999), onde após remoção do cacho, uma porção da fruta é processada. Utilizou-se um processador de alimentos para execução deste procedimento. As amostras processadas foram acondicionadas em frascos de polipropileno de 200 mL sob-refrigeração, em temperatura abaixo de -10 °C, até sua utilização nas análises.

2.7.1 Método QuEChERS

Com o objetivo de superar as limitações práticas dos métodos multiresíduo existentes na época, Anastassiades e colaboradores (2003) introduziram um novo procedimento de preparo de amostra visando a extração de resíduos de agrotóxicos denominado QuEChERS (acrônimo do inglês para *quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*) (Anastassiades et al., 2003). Desde então diversos artigos de

revisão têm sido publicados sobre o método QuEChERS trazendo diferentes abordagens como, a utilização do QuEChERS aliado as técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas (LEHOTAY, 2011), o uso do método QuEChERS para determinação de resíduos de agrotóxicos e outros contaminantes em amostras ambientais (BRUZZONITI *et al.*, 2014) e os avanços recentes do método (REJCZAK & TUZIMSKI, 2015), entre outros. Devido a sua praticidade e aos excelentes resultados obtidos para extração multiresíduo em diferentes matrizes, o método tornou-se o mais utilizado para extração de agrotóxicos em alimentos (BERNARDI, *et al.*, 2017).

O método baseia-se na utilização do solvente acetonitrila, para extração de um amplo escopo de agrotóxicos com diferentes polaridades. Após a extração o procedimento segue com uma etapa de partição onde, a adição de sais promove o efeito *salting out* diminuindo a solubilidade dos analitos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e mutuamente. A utilização de cloreto de sódio (NaCl) foi proposta inicialmente associada a utilização de sais secantes para melhorar a recuperação de agrotóxicos polares. O sulfato de magnésio (MgSO₄) foi escolhido no desenvolvimento do método QuEChERS por apresentar maior capacidade de desidratação quando comparado a outros sais como, por exemplo, Na₂SO₄. Além disso, sua desidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

A terceira etapa do método, consiste na limpeza do extrato através do método de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid phase extraction*) que foi proposto juntamente com o método QuEChERS. Na d-SPE, o extrato é colocado em contato com sorventes com por exemplo, amina primária secundária (PSA, do inglês *primary secondary amine*), octadecilsilano (C18), carvão grafitizado (GCB, do inglês *graphitized carbon black*) e o sal MgSO₄ para remoção da água residual. A utilização dos sorventes tem a função de reter os interferentes da matriz de maneira que, depois das etapas de agitação e centrifugação, o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Existe um amplo número de publicações empregando o método QuEChERS para amostras de uvas. Na Tabela 4 são apresentados alguns exemplos destas publicações usadas como referência para o desenvolvimento deste trabalho.

Tabela 4– Diferentes aplicações do método QuEChERS empregadas para a determinação de resíduos e contaminantes em uva por empregando técnicas cromatográficas.

Extração	Limpeza	Analitos	Técnica	LOQ/LOD	Referência
5 g amostra, 10 mL ACN, 4 g MgSO ₄ , 1g NaCl	1mL extrato, 150 mg PSA, 150 mg MgSO ₄ , 10 mg nanotubos de carbono, 60 mg GCB	2 agrotóxicos	LC - MS/MS	LOQ: 0,2 - 0,7 mg kg ⁻¹	Xiaoxin et al. (2019)
5 g amostra, 10 mL ACN, 4 g MgSO ₄ , 1g NaCl	1 mL extrato, 50 mg PSA 150 mg MgSO ₄ , 3 mg nanotubos de carbono	3 agrotóxicos	LC – MS/MS	LOD: 0,1 mg kg ⁻¹	Bizhang et al. (2018)
5 mL ACN, 5 g amostra, 2 g NaCl, 4g MgSO ₄	1 mL extrato, 150 mg MgSO ₄ , 50 mg de nanotubos de carbono	1 Fungicida	LC-MS/ MS	LOD: 5,0 ng g ⁻¹	Yubo et al. (2017)
água 8 mL, 12 mL acetonitrila, 0,1 mL ácido fórmico 10 g amostra	SPE (2 mL extrato), 5 mL acetona e 5 mL de uma solução 90:9:1 (v/v/v) mistura de tolueno, 10 g/kg ác. fórmico	1 Fungicida	UPLC-MS/MS	LOD: 0,01 mg kg ⁻¹	Yu et al. (2017)
10 g amostra, 20 mL acetonitrila, 2 g MgSO ₄ , 5 g de NaCl	d-SPE (2 mL extrato, 50 mg PSA, 150 mg MgSO ₄)	10 Agrotóxicos	LC - MS/MS	LOD: 0,5- 0,6 µg kg ⁻¹	Tang et al. (2016)
10 mL ACN, 10 g amostra, 4 g MgSO ₄ e 1,7 g CH ₃ COONa	5 mL do extrato, 300 mg MgSO ₄ , 50 mg PSA	Triazinas e triazóis	AP-MALDI HRMS	0,3 a 3,0 ng kg ⁻¹	Mahalle et al. (2017)
10 g amostra 6 g MgSO ₄ 1,5 g de acetato de sódio	2 mL extrat, 150 mg MgSO ₄ , 50 mg PSA	3 Fungicidas	GC-MS/MS	0,6-0,9 ng kg ⁻¹	Buerge <i>et al.</i> (2016)
10 g de amostra, 10 mL de água, 10 mL de acetonitrila	25 mg PSA 125mg MgSO ₄ , 1 g NaCl, 1 g citrato trisodico dihidrato, 0,5 g hidrogeno citrato de sódio sesquihidratado	113 agrotóxicos	GC-MS/MS	0,013-0,021	Cho <i>et al.</i> (2016)

2.7.1.1 Modificações no Método QuEChERS

Ainda que a versão original do método forneça resultados significativos para diferentes tipos de amostras, algumas aplicações mostraram que alguns compostos

apresentavam problemas de estabilidade e/ou recuperação de acordo com o pH da matriz (LEHOTAY e ANASTASSIADES et al., 2005). Notou-se, que a utilização de tampões (pH 5,0) promoviam recuperações satisfatórias (>70%) para compostos dependentes do pH (ex.: pimetrozina, imazalil e tiabendazol). Pensando em resolver esse problema, a adição de uma etapa de tamponamento foi a primeira modificação proposta para o método QuEChERS. Lehotay e colaboradores (2005) desenvolveram, o método “QuEChERS-acetato”, no qual o efeito tamponante (pH 4,8) é promovido pela adição do sal acetato de sódio e de ácido acético à acetonitrila. Mais tarde, Anastassiades e colaboradores (2007) propuseram a segunda modificação, o método “QuEChERS-citrato”, que utiliza uma mistura dos sais citrato de sódio e de citrato de sódio sesquihidratado como responsáveis pelo efeito tamponante (pH 5,0 a 5,5).

Outra modificação muito relevante foi o uso de outros sorventes na etapa de limpeza (*clean-up*) do extrato como por exemplo, C18 juntamente com PSA para promover uma limpeza mais efetiva de algumas matrizes, em especial aquelas que contêm gordura. Para a redução do teor de clorofila nos extratos provenientes de amostras com pigmentação verde, foi efetuado na etapa de limpeza, através da adição de uma pequena quantidade de GCB. Além disso, diferentes sorventes alternativos vem sendo avaliados como é o caso da quitina, quitosana e terra diatomácea (ARIAS et al., 2014; CABRERA et al., 2016).

O método QuEChERS, tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. Além disso, durante o seu desenvolvimento, grande ênfase foi dada para a obtenção de um procedimento dinâmico, que pudesse ser aplicado em qualquer laboratório, sendo, portanto, ideal para a rotina. Com relação as limitações, observa-se que a relação entre a quantidade de amostra: solvente (1:1; m/v) obtida no método QuEChERS é baixa quando comparada com métodos comumente utilizados para análise de resíduos em alimentos, esta relação pode conduzir a valores de LOQ mais elevados (ANASTASSIADES et al., 2007).

2.8 ETAPAS DE LIMPEZA DO EXTRATO

Na análise de resíduos e contaminantes em alimentos, o preparo de amostra envolve a extração dos analitos e a subsequente limpeza do extrato com a finalidade de isolar os compostos de interesse e remover interferentes da matriz que afetam o sistema de análise. Estes procedimentos consistem em transferir os analitos da matriz

para outra fase, empregando simultaneamente uma etapa de limpeza para a remoção de substâncias interferentes (isolamento), aumentando a concentração dos analitos (enriquecimento) a um nível acima do limite de detecção da técnica analítica (CABRERA et al, 2012).

Muitas amostras de alimentos são ricas em pigmentos e ácidos graxos, e como resultado, as interferências da matriz podem estar presentes no extrato final, mesmo após a etapa de limpeza. Em sistemas de GC-MS, o aumento de sinal induzido pela matriz pode afetar a resposta do analito e o desempenho do método. Além disso, os interferentes oriundos da matriz podem ser carregados para a coluna e para o sistema de detecção (HONG et al. 2016).

A extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) é um dos métodos mais utilizados para a limpeza e enriquecimento dos extratos, a qual emprega cartuchos com diferentes quantidades de sorvente. Este método é caracterizado por apresentar menor consumo de solventes orgânicos, ausência de emulsões, facilidade de automação, altas porcentagens de recuperação do analito, capacidade de aumentar seletivamente a concentração do analito e disponibilidade comercial de muitos equipamentos e sorventes para SPE (BORGES et al., 2015). Entretanto, requer grande habilidade do operador, utilização de dispositivos comerciais multivias (manifolds) e sistema de vácuo, além de apresentar diversas etapas, elevado tempo de execução e custo considerável. A precisão do método pode ser afetada por fatores como o ajuste do sistema de vácuo e a vazão dos solventes (BORGES et al., 2015).

2.8.1 Extração em fase sólida dispersiva

Um novo método de limpeza baseado na SPE, denominado extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês, *dispersive solid phase extraction*), foi desenvolvido simultaneamente com o método QuEChERS, onde um volume de extrato é colocado em contato com uma mistura de sorventes com ou sem uso de sais (ANASTASSIDADES et al., 2003).

Na d-SPE uma alíquota do extrato é adicionada a pequena quantidade de sorvente, o qual funciona como filtro químico, retendo coextrativos da matriz. A d-SPE apresenta como vantagens a facilidade e uso de pequenas quantidades de sorventes, quando comparada à SPE convencional, além de permitir a combinação de diferentes

tipos de sorventes, de acordo com a necessidade de remoção de interferentes na matriz. (PRESTES et al., 2011).

Conforme a proposta original, agita-se 1 mililitro do extrato proveniente de amostras de alimentos com 25 mg do sorvente (PSA).

A estrutura bidentada do PSA possibilita a forte retenção de ácidos graxos livres, açúcares e de outros coextrativos polares presentes na matriz. A agitação tem por objetivo a interação uniforme do sorvente com a matriz, facilitando assim o processo de limpeza do extrato. Após uma etapa de centrifugação, o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico (BORGES et al, 2015; PRESTES et al., 2009).

Além do menor número de etapas e da menor quantidade de massa de sorvente usado, se comparado com a SPE, uma das principais vantagens é a versatilidade no desenvolvimento de novos métodos, visto que diferentes combinações de sorventes são possíveis, dependendo do tipo de matriz e dos analitos de interesse (BORGES et al., 2015). Recentemente, Volpato e colaboradores em 2016 empregaram o método QuEChERS original para a extração de 19 resíduos de agrotóxicos em uva. A etapa de limpeza consistiu de d-SPE com os sorventes sulfato de magnésio, Florisil visando a remoção de interferentes e coextrativos tais como os pigmentos.

2.8.1.1 Sorventes

Diversos sorventes podem ser utilizados tanto em SPE quanto em d-SPE (WILKOWSKA & BIZIUK, 2011). Para a escolha do sorvente, os critérios a serem considerados são a estrutura química do analito, as propriedades do sorvente e a composição da matriz da amostra, os quais definirão o mecanismo a ser empregado e, conseqüentemente, a seleção do sorvente mais adequado (JARDIM, 2010).

A estrutura bidentada do (PSA) tem elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário na sua estrutura. Como resultado, auxilia na remoção de interferências, tais como ácidos graxos livres, açúcares e outros compostos polares da matriz (ARIAS et al., 2014). O sorvente octadecilsilano (C18) é o mais utilizado para matrizes com teor de gordura maior que 2%, pois remove com boa eficiência interferentes apolares, tais como substâncias graxas e lipídios (LEHOTAY, 2011).

O carvão ativado ou carbono grafitizado (GCB) possui uma grande área superficial e contém grupos altamente polares na superfície, com alto potencial para formação de ligações de hidrogênio. Assim, ocorre forte retenção de analitos planares que contenham um ou mais grupos ativos em sua estrutura, resultando em baixas recuperações para estes compostos (HENNION, 2000).

Diversos estudos avaliaram a aplicabilidade de outros tipos de sorventes, incluindo: sorventes à base de dióxido de zircônio (Z-sep, Z-sep⁺, Z-sep/*C18), chloroFiltr®, Florisil, alumina neutra, grafeno, nanotubos com paredes múltiplas, quitina, quitosana, e terra diatomáceas. Para matrizes de alta complexidade, pode-se usar uma mistura de dois ou três sorventes diferentes para conseguir uma limpeza suficiente de vários coextrativos sem afetar severamente a recuperação de compostos, como o EMR-Lipid® atua removendo seletivamente lipídios em matrizes complexas, sem perda de analitos (WALORCZYK et al., 2015; HAN et al., 2016).

2.8.2 Técnica de Dilute and Shoot

Devido à complexidade e diversidade das amostras de alimentos, os métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos são geralmente compostos por etapas de extração, limpeza, separação, detecção, quantificação (DZUMAN et al., 2015). Em função destas várias etapas, aumentar a frequência analítica é um desafio em todo laboratório analítico. Um fator importante que limita a frequência analítica é a etapa de preparo da amostra, limpeza e tempo de análise no instrumento. A omissão ou redução da etapa de limpeza da amostra associada a uma análise mais rápida podem resultar na redução de custos com a mão de obra, reagentes, etc (SILVA, 2017).

A técnica de *dilute and shoot* permite que a amostra seja diretamente injetada no sistema cromatográfico apenas diluindo o extrato. Nesta abordagem, uma pequena porção da amostra é filtrada, diluída com a fase móvel ou solvente de extração e após injetado no equipamento. Não há perdas devido à transferência para fase líquida. Essa abordagem é eficiente quando a geração rápida de dados é necessária e quando há muitas amostras a serem preparadas. Sendo carregado um menor número de impurezas para o sistema cromatográfico. Sem o uso da etapa de limpeza obtêm-se melhores recuperações para estruturas planares e bases, evitando perdas por adsorventes como GCB e PSA. Portanto, o procedimento de *dilute and shoot* (diluir e

injetar) tem sido uma ferramenta bastante utilizada em diferentes áreas, como farmacêuticas, antidoping, forense e alimentos (ARIAS et al., 2017).

Nos últimos anos, os métodos *dilute and shoot* tornaram-se cada vez mais populares. Nesses métodos, as amostras são apenas diluídas na presença de padrão interno e diretamente injetadas em um sistema LC-MS. A diluição da amostra apresenta vantagens de ser muito simples, de baixo custo e compatível com condições cromatográficas de fase reversa. Por outro lado, sua utilidade pode ser limitada por efeitos da matriz. Inúmeros métodos já foram publicados, a maioria dedicada à análise de fluidos biológicos (ESPOSITO et al., 2016).

Os métodos *dilute and shoot* não usam etapas de limpeza de amostras, dependendo do fator de diluição utilizado a matriz inalterada pode levar a efeitos de matriz mais perceptíveis e um menor desempenho do instrumento, por exemplo, cone de amostra sujo, colunas de cromatografia entupidas (DAHLIN et al., 2018).

Procedimentos de extração utilizando misturas de acetonitrila/ água, metanol/ água e outros solventes ou em combinação dos mesmos, que muitas vezes não exigem etapas de limpeza, foram relatados na literatura com aplicações da técnica de *dilute and shoot* (MALACHOVA et al., 2018).

2.8.3 Presença de coextrativos e efeito matriz nas determinações por LC-MS/MS

O efeito matriz é observado quando uma considerável diferença de resposta é obtida entre soluções padrão preparada no solvente e aquelas preparadas no extrato da matriz. Uma das maneiras de minimizar e/ou eliminar este efeito é reduzir a quantidade de componentes da matriz que coeluem com os analitos no detector e, para isto, métodos de extração mais seletivos e etapas mais eficientes de limpeza devem ser desenvolvidos. Contudo, alternativas como, por exemplo, a padronização externa realizada em extrato da matriz é geralmente utilizada (CABRERA et al., 2012).

Além de estar associado a problemas de recuperação, o efeito matriz, pode causar outras alterações na análise cromatográfica, como: a) mascaramento do pico do analito de interesse, gerando um resultado falso negativo; b) erro na identificação do analito, sendo que componentes da matriz podem ser erroneamente identificados como o analito de interesse quando, na realidade, este está ausente, gerando resultado falso positivo; c) aumento no sinal do detector, levando à superestimação

do resultado. Isso ocorre quando impurezas voláteis são eluídas com o mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse; d) extinção do sinal no detector, ou seja, o sinal analítico é reduzido gerando subestimação do resultado (PINHO et al., 2009).

A intensidade do efeito de matriz é influenciada pela natureza da amostra e pelo tipo de coextrativos (tamanho das moléculas, polaridade, estabilidade térmica, volatilidade, etc.). Esse efeito é mais significativo na análise de agrotóxicos quando estes se encontram em concentrações mais baixas ou quando a proporção de componentes da matriz/analito é muito alta (PINHO et al., 2009).

Diversas estratégias são utilizadas a fim de compensar o efeito matriz em cromatografia líquida, dentre elas, o uso do método de adição de padrão, uso de padrão interno deuterado, preparo das soluções analíticas no extrato da matriz, uso de analitos protetores, limpeza dos extratos, entre outras (CAJKA et al., 2012).

A etapa de limpeza do extrato é fundamental para que componentes da matriz não interfiram nos resultados, causando supressão ou aumento do sinal analítico, uma vez que componentes não voláteis da matriz podem ficar aderidos no sistema de injeção e também na coluna cromatográfica, alterando a resposta e aumentando a frequência de manutenções técnicas no equipamento (MORRISON et al., 2016).

2.9 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

A cromatografia líquida de alta eficiência (STACHNIUK, FORNAL., 2016) (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) e a cromatografia gasosa (HERNANDEZ, et al., 2013) (GC, do inglês *gas chromatography*) são técnicas de separação tradicionalmente empregadas para determinação de resíduos de agrotóxicos.

A GC é uma técnica utilizada na separação de substâncias químicas, apresenta fator de resolução excelente, que se baseia na diferença da distribuição de substâncias de uma amostra entre uma fase estacionária e a fase móvel (um gás), sendo esta aplicada a análise de compostos voláteis ou volatilizáveis, que sejam estáveis termicamente. Desde a década de 70 a GC combinada a diferentes tipos de detectores é utilizada para análise de agrotóxicos em alimentos e bebidas. Porém, com o desenvolvimento de agrotóxicos modernos, com características polares ou

iônicos, que são menos persistentes e menos tóxicos ao meio ambiente, fez-se crescente a utilização da HPLC (YUSA et al., 2015).

No HPLC o principal requisito para a análise é a solubilidade dos compostos na fase móvel. Como a maioria dos compostos, atualmente, desenvolvidos não apresentam alta volatilidade para serem analisados por GC, a HPLC tem tido grande destaque. Os principais sistemas clássicos de detecção empregados são: detector de ultravioleta e visível (UV-vis); detector por arranjo de diodos (DAD, do inglês *diode array detector*) e detector de fluorescência (FD, do inglês *fluorescence detector*) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009). Estes detectores associados a cromatografia ainda são bastante aplicados para a análise de agrotóxicos em diferentes matrizes, especialmente quando aliados a técnicas de extração que possibilitem a concentração dos analitos (VIÑAS et al., 2008; JOVANOVA et al., 2015). Tanto os sistemas de GC quanto o HPLC passaram por diversas modificações ao longo dos anos sempre em busca de determinações mais rápidas e eficientes. Assim, em meados de 2004, com a introdução da cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*) a cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*) passou por uma importante evolução com a utilização de partículas de fase estacionária porosas $\leq 2 \mu\text{m}$, sendo que na HPLC as partículas de fase estacionária são da ordem $4 \mu\text{m}$ (MALDANER & JARDIM, 2012).

A UHPLC fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da HPLC, tendo como principais diferenças as colunas cromatográficas empregadas que são de dimensões reduzidas (5-10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1 à 2,1 mm), recheadas com partículas de fase estacionária $\leq 2 \mu\text{m}$, as quais, juntamente com as altas velocidades lineares de fase móvel (FM) aumentam a resolução e a detectabilidade, diminuem o tempo das análises, porém, geram um aumento significativo na pressão cromatográfica do sistema de até 1000 bar (~ 15000 psi). Sistemas de UHPLC apresentam como características: sistema de bombeamento robusto; sistema de injeção rápido, exato e preciso na faixa de pequenos volumes; volumes internos reduzidos (conexões, alça de amostragem, cela do detector e bombas) e detectores com alta taxa de aquisição de dados (HANOT, 2015; MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ, 2015).

Os cuidados com a limpeza do sistema cromatográfico e dos extratos também devem ser maiores no sistema UHPLC, uma vez que suas tubulações e seus filtros da coluna são muito mais suscetíveis ao entupimento que aquelas empregadas em

HPLC. Isto ocorre devido a redução dos diâmetros internos (d.i.) das tubulações (necessária para diminuir o volume extra coluna e evitar o alargamento do pico cromatográfico) e a diminuição da porosidade dos filtros (necessária para reter as partículas de FE $\leq 2 \mu\text{m}$ no interior da coluna mantendo um leito cromatográfico estável). Alguns autores têm apostado no desenvolvimento de métodos multirresíduo utilizando a UHPLC para determinação de agrotóxicos em amostras de alimentos, por exemplo, frutas e vegetais (WANG et al., 2019), cereais (SILVA et al, 2019), ovos (ZHANG et al., 2019) e mel (CAMPONE., 2019).

2.9.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para determinação de resíduos de agrotóxicos

As técnicas cromatográficas podem ser combinadas a diferentes sistemas de detecção. Dentre os diversos tipos de detectores a espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) tem apresentado grande destaque pela sua versatilidade de uso em ambas as técnicas (GC-MS, do inglês *gas chromatography coupled to mass spectrometry* e LC-MS do inglês, *liquid chromatography coupled to mass spectrometry*). CHIARADIA e colaboradores (2008) destacam que o acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da MS (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade).

O princípio básico da MS é a geração de íons decompostos orgânicos ou inorgânicos e separação através da sua razão massa/carga (m/z), seguida da detecção qualitativa e quantitativa da respectiva m/z e abundância. Essa ionização pode ser realizada termicamente, por campo elétrico, por impacto energético por elétrons, íons ou fótons, dentre outros (LAI, 2013).

O espectrômetro de massas consiste em uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector, sendo que os dois últimos são operados em condições de alto vácuo. A fonte de íons não necessariamente estará sob vácuo (GROSS, 2004). A cromatografia líquida quando acoplada à espectrometria de massas pode empregar as fontes de eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray ionization*), ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical*

ionization) ou ainda fotoionização a pressão atmosférica (APPI, do inglês *atmospheric pressure photoionization*) (LANÇAS, 2009).

Atualmente, a ESI é a fonte de ionização mais utilizada. Nela o analito dissolvido na fase móvel passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (“*spray*”) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás (geralmente N₂) na região do “*spray*”. Com a dessolvatação o tamanho das gotas é reduzido até um ponto em que as forças de repulsão entre as cargas similares se tornam maiores do que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Devido a esse efeito ocorre a chamada “explosão coulômbica” que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais se originaram. Uma série de explosões passa então a ocorrer até que são produzidos íons do analito a partir destas gotas, os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (MALDANER & JARDIM, 2012).

Tanto na ESI como na APCI pode ocorrer a formação de adutos entre os íons moleculares e Na⁺, K⁺, NH₄⁺, HCOO⁻ e CH₃COO⁻, que são espécies iônicas presentes nas FM provenientes dos modificadores adicionados a elas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Em todos os casos, a natureza do analito e as condições de separação tem uma forte influência sobre qual técnica de ionização (ESI, APCI ou APPI) irá promover os melhores resultados (STACHNIUK & FORNAL et al., 2016).

Com relação aos analisadores de massas, responsáveis pela separação dos íons de acordo com a m/z, atualmente existe uma grande variedade disponível no mercado. A escolha do mais apropriado depende de fatores como a aplicação (faixa de massas desejada), o desempenho (resolução) bem como o custo. Alguns exemplos são: quadrupolo (e triplo quadrupolo), aprisionamento de íons (do inglês, *ion trap*), tempo de voo e quadrupolo-tempo de voo (BERNARDI, et al, 2017).

O analisador do tipo triplo quadrupolo é constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo (Q2 ou q) é utilizado como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo (Q1), geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (CID, do inglês, *collision-induced dissociation*), e também como direcionador dos íons produzidos ao

terceiro quadrupolo (Q3). Todos os quadrupolos são controlados para transmitir íons de uma única razão m/z ou de um intervalo de razões m/z para gerar informação analítica mais exata (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Na CID o íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo é acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo, onde sofre repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia (geralmente Ar, He ou N₂), levando a um aumento na energia potencial deste íon até ocasionar sua fragmentação, conduzindo a formação dos íons produto (LANÇAS, 2009; STASHENKO & MARTINEZ, 2010;). O analisador do tipo triplo quadruplo é um dos mais utilizados para quantificação de resíduos de agrotóxicos possuindo diversas aplicações na literatura (WALORCZYK; DROŹDŹYŃSKI; KIERZEK, 2015). Dentre as técnicas de operação para obtenção do espectro de massas em MS/MS, estão a varredura completa (do inglês, *full scan*), monitoramento de íon selecionado (SIM, do inglês, *selected ion monitoring*), varredura do íon produto e a varredura do íon precursor e monitoramento seletivo de reações (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*). O tipo de varredura *full scan* é muito comum quando não se sabe que componentes a amostra possui, logo se pode realizar um *screening* em uma ampla faixa de m/z . O cromatograma nestas condições é conhecido como cromatograma de íon total (TIC, do inglês *total ion chromatogram*) (STASHENKO & MARTINEZ, 2010; STACHNIUK & FORNAL, 2016). O modo SIM é muito utilizado quando se tem apenas um quadrupolo, mas também pode ser utilizado no sistema triplo quadrupolo. Quando operado no modo SIM, pode-se escolher um único íon a ser monitorado ou vários íons característicos dos analitos alvo de interesse presentes em uma mistura complexa, aumentando a sensibilidade (STACHNIUK & FORNAL, 2016).

A varredura do íon produto consiste em selecionar um íon precursor de determinada m/z no Q1, que opera em modo SIM, e determinar todos os íons produto resultantes da dissociação induzida por colisão no Q3. Já a varredura do íon precursor consiste na escolha de um íon produto para determinar a origem do mesmo, ou seja, qual o íon precursor que originou este produto. Assim, o Q1 opera no modo scan ou varredura, enquanto o Q3 no modo SIM (STASHENKO & MARTÍNEZ, 2010). No modo SRM é monitorada a fragmentação de um íon precursor selecionado no Q1 e seus correspondentes íons produto que são filtrados em Q3. Este método permite que o equipamento focalize apenas o precursor e o produto, aumentando a detectabilidade

para o monitoramento, associado ao significativo aumento na seletividade (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; STASHENKO & MARTÍNEZ, 2010). Nos dias atuais, a LC-MS/MS empregando analisadores de massa do tipo triplo quadrupolo no modo SRM é a plataforma mais utilizada na análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos e bebidas (STACHNIUK & FORNAL, 2016).

2.9.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPREGADAS PARA DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS EM ALIMENTOS

Com a finalidade de acompanhar a etapa de limpeza dos extratos e a eficiência da remoção dos pigmentos coextrativos da matriz, técnicas complementares podem ser empregadas na otimização do método.

Os métodos convencionais para a avaliação de antocianinas empregam principalmente as técnicas de LC (FU et al., 2012). HPLC associada com detecção espectrofotométrica na ultravioleta/visível (uv/vis, do inglês *ultravioleta/visible*), arranjo de diodos (DAD, do inglês *diode array detector*) e detector de aerossol carregado (Corona CAD, do inglês *charged aerosol detector*) são técnicas analíticas geralmente empregadas na determinação de pigmentos e corantes, uma vez que estes absorvem radiação eletromagnética na região do UV/Vis (LIGOR & BUSZEWSKI, 2012).

2.9.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS VISANDO À DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

No desenvolvimento de um novo método analítico faz-se necessário a garantia de que as informações geradas através desse método sejam confiáveis e interpretáveis. Para tal, o método pode ser submetido a um processo de avaliação denominado validação. Existem diferentes definições para o termo validação e vários artigos e revisões têm sido publicadas a respeito de validação de métodos analíticos (RAMBLA ALEGRE et al., 2012). RIBANI e colaboradores (2004) citam dois tipos diferentes de validação, o primeiro, chamado de validação no laboratório ("*in house validation*"), o qual consiste de etapas de validação em um mesmo laboratório e é mais aplicado para as etapas preliminares do desenvolvimento de uma nova metodologia e na publicação de artigos científicos. O segundo tipo de validação é

denominado validação completa, o qual envolve um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios. Somente aplicando uma validação completa a metodologia pode ser aceita como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação.

No Brasil, há duas agências credenciadoras para a verificação da competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Independente dos parâmetros de validação a serem seguidos, é essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados. Um método para um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de traços. A frequência com que o método será utilizado (muitas vezes em um dia, uma vez em um dia para um estudo rápido, uma vez em um mês, etc) também influencia o tipo de estudo de validação que é necessário.

Os parâmetros analíticos normalmente envolvidos nos processos de validação de métodos de separação são: seletividade; linearidade e faixa de trabalho; efeito matriz; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez. A Tabela 5 apresenta de forma resumida as figuras de mérito que serão avaliadas neste trabalho.

Tabela 5- Parâmetros normalmente avaliados na etapa de validação de métodos cromatográficos.

Parâmetro	Definição	Referência
Seletividade	Capacidade do método de medir exatamente um analito em uma mistura complexa sem a interferência de outros componentes presentes.	INMETRO, 2018; SANTÉ, 2017
Faixa linear	Capacidade de uma técnica analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado como curva analítica.	INMETRO, 2018; SANTÉ, 2017
Efeito Matriz	Aumento ou diminuição na resposta do detector na presença do analito no extrato da matriz em relação ao solvente.	INMETRO, 2018; SANTÉ, 2017
Limite de detecção	Menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental.	INMETRO, 2018;
Limite de quantificação	menor concentração da substância em exame que pode ser medida, com um grau aceitável de confiança, utilizando um determinado procedimento experimental	INMETRO, 2018; SANTÉ, 2017
Precisão	Descreve a proximidade entre os resultados que foram obtidos exatamente da mesma forma.	INMETRO, 2018; SANTÉ, 2017
Exatidão	Indica o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro	INMETRO, 2018; SANTÉ, 2017

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria.

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados abaixo:

- Sistema de purificação de água, Milli-Q Direct UV3R (Millipore, Molsheim, França);
- Centrifuga refrigerada NT 825 (Nova Técnica, Brasil);
- Centrifuga DAIKI 80-2B (Centribio, Brasil);
- Agitador Vortex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- Balança analítica de precisão AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- Balança analítica de precisão UX-420H (Shimadzu, Japão);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- Os cromatogramas *full scan* foram obtidos no sistema GC-MS/MS INTUVO (AGILENT, EUA).
- Processador Skymesen CR-8L Cutter.
- Sistema HPLC-UV/Vis, equipado com bomba quaternária, modelo 9010 (Varian, EUA); Detector UV/Vis de comprimento de onda variável, modelo UltiMate VWD-3400RS (Thermo Scientific, EUA); coluna analítica Microsorb 100-5 C18, com 250 x 4,6 mm e 5 µm de diâmetro de partícula (Agilent, EUA); software para aquisição de dados Chromeleon 6.8 (Thermo Scientific, EUA).
- Sistema GC-MS/MS, modelo Agilent Intuvo 9000, contendo analisador de massas tipo triplo quadrupolo (QqQ) modelo Agilent 7010 GC-MS/MS e amostrador automático modelo Agilent 7693 (Agilent Technologies, EUA); Sistema de aquisição de dados MassHunter B.07.06.2704 (Agilent Technologies, EUA), Coluna capilar HP-5 MS UI (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Agilent Technologies, EUA); Gás Nitrogênio grau de pureza 6.5

(Air Liquide, Brasil); Gás Hidrogênio grau de pureza 5.0 (Air Liquide, Brasi); Gás Hélio grau de pureza 6.0 (Air Liquide,Brasil).

- Sistema UHPLC-MS/MS, modelo Xevo TQ (Water,EUA) contendo um analisador triploquadropolo acoplado a espectrômetro de massas e amostrador automático Sample Manager (Acquity). O sistema de aquisição de dados utilizado foi o MassLynx V 4.1. Sistema gerador de nitrogênio, modelo NM30L-MS (Peak Scientific, Escócia) e gás argônio 6.0 usado como gás de colisão no sistema UHPLC-MS/MS (White Martins, Brasil).

3.2 REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS UTILIZADOS

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

- Acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- Ácido acético glacial 100% (J. T. Baker, EUA);
- Ácido fórmico (J. T. Baker, EUA);
- Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3R
- Metanol, grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- Formiato de amônio (Sigma Aldrich, EUA);
- Tubos de polipropileno, com tampas de rosca com capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- Sulfato de magnésio anidro p.a. (J.T. Baker, Japão);
- Cloreto de sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- Acetato de sódio anidro (J.T. Baker, EUA)
- Citrato de sódio di-hidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- Hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- Kits de extração QuEChERS Original (Agilent, EUA);
- Kits de extração QuEChERS Citrato (Agilent, EUA);
- Kits de extração QuEChERS Acetato (Agilent, EUA);
- Acetona grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- Filtros de nylon de 13 mm e porosidade de 0,2 µm (Vertical Chromatography, Tailândia);

- Balão volumétrico de 10 mL de capacidade e demais vidraria comum de laboratório.

3.3 AMOSTRAS BRANCO DE UVA

A amostra de uva tinta utilizada como “branco” analítico deste trabalho foi adquirida em um mercado local na cidade de Santa Maria e analisada previamente ao desenvolvimento deste trabalho quanto a presença/ausência dos compostos de interesse.

3.4 COMPOSTOS SELECIONADOS PARA ESTE ESTUDO

Os compostos selecionados para este estudo foram escolhidos tendo como base os compostos que são monitorados pela ANVISA para uva e disponibilidade de padrões dos mesmos. Além disso, foi realizado um estudo dos compostos que são reportados com maior frequência na literatura a fim de complementar o método. Os padrões sólidos dos compostos utilizados foram adquiridos da empresa Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha) e estão listados na Tabela 6, juntamente com algumas propriedades físico-químicas, classe e grupo químico.

3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

As soluções estoque foram preparadas individualmente na concentração de 1000 mg L⁻¹ para todos os analitos selecionados, considerando a pureza dos padrões sólidos. A massa pesada de cada padrão sólido foi dissolvida em acetonitrila e as soluções estoque foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura de -10°C. Após, foi preparada uma solução de trabalho em acetonitrila na concentração de 10 mg L⁻¹. A partir dessas soluções, preparou-se em acetonitrila uma mistura contendo todos os compostos na concentração de 1 mg L⁻¹. Para a injeção no sistema UHPLC-MS/MS, as soluções analíticas foram preparadas nas concentrações de 0,25 a 18,75 µg L⁻¹ para todos os compostos e na matriz uva, em acetonitrila. Com pureza maior de 96% para todos os compostos.

Tabela 6- Relação dos compostos em estudo, com informações de classe de ação, grupo químico e propriedades físico-químicas (pKa, Log Kow e solubilidade).

Composto	Classe (s)	Grupo Químico	pKa	log Kow	Koc (mg L ⁻¹)	Solubilidade (mg L ⁻¹)
2,4-d	Fungicida	alquilclorofenoxi	3,40	0,82	1,57	1,51 x10 ¹
ametrina	Herbicida	Triazina	4,1	2,63	96	1,8 x10 ³
azoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	0,94	2,50	740,2	11,6
bifentrina	Inseticida	Piretróide	-	-	-	-
boscalida	Fungicida	Anilida	10,7 0,11	4,00	3,74 x10 ⁷	2,61
carbendazim	Fungicida	Benzimidazol	4,2	1,55	175,8	2441
carbofurano	Inseticida	Metilcarbamato	3,7 2,1	2,32	70,85	354
ciproconazol	Fungicida	Triazol	-	2,90	1,60 x10 ⁷	45,7
clotianidina	Inseticida	Neonicotinóide	11,1	0,64	2,521	6,6 x10 ³
crexoxim metílico	Fungicida	Estrobilurina	-	-	-	-
difenoconazol	Fungicida	Triazol	1,0	4,30	2,43 x10 ⁷	0,60
dimetomorfe	Fungicida	Morfolina	1,3	2,63	1,36	42
diuron	Herbicida	Uréia	7,8	-	-	0,42
fenarimol	-	Metilcarbamato	14,7	-	-	-
famoxadona	-	Metilcarbamato	-	-	-	-
fenamidone	Inseticida	Organofosforado	-	3,29	2352	329
fentiona	Fungicida	Triazol	-	4,23	6131	7,0
imidacloprido	Inseticida	Neonicotinoide	-	0,57	3,72	-
indoxacarbe	Inseticida	Oxadiazinas	-	-	-	-
iprovalicarbe	Inseticida	Organofosforado	-	-	-	-
iprodiona	Inseticida	Metilcarbamato	5	4,70	577	0,02
metalaxil	Fungicida	Fenilamida	0	0,75	1,2	840
metconazol	Herbicida	Uréia	12,1	3,2	860	75
miclobutanil	Inseticida	Metilcarbamato	-	0,09	43	5,5 x10 ⁴
piraclostrobina	Inseticida	Organofosforado	-	3,83	1610	13
pirazofós	Inseticida	Organofosforado	-	3	476	70
pirimetanil	Fungicida	Estrobilurina	-	3,99	9300	20
piriproxifem	Inseticida	Organofosforado	-	3,1	7211	100
procimidona	Herbicida	Carbamato	-	4,01	55	1
simazina	Inseticida	Organofosforado	-	4,44	2010	28
tebuconazol	Herbicida	Triazina	4,1	3,1	277	33
tetraconazol	Inseticida	Organofosforado	-	4,44	1465	18
tiametoxam	Fungicida	Triazol	-	3,7	1000	32
triadimefom	Fungicida	Benzimidazol	-	2,39	2500	30
triadimenol	Inseticida	Neonicotinóide	-	-	615	184
zoxamida	Fungicida	Imidazol	3,7	5,06	1240	18

Solubilidade: em água a 25°C

3.6 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO

A fim de assegurar a execução correta do procedimento de extração e de análise para cada amostra no sistema cromatográfico, além da localização de fontes de erro, são adicionados o Padrão Interno (PI) e o Padrão de Controle (PC) (SANTÉ, 2017). Estas substâncias são adicionadas em diferentes estágios do procedimento analítico e possuem diferentes finalidades, conforme descrito a seguir.

Trabalhos reportados na literatura apontam o composto trifenilfosfato (TPP) como mais adequado para uso como padrão interno (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Este composto foi utilizado apenas para a avaliação do instrumento, aceitando-se valores de variação de área de 20%. No extrato final (1 mL) foram adicionados 2 μL de uma solução 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$, resultando na concentração final de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Como padrão de controle utilizou-se atrazina deuterada, empregado para a avaliação do procedimento de extração na forma de resultados de recuperação (70-120%), uma vez que é adicionado à amostra anteriormente à extração dos analitos, nas mesmas concentrações empregadas para avaliação dos ensaios de recuperação (25, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

3.7 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVA

Baseado em trabalhos previamente publicados (KEMMERICH *et al.*, 2015) a fase móvel utilizada neste trabalho consistiu em: A) solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) e formiato de amônio 5 mmol L^{-1} e B) solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) e formiato de amônio 5 mmol L^{-1} em metanol, conforme gradiente descrito na Tabela 7. O tempo total de corrida foi de 10 min.

Tabela 7- Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de agrotóxicos em uva no sistema UHPLC-MS/MS.

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

Vazão constante de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Os parâmetros utilizados no sistema UHPLC-MS/MS foram previamente otimizados no LARP-UFSM, através de planejamento experimental (KEMMERICH *et al.*, 2015). Abaixo, na Tabela 8, estão descritas as condições utilizadas para determinação dos resíduos de agrotóxicos em amostras de uva.

Os íons característicos de cada composto em estudo foram monitorados no modo SIM no quadrupolo (Q1) e no quadrupolo 3 (Q3) foi realizada varredura do íon produto variando as energias de colisão, a fim de otimizar as melhores condições de detecção. A partir deste estudo prévio, constatou-se que o modo de ionização por eletronebulização positiva apresentou melhor resultado para a maioria dos compostos. Além disso, voltagem do capilar, energias de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar os íons produtos também foram estudadas. Após, foram avaliadas as transições, no modo SRM a serem utilizadas para a etapa de quantificação (transição de maior intensidade) e identificação (transição de segunda maior intensidade) dos compostos estudados.

Tabela 8 - Parâmetros utilizados no sistema UHPLC-MS/MS para determinação de resíduos de agrotóxicos em uva.

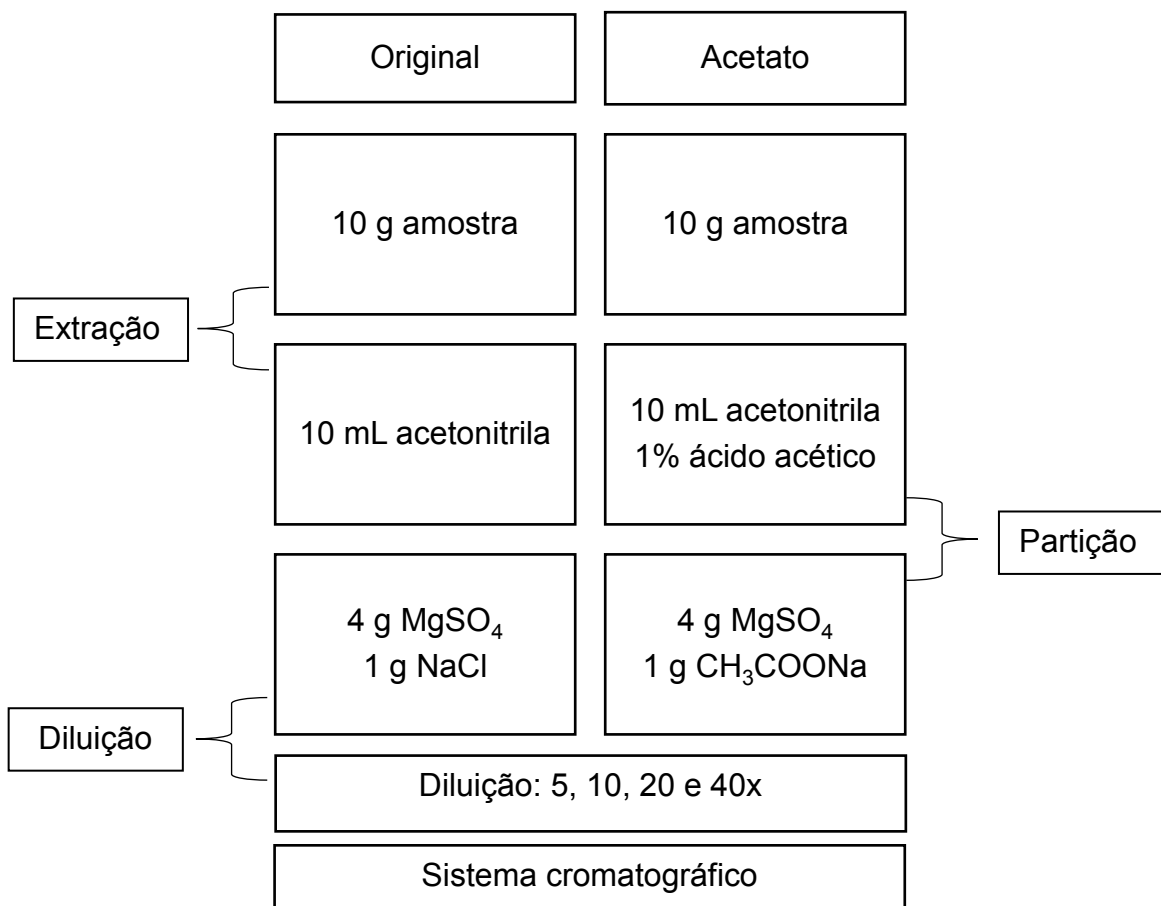
Parâmetros	UHPLC-MS/MS
Coluna analítica	ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μm , 2,1 x 50 mm
Temperatura da coluna	40 $^{\circ}\text{C}$
Voltagem do capilar	2 kV
Temperatura de solvatação	500 $^{\circ}\text{C}$
Vazão do gás de solvatação (N_2)	600 L h^{-1}
Vazão do spray	80 L h^{-1}
Vazão do gás de colisão	0,15 mL min^{-1}
Temperatura da fonte	150 $^{\circ}\text{C}$
Volume de injeção	10 μL
Tempo de residência (<i>dwel time</i>)	0,01 s
Vazão do gás de colisão	0,15 mL min^{-1}
Temperatura da fonte	150 $^{\circ}\text{C}$
Volume de injeção	10 μL
Tempo de residência (<i>dwel time</i>)	0,01 s

3.8 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVA

Os métodos de preparo de amostra avaliados neste trabalho foram desenvolvidos com base em trabalhos da literatura para determinação multirresíduo de agrotóxicos em frutas: QuEChERS original (ANASTASSIADES et al., 2003), QuEChERS acetato (LEHOTAY et al., 2005), QuEChERS citrato (ANASTASSIADES et al., 2007) e QuEChERS citrato acidificado (KOESUKWIWAT et al., 2008; LOZOWIKA, 2017). Além disso, a etapa de limpeza não foi realizada a fim de avaliarmos diferentes fatores de diluição seguindo a técnica de *dilute and shoot* a partir de 10 mL do extrato. Um resumo de cada um dos procedimentos está abaixo descrito.

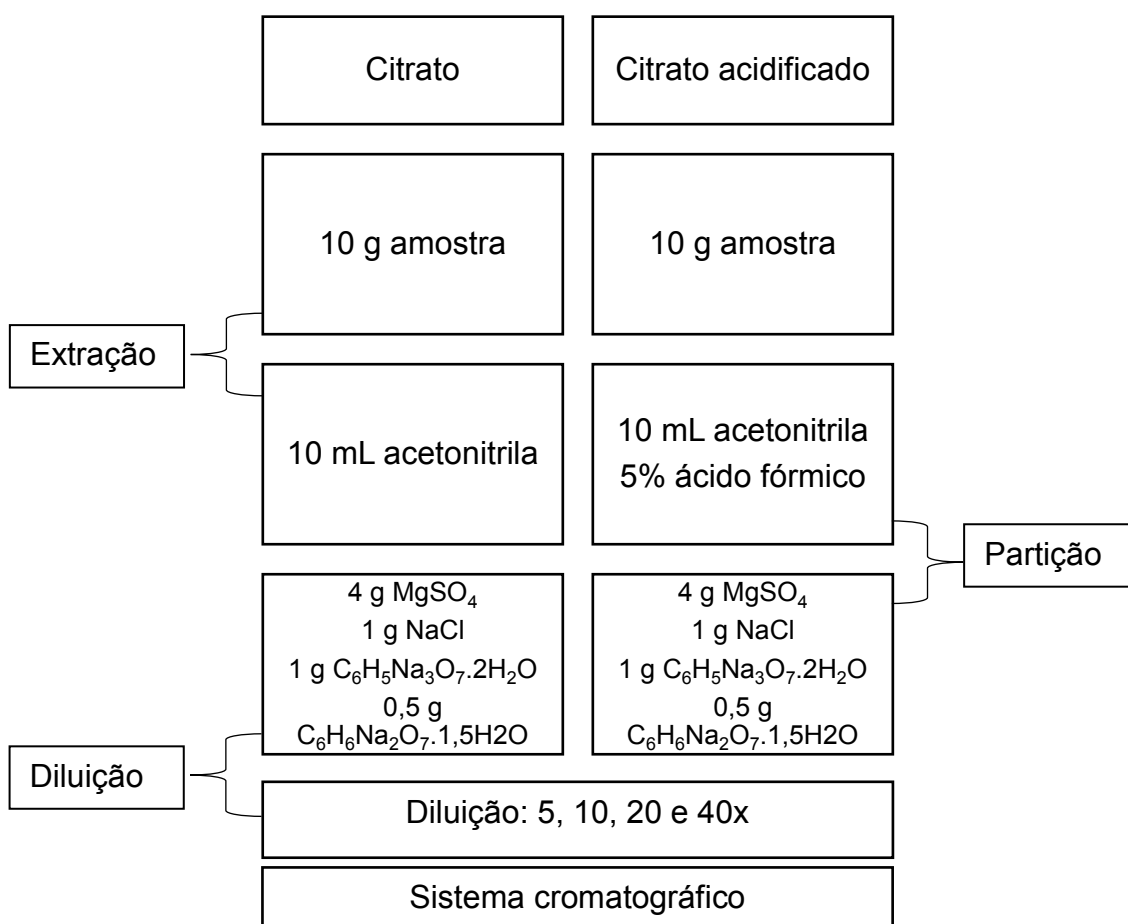
Teste T1: QuEChERS original (ANASTASIADES et al., 2003).

Teste T2: QuEChERS acetato (LEHOTAY et al., 2005).



Teste T3: método QuEChERS citrato ANASTASIADES et al., 2007).

Teste T4: método QuEChERS citrato acidificado (KOESUKWIWAT et al., 2008; LOZOWIKA, 2017).



3.9 AVALIAÇÃO GRAVIMÉTRICA DOS COEXTRATIVOS OBTIDOS APÓS REALIZAÇÃO DA ETAPA EXTRAÇÃO

Os extratos obtidos na etapa de extração de cada um dos quatro métodos QuEChERS avaliados foram submetidos a testes gravimétricos para verificar a quantidade de coextrativos provenientes de cada método de extração (SAPOZHNIKOVA & LEHOTAY, 2013).

Nesta avaliação, um tubo de vidro (fundo cônico) de 15 mL foi colocado em uma estufa por 1 h a 105 °C. Após, colocou-se em dessecador para resfriamento até a temperatura ambiente (20 °C). Depois, pesaram-se os tubos vazios na balança

analítica (n= 3). Para a avaliação da quantidade de coextrativos, transferiu-se 5 mL de extrato para o tubo seco. Após o extrato foi evaporado por 1 h à 50 °C sob fluxo de nitrogênio (15 psi) em evaporador Turbovap® LV. Terminada a evaporação do solvente, o tubo foi transferido para a estufa e submetido à secagem adicional por 1 h à 110 °C. Em seguida, colocou-se em dessecador para o resfriamento até a temperatura ambiente de 20 °C, sendo pesado em balança analítica para verificar a massa de coextrativos presente nos tubos secos. A massa de coextrativos proveniente de cada método avaliado foi calculada por diferença entre a massa do tubo contendo os coextrativos após as etapas de evaporação e secagem. Cada método de extração/partição foi avaliado em triplicata.

3.9.1 Avaliação da presença de coextrativos empregando GC-MS (modo *full scan*)

A técnica de GC-MS (modo *full scan*) foi empregada na avaliação qualitativa da presença de coextrativos. Para isso, injetou-se 1 µL de extrato proveniente de cada um dos três métodos QuEChERS avaliados sem etapa de limpeza ou diluição. As condições utilizadas no sistema GC-MS foram modo de injeção *splitless* pulsado; temperatura da fonte de 300 °C, temperatura do *transfer line* de 290 °C e temperatura do injetor de 280 °C. A temperatura do forno mantida por 1 min a 60 °C, 40 °Cmin⁻¹ para 170 °C e 10°C min⁻¹ para 310 °C. O modo de ionização empregado foi impacto de elétrons e modo de aquisição varredura (*full scan*). Foi realizada uma avaliação visual do perfil cromatográfico de cada extrato a fim de avaliar a presença de coextrativos. Além disso, se fez uso do software *MassHunter* para sugerir a estrutura de alguns dos coextrativos presentes.

3.9.2 Avaliação da presença de coextrativos empregando HPLC-UV/Vis

A técnica de HPLC-UV/Vis foi empregada na avaliação qualitativa da remoção dos pigmentos (principalmente antocianinas) nos extratos provenientes dos testes com os quatro métodos de QuEChERS realizados. A separação cromatográfica foi realizada com uso do sistema HPLC-UV/Vis e coluna Microsorb® 100-5 C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) (Agilent, EUA). O *software* utilizado para controle de instrumentos e

processamento de dados foi Chromeleon 6.8 (Thermo, EUA). A fase móvel foi composta de água-acetonitrila-ácido fórmico; 81:9:10 v/v/v (modo isocrático). A vazão e o volume de injeção utilizados foram de 1 mL min⁻¹ e 20 µL, respectivamente. A detecção das antocianinas foi realizada empregando quatro comprimentos de onda, sendo estes: 525 nm (Cianidina), 534 nm (Malvidina), 530 nm (Delfinidina) e 512 nm (Pelargonidina). Avaliou-se a eficiência qualitativa de remoção das antocianinas por comparação entre os perfis de separação e as diluições realizadas nos extratos.

3.9.3 Avaliação da influência do fator de diluição e da eficiência de extração de cada uma das versões do método QuEChERS

Os testes descritos no item 3.8 também foram avaliados em relação as melhores condições de extração dos compostos em estudo. Realizaram-se ensaios fortificação (n=3), na concentração de 50 µg kg⁻¹. Os testes de extração foram avaliados em relação ao número de compostos que apresentaram resultados aceitáveis (recuperação 70-120% e RSD≤20%).

Após realização dos ensaios de extração, efetuou-se diluição do extrato final em diferentes proporções (5, 10, 20 e 40x) empregando a técnica de *dilute and shoot*. A diluição do extrato foi realizada em água ultra purificada, baseada em trabalho previamente publicado por Kemmerich et al. (2015). Esta etapa foi realizada como alternativa à necessidade de limpeza do extrato empregando a técnica de d-SPE.

3.10 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVA POR UHPLC-MS/MS

O método melhor avaliado neste trabalho foi validado conforme os parâmetros já descritos de seletividade, curva analítica, faixa linear, efeito matriz, limites de detecção e quantificação, exatidão através de ensaios de recuperação, precisão (repetibilidade) e precisão intermediária (reprodutibilidade). Os parâmetros avaliados estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros avaliados na etapa de validação do método, com respectivas formas de aplicação, equações (quando aplicável) e critérios de aceitação.

Parâmetro	Aplicação	Equações	Critério	Referência
Seletividade	Comparação dos cromatogramas obtidos para extratos de amostras “branco” e da amostra “branco” fortificada com estes compostos.	-	Ausência de picos de interferentes nos tempos de retenção dos analitos de interesse.	SANTÉ, 2017
Faixa linear	Injeção em triplicata das soluções analíticas preparadas de acordo com o item 3.5. Avaliação do coeficiente de determinação (r^2).	Equação 1: $y = ax + b$ Onde: y = resposta medida (área do pico); x = concentração; a = coeficiente angular - inclinação da curva analítica = sensibilidade; b = coeficiente linear - interseção com o eixo y, quando x = 0.	$r^2 \geq 0,99$	INMETRO, 2018
Efeito Matriz	Comparação entre as inclinações das curvas analíticas dos padrões no solvente (acetonitrila) e aquelas obtidas com soluções analíticas preparadas no extrato da matriz.	Equação 2: $EM(\%) = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100$ Onde: X1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em extrato da matriz. X2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em solvente.	$EM \geq 20\%$	MATUSZEWSKI <i>et al.</i> , 2006; SANTÉ, 2017
Limite de quantificação	Menor concentração que, fortificada na matriz (n=6), apresente resultados aceitáveis de exatidão e precisão.	-	Recuperações 70 - 120% e RSD $\leq 20\%$.	INMETRO, 2018; SANTÉ, 2017
Limite de detecção	Calculado a partir do limite de quantificação.	Equação 3: $LOD = LOQ / 3,33$ Onde: LOQ = limite de quantificação	-	INMETRO, 2018
Exatidão	Ensaio de recuperação, fortificando as amostras “branco” em 3 níveis de concentração (25, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (n=6). Avaliada em termos de recuperação (%).	Equação 4: $REC(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$ Onde: C1= Concentração determinada na amostra fortificada; C2= Concentração determinada na amostra não fortificada; C3 = Concentração usada para fortificação.	70 – 120%	INMETRO, 2018; SANTÉ, 2017
Precisão	Ensaio de recuperação, fortificando as amostras “branco” em 3 níveis de concentração (25, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (n=6). Avaliada em termos de RSD.	Equação 5: $RSD(\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100$ Onde: s = estimativa de desvio padrão absoluto = $\{\sum(xi - \bar{x})^2/n-1\}^{1/2}$; xi = valores individuais; \bar{x} = média das medidas em replicatas; n = número de medidas.	$RSD \leq 20\%$	INMETRO, 2011; SANTÉ, 2015

3.11 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

O método desenvolvido, após ser validado, foi aplicado na determinação de resíduos de agrotóxicos em 20 amostras de uvas coletadas pelo Setor de Fiscalização vegetal da Secretaria de Agricultura, Pesca e Irrigação do estado do RS. Esta secretaria realizou coletas nas cidades de Santa Maria, Silveira Martins, Cacequi, Jaguari e Ivorá.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVA

De acordo com as condições descritas na Tabela 10 foram monitorados 36 agrotóxicos por UHPLC-MS/MS. As condições cromatográficas utilizadas na separação dos agrotóxicos selecionados foram avaliadas através da injeção de soluções padrão preparadas individualmente na concentração de 0,1 mg L⁻¹ dos princípios ativos dos agrotóxicos em estudo. Foram obtidos os tempos de retenção (t_R) e o perfil de separação para cada um dos compostos de interesse.

A Tabela 10 apresenta todos os agrotóxicos, PC e PI analisados por UHPLC-MS/MS, utilizando o modo de ionização ESI+/ESI-, no modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção (t_R), íons precursores e íons produto para quantificação e confirmação de cada analito em estudo.

Tabela 10 - Tempos de retenção (t_R), íon precursor, íon produto, voltagem cone e energia de colisão para os agrotóxicos avaliados neste estudo, obtidos por UHPLC-MS/MS

compostos	t_R (min)	Íon Precursor (m/z)	VC (V)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
				Íon Produto (m/z)	EC (eV)	Íon Produto (m/z)	EC (eV)
2,4 D	5,42	219	18	122	13	161	13
ametrina	5,43	228	32	186	18	68	36
atrazina-d5 (PC)	5,40	221	26	179	18	101	23
azoxistrobina	5,76	404	17	329	30	372	15
bifentrina	8,17	440	15	166	42	181	20
boscalida	5,94	343	32	307	20	140	20
carbendazim	2,65	192	24	160	18	132	28
carbofurano	4,73	222	25	165	16	123	16
ciproconazol	6,23	292	27	125	24	70	18
clotianidina	3,24	250	15	132	18	169	12
crexoxim-metílico	6,69	314	15	116	12	206	07
difenoconazol	6,97	406	37	251	25	111	60
dimetomorfe	6,04	388	30	165	30	301	20
diuron	5,46	233	27	72	18	46	14
famoxadona	6,84	392	12	238	20	331	10
fenamidone	6,01	312	22	92	25	236	25

compostos	t _R (min)	Íon Precursor (m/z)	VC (V)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
				Íon Produto (m/z)	EC (eV)	Íon Produto (m/z)	EC (eV)
fenarimol	6,28	331	37	268	22	81	34
fentiona	6,64	279	25	169	16	247	13
imidacloprido	3,18	256	23	175	20	209	15
indoxacarbe	7,12	528	25	150	22	203	40
iprodivona	6,58	350	12	245	16	-	-
iprovalicarbe	6,22	321	19	119	16	203	10
metalaxil	5,41	280	15	192	17	220	13
metconazol	6,79	320	29	70	22	125	36
miclobutanil	6,31	289	25	70	18	125	32
piraclostrobina	6,76	388	20	163	25	194	12
pirazofós	6,80	374	33	194	32	222	22
pirimetanil	5,58	200	42	107	24	82	24
piriproxifem	7,88	332	23	96	14	23	14
procimidona	6,30	284	33	256	17	67	28
simazina	4,65	202	34	96	22	124	16
tebuconazol	6,66	308	31	70	22	125	40
tetraconazol	6,32	372	32	159	30	70	20
tiametoxam	2,68	292	19	132	22	211	12
triadimefon	6,22	294	22	69	20	197	15
triadimenol	6,23	296	12	70,2	10	99	15
trifenilfostato (PC)	6,72	327	40	152	37	215	28
zoxamida	3,45	288	17	118	28	146	10

VC: voltagem do cone; EC: energia de colisão; PI: padrão interno; PC: padrão de controle.

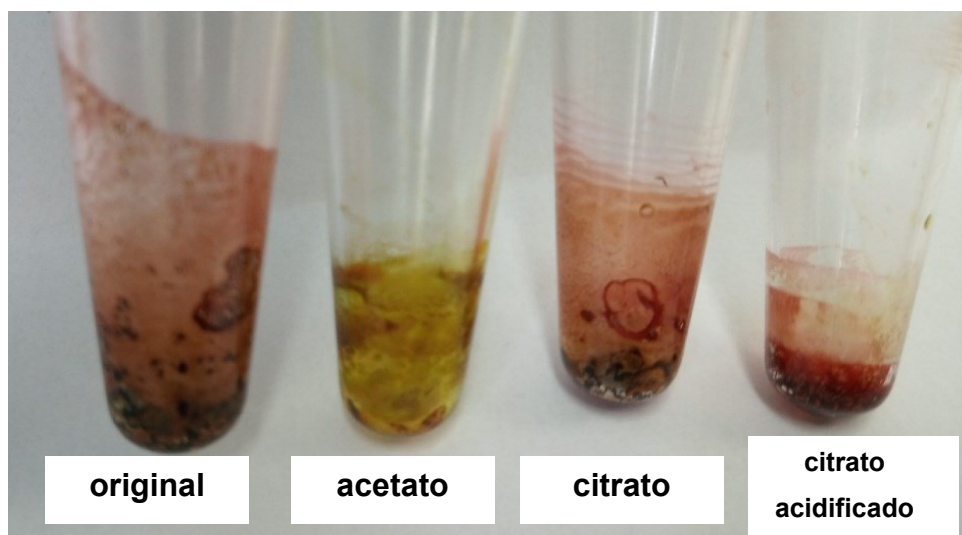
4.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVA

4.2.1 Avaliação gravimétrica dos coextrativos obtidos após realização da etapa extração

Foram realizados testes preliminares de extração com os métodos QuEChERS original, QuEChERS acetato, QuEChERS citrato e QuEChERS citrato acidificado. As condições empregadas em cada um destes métodos estão detalhadas no item 3.8. Devido à grande aplicabilidade os testes iniciais foram realizados com o método QuEChERS (original, acetato e citrato e citrato acidificado). Em um primeiro instante realizou-se a extração (n=3) de amostras “branco” de uva empregando cada uma das versões avaliadas. Após, empregou-se o procedimento de análise gravimétrica descrito no item 3.8. e verificou-se a quantidade de coextrativos não voláteis remanescentes em cada extrato seco. Salienta-se, que durante este experimento avaliou-se o extrato proveniente de cada um dos métodos sem nenhuma etapa de limpeza. A Figura 5

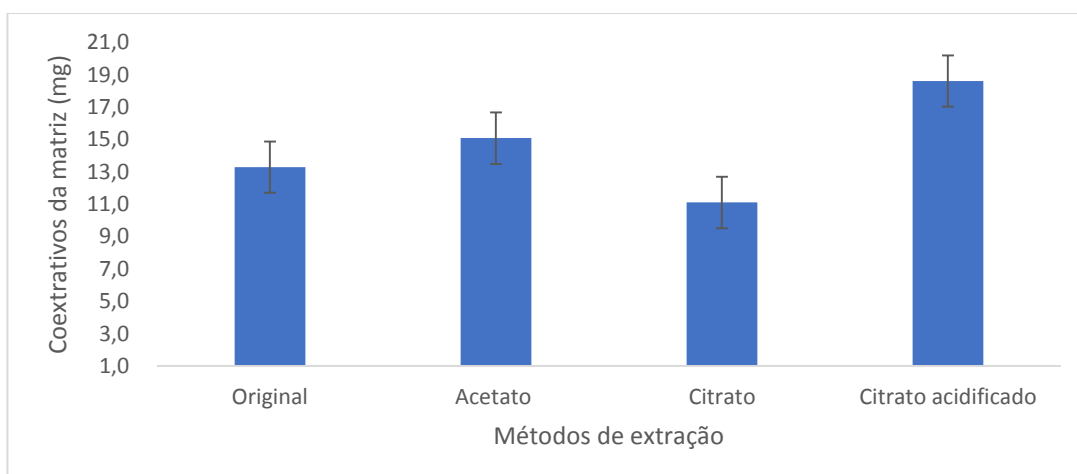
apresenta a aparência visual de cada um dos extratos avaliados, onde percebe-se, qualitativamente, uma quantidade significativa de coextrativos em cada tubo.

Figura 5 - Avaliação visual dos extratos obtidos pelos métodos QuEChERS original, acetato, citrato e citrato acidificado.



Conforme apresentado na Figura 6, o método QuEChERS citrato acidificado foi o que mais extraiu coextrativos (18,6 mg), quando comparados com as versões original (13,3 mg), acetato (8,7 mg) e citrato (11,1 mg). Isto já era esperado porque soluções ácidas extraem mais eficientemente coextrativos por gerar uma maior interação entre pontes de hidrogênio, conferindo maior estabilidade e com isso aumentando a quantidade de coextrativos extraídos da matriz com o solvente acetonitrila.

Figura 6 - Comparação entre a quantidade de coextrativos, obtida pelos métodos QuEChERS original, acetato e citrato, após a etapa de secagem do extrato em estufa.

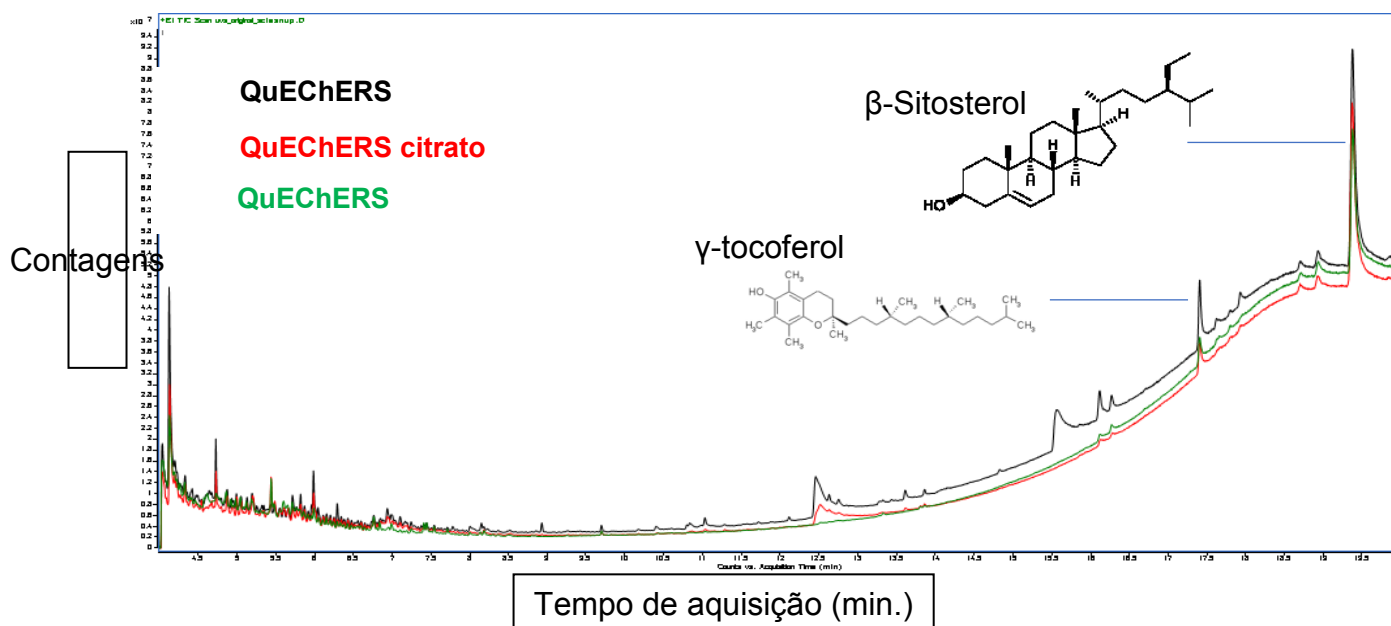


Estes resultados estão em concordância com o descrito por Anastassiades et al. (2007), que após a avaliação dos três métodos de extração concluíram que o método QuEChERS citrato acidificado promove uma maior extração de coextrativos quando comparado com os métodos QuEChERS original, acetato e citrato. Este comportamento está de acordo com Anastassiades et al. (2007) e Rejczak & Tuzimski (2015) o aumento na eficiência de coextrativos em solução está associado com as condições de acidificação do método proposto, que apresenta um pH 2,49 para o QuEChERS citrato modificado (LEHOTAY et al., 2005) e facilita a extração de uma quantidade maior de coextrativos. Por outro lado, este valor de pH favorece a extração de compostos de caráter ácido, como por exemplo o herbicida 2,4 D que apresenta uma melhoria na eficiência de extração em soluções com pH ácidos.

4.2.2 Avaliação da presença de coextrativos empregando GC-MS (modo *full scan*)

A Figura 7, apresenta a avaliação qualitativa do perfil cromatográfico apresentado pelas três versões do método QuEChERS (original, acetato, citrato). Salienta-se que os extratos injetados no sistema GC-MS (modo *full scan*) não foram submetidos a nenhuma etapa de limpeza ou diluição dos extratos.

Figura 7 - Cromatogramas obtidos a partir de injeções no sistema GC-MS em modo full scan, do extrato "branco" de uva, sem realização de etapa de limpeza.

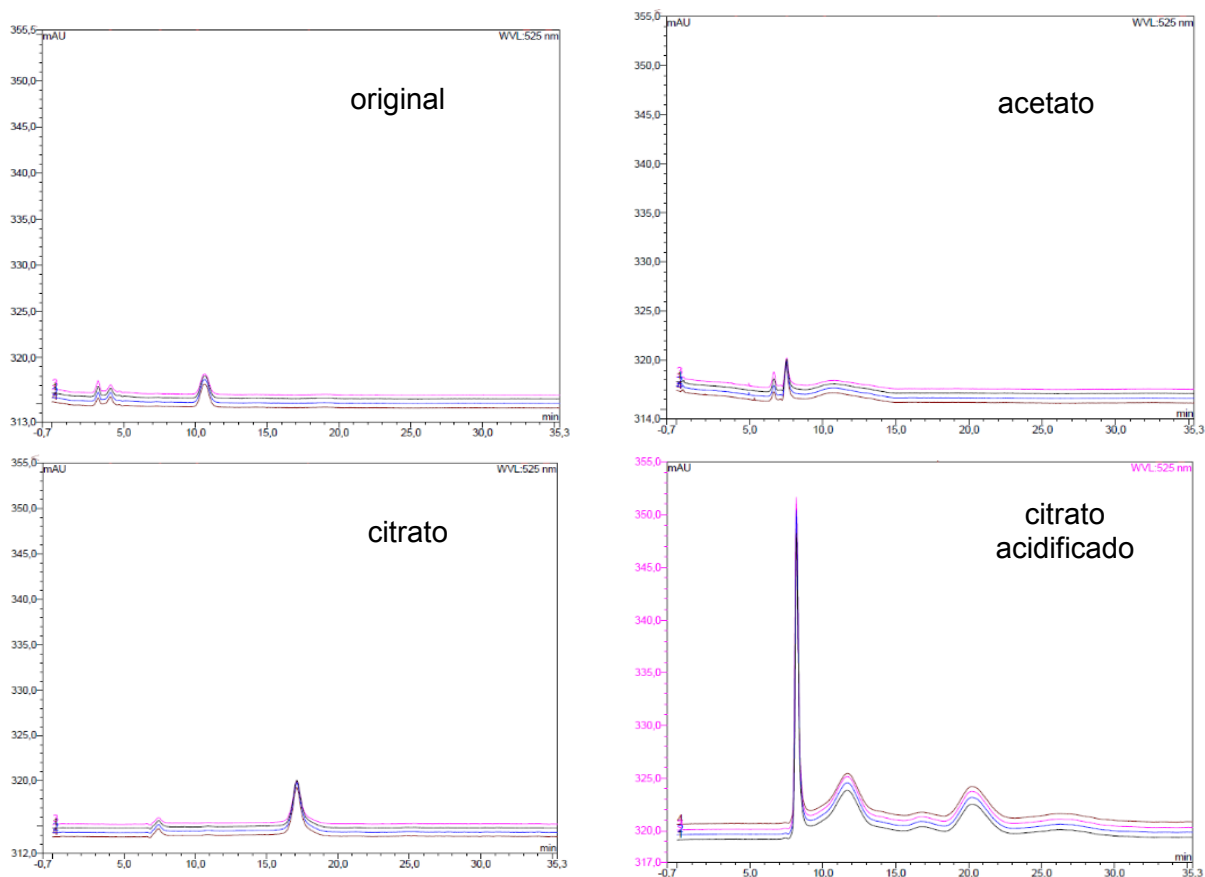


Este teste foi realizado como uma etapa complementar ao experimento descrito no item 3.8., e teve como objetivo avaliar a quantidade de coextrativos presente em cada extrato. Como pode ser observado o perfil cromatográfico é muito semelhante nas três versões do método QuEChERS avaliadas. Como descrito no item 2.2, amostras de uva são ricas em compostos fenólicos, principalmente flavonoides (antocianinas, flavonóis etc). Estes, preferencialmente analisados pela técnica de HPLC-UV/vis. Portanto, esta técnica também foi utilizada como método complementar para avaliação da quantidade de coextrativos proveniente de cada método.

4.2.3 Avaliação da presença de coextrativos empregando HPLC-UV/Vis

Como descrito no item 2.2, amostras de uva são ricas em compostos fenólicos, principalmente flavonoides (antocianinas, flavonóis etc). Estes, preferencialmente analisados pela técnica de HPLC-UV/vis. Portanto, esta técnica também foi utilizada como método complementar para avaliação da quantidade de coextrativos proveniente de cada método. A Figura 8, apresenta os cromatogramas obtidos por HPLC-UV/vis para cada uma das versões do método QuEChERS avaliada.

Figura 8 - Cromatograma da avaliação, por HPLC-UV/Vis, da presença de antocianinas provenientes da extração de amostra “branco” de uva empregando as diferentes versões do método QuEChERS.



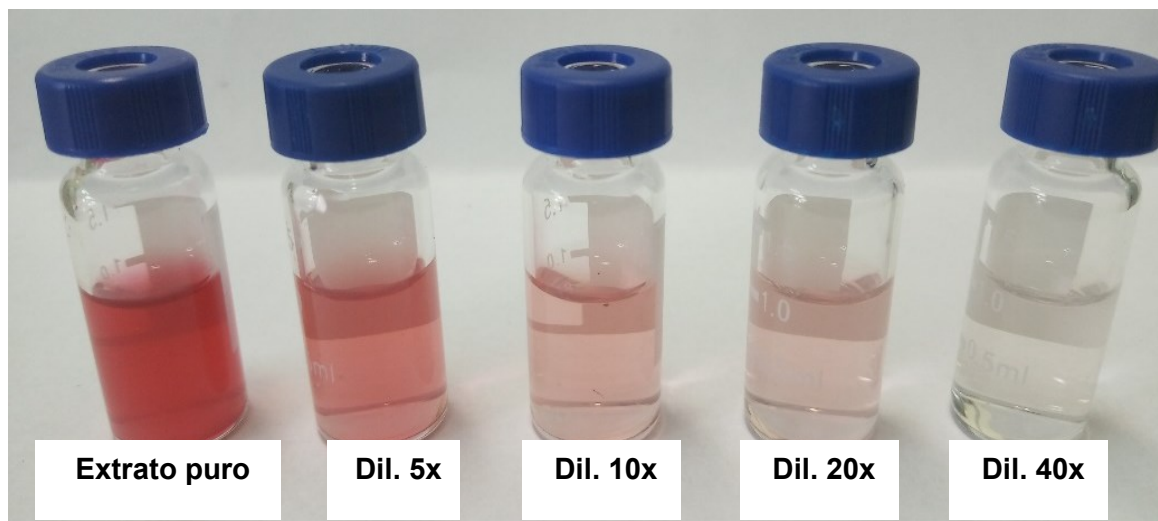
O emprego desta técnica se mostrou bastante adequado para a avaliação qualitativa dos testes de extração, realizou-se o monitoramento de quatro comprimentos de onda simultâneos 512 nm (Pelargonidina), 518 nm (cianidina), 525 nm (malvidina) e 532 nm (petunidina) onde o comprimento de 525 nm foi monitorado. Desta forma, permitiu avaliar a presença das principais antocianinas presentes no extrato de uva. Ao compararmos os cromatogramas referentes aos testes, percebe-se uma diferença na intensidade do sinal que indica a característica de cada método de extração. Assim, os métodos de extração QuEChERS original, acetato e citrato apresentaram menor capacidade de extração de coextrativos, quando comparados ao método QuEChERS citrato acidificado. Este método, extraiu uma quantidade bastante significativa de coextrativos. A avaliação qualitativa por HPLC-UV/vis apresentou-se como uma excelente técnica complementar aos resultados do teste gravimétrico.

4.2.4 Avaliação da influência do fator de diluição e da eficiência de extração das diferentes versões do método QuEChERS avaliadas

Devido à grande quantidade de pigmentos, em especial as antocianinas, a uva é considerada uma amostra complexa (TACO, 2011). Assim, esta matriz requer atenção na etapa de preparo de amostra. Neste trabalho foram avaliadas diferentes versões do método QuEChERS (original, acetato, citrato e citrato acidificado) assistidos pela técnica de “*dilute and shoot*” sem o uso da etapa de limpeza por d-SPE.

Após a obtenção dos extratos, realizou a etapa de diluição (com água ultra purificada) nos fatores de 5, 10, 20 e 40x. A Figura 9 mostra o perfil de diluição do extrato obtido após a realização do método QuEChERS citrato acidificado. A avaliação visual destes extratos mostra que as diluições realizadas com fatores de 5 e 10x ainda possuem uma grande quantidade de coextrativos. Os cuidados com a limpeza do sistema cromatográfico e dos extratos também devem ser maiores no sistema UHPLC, uma vez que suas tubulações e seus filtros da coluna são muito mais suscetíveis ao entupimento que aquelas empregadas em HPLC. Desta forma, não se realizou os testes de avaliação da eficiência de extração com fatores de 5 e 10x de diluição, a fim de preservar o sistema cromatográfico.

Figura 9. Comparação visual entre as diferentes proporções (5, 10, 20 e 40x) de diluição (com água ultrapurificada) do extrato obtido com o método QuEChERS citrato acidificado.

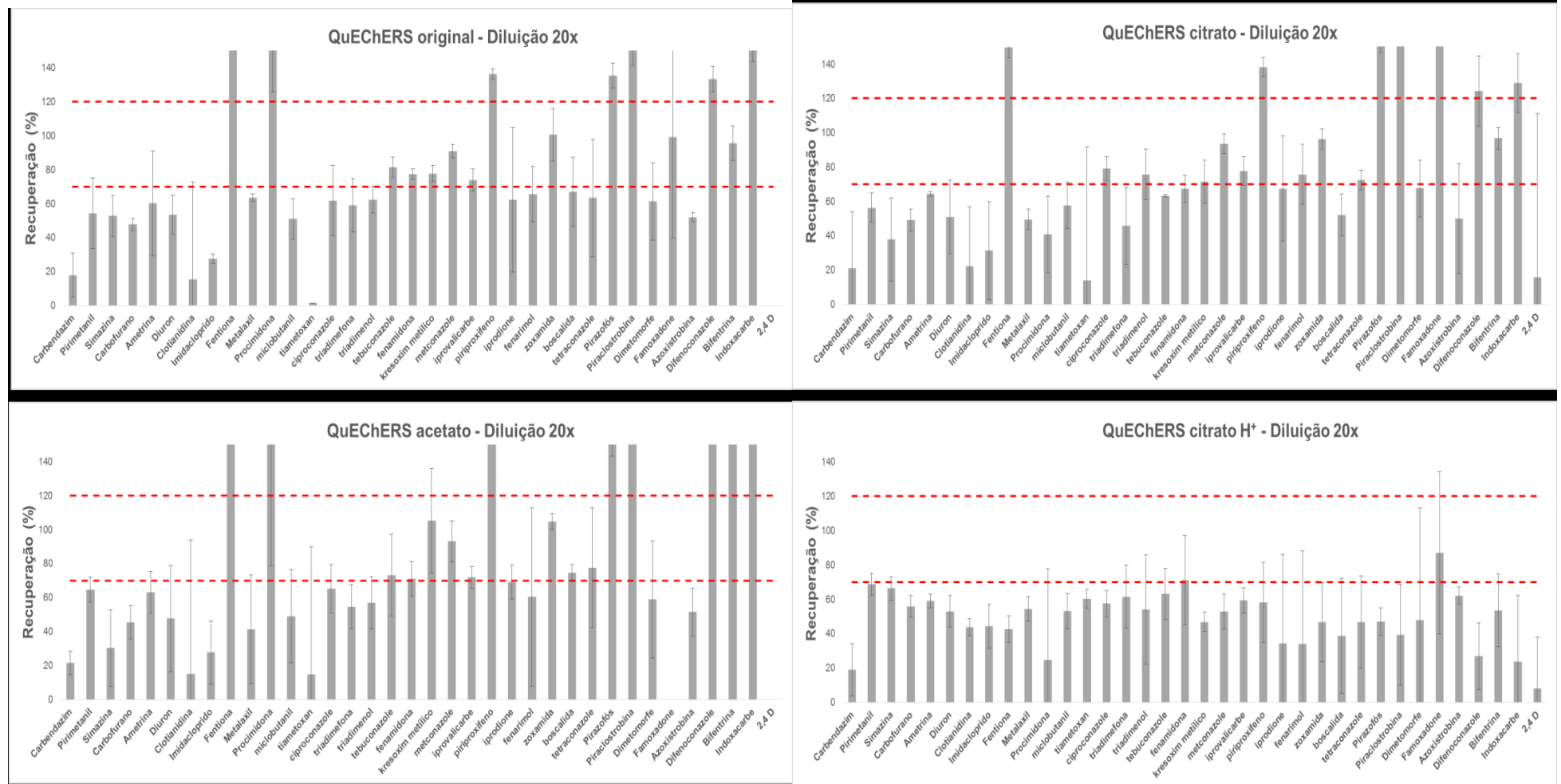


Dil.: diluído

Os testes de avaliação da eficiência de extração seguiram os protocolos descritos no item 3.8. Conforme descrito anteriormente a etapa de limpeza foi substituída pela diluição da amostra com água ultrapurificada. Dois fatores de diluição foram avaliados (20 e 40x). A avaliação da eficiência de extração foi realizada através de ensaios de fortificação na amostra “branco” de uva no nível de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($n=3$) e posterior injeção no sistema UHPLC-MS/MS.

A Figura 10 apresenta os resultados da avaliação da eficiência de extração para todas as versões do método QuEChERS submetidas a diluição do extrato de 20x. Como pode ser observado, em todas as versões avaliadas, dos 36 compostos de interesse poucos apresentaram recuperação% e RSD% dentro da faixa aceitável (70-120%, $\text{RSD} \leq 20\%$). Para os extratos obtidos com o método QuEChERS original (Figura 10 A), somente 7 compostos (tebuconazol, fenamidona, cresoxim-metílico, metconazol, iprovalicarbe, zoxamida e bifentrina) apresentaram resultados aceitáveis. Quando o método QuEChERS acetato (Figura 10 B) foi aplicado, 6 compostos apresentaram resultados aceitáveis (tebuconazol, fenamidona, metconazol, iprovalicarbe, zoxamida e boscalida). O método QuEChERS citrato (Figura 10 C) apresentou o maior número de compostos dentro dos parâmetros aceitáveis (tebuconazol, triadimenol, cresoxim-metílico, metconazol, iprovalicarbe, fenarimol, zoxamida, tetraconazol e bifentrina). Por outro lado, o método QuEChERS citrato acidificado (Figura 10 D), apresentou somente

Figura 10 – Rec (%) e RSD% para os compostos de interesse, após realização das diferentes versões do método QuEChERS (A) original, (B) acetato, (C) citrato e (D) citrato acidificado. Fator de diluição de 20x do extrato e posterior determinação por UHPLC-MS/MS.

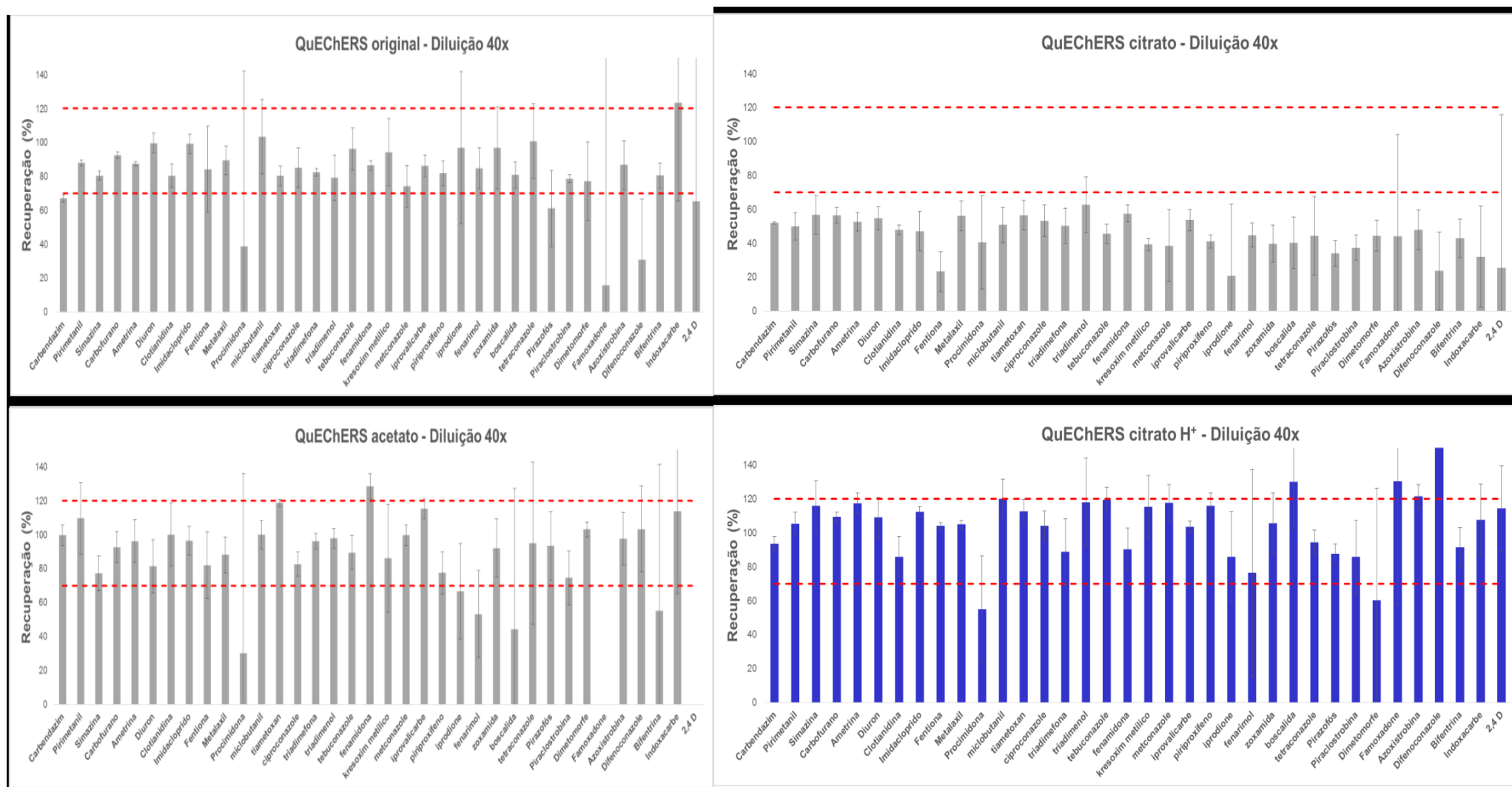


um analito com resultados aceitáveis de recuperação% e RSD%. Esta baixa eficiência de extração, provavelmente está associada a um elevado efeito matriz, devido à presença de uma quantidade considerável de coextrativos no extrato.

Observa-se na Figura 11, que quando aplicou-se o fator de diluição de 40x, há uma melhora significativa no número de compostos com percentuais de recuperação e RSD% para todos os métodos aplicados. A partir da aplicação do método QuEChERS original (Figura 11 A) verifica-se que os compostos, pirazofós, procimidona, iprodiona, famoxadona, difenoconazol, indoxacarbe e 2,4 D apresentaram percentuais de recuperação e/ou RSD% fora dos parâmetros aceitáveis (recuperação 70-120%, $RSD \leq 20\%$). Após a realização do método QuEChERS acetato (Figura 11 B), observa-se que 11 compostos (procimidona, cresoxim-metílico, fenamidona, iprodiona, fenarimol, boscalida, tetraconazol, famoxadona, bifentrina, indocaxacarbe e 2,4 D) apresentaram resultados fora dos parâmetros de aceitação. Para o método QuEChERS citrato, todos os compostos de interesse apresentaram percentuais de recuperação abaixo de 70%, resultados aceitáveis de RSD ($\leq 20\%$), com exceção dos compostos famoxadona, iprodiona e 2,4 D. O método QuEChERS citrato acidificado apresentou as melhores recuperações entre os quatro métodos avaliados. Os compostos procimidona e dimetomorfe apresentaram percentuais de recuperação $< 70\%$. Por outro lado, famoxadona, difenoconazol e boscalida apresentaram percentuais de recuperação $> 120\%$. Dimetomorfe e fenarimol apresentaram $RSD \geq 20\%$. Além disso, somente este método apresentou resultados consistentes para a determinação do herbicida 2,4 D. Este composto não é autorizado para a cultura da uva do Brasil (ANVISA, 2019). Porém, na safra 2018, principalmente no Estado do RS, suspeita-se que a aplicação deste composto na cultura da soja esteja relacionada com os inúmeros problemas de deriva nos cultivos de uva (IBRAVIN, 2018). Portanto, a presença deste composto no escopo do método é muito importante.

A partir dos testes anteriormente apresentados, o método QuEChERS citrato acidificado foi escolhido como procedimento de extração associado a um fator de diluição de 40x por apresentar uma melhor eficiência de extração do composto 2,4-D. O método proposto envolve uma etapa de extração com acetonitrila acidificada com 5% (v/v) de ácido fórmico, seguido da partição com sulfato de magnésio, citrato de sódio tri-básico di-hidratado e citrato de sódio di-básico sesquihidratado. Após o extrato foi diluído 40x, filtrado em filtro de náilon de 0,20 μm (13 mm) e injetado no sistema UHPLC-MS/MS.

Figura 11 - Rec (%) e RSD% para os compostos de interesse, após realização das diferentes versões do método QuEChERS (A) original, (B) acetato, (C) citrato e (D) citrato acidificado. Fator de diluição de 40x do extrato e posterior determinação por UHPLC-MS/MS.



4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVA POR UHPLC-MS/MS

O método proposto neste trabalho foi validado de acordo com o guia SANTE 11813/2017 (SANTE, 2017). Todas as soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em solvente (acetonitrila) acidificadas com 5% (v/v) de ácido fórmico e no extrato da matriz (uva) obtidos a partir das amostras “branco”. Dessa maneira, foi possível avaliar os parâmetros de validação de métodos cromatográficos.

4.4 SELETIVIDADE

O método foi considerado seletivo, uma vez que a injeção do extrato proveniente da amostra “branco” não apresentou picos cromatográficos nos mesmos tempos de retenção dos analitos de interesse. Desta maneira, a amostra “branco” avaliada foi utilizada para o preparo das curvas analíticas e ensaios de exatidão e precisão. Os solventes e reagentes empregados no preparo de amostra também foram avaliados através da realização do procedimento de extração sem amostra (“branco” reagente). Assim, foi assegurado que os mesmos estavam isentos de contaminantes que poderiam interferir na análise.

4.5 FAIXA DE TRABALHO E CURVA ANALÍTICA

A Tabela 11 apresenta os valores do coeficiente de determinação (r^2) das equações das curvas analíticas no extrato da matriz (uva). Para a etapa de quantificação, empregou-se o modelo de regressão linear, adequado para as determinações analíticas em estudo. A linearidade foi obtida em curvas preparadas no extrato da matriz de 10, 25, 50, 100, 200, 500 e 750 $\mu\text{g L}^{-1}$, estas após diluição de 40x correspondem a 0,25; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 12,5 e 18,75 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os compostos avaliados apresentaram coeficiente de determinação (r^2) entre 0,9901 e 0,9999. A faixa de trabalho ficou entre 0,25 e 18,75 $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos os compostos (Tabela 11).

Tabela 11 – Resultados de linearidade (coeficiente de determinação, r^2) obtidos durante a etapa de validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em uva.

analitos	r^2	analitos	r^2
2,4 D	0,9963	metalaxil	0,9969
ametrina	0,9908	metconazol	0,9967
azoxistrobina	0,9961	miclobutanil	0,9950
boscalida	0,9912	piraclostrobina	0,9915
carbofurano	0,9963	pirazofós	0,9913
ciproconazole	0,9963	pirimetanil	0,9930
clotianidina	0,9910	piriproxifeno	0,9956
cresoxim-metílico	0,9927	simazina	0,9922
dimetomorfe	0,9963	tebuconazol	0,9905
diuron	0,9958	tetraconazol	0,9908
fenamidona	0,9933	tiametoxan	0,9901
imidacloprido	0,9999	triadimefona	0,9905
indoxacarbe	0,9913	triadimenol	0,9929
iprovalicarbe	0,9974	zoxamida	0,9916

4.6 EXATIDÃO (RECUPERAÇÃO) E PRECISÃO (REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA)

Na Tabela 12, estão apresentados os valores das médias dos percentuais de recuperação ($n=6$) e RSD_r (repetibilidade) para os agrotóxicos avaliados em amostra “branco” de uva nos níveis de concentração 25, 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ após a diluição de 40x obteve-se as concentrações de 0,625; 1,25; 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. A recuperação foi calculada a partir da curva analítica preparada no extrato da matriz (uva), segundo os critérios de aceitação de recuperação entre 70-120% e $RSD \leq 20\%$, estabelecidos na SANTE, 2017.

O método validado forneceu resultados aceitáveis de recuperação e precisão para a maioria dos compostos estudados em todos os níveis de fortificação. Os compostos fenarimol, fentiona, iprodiona, procimidona, carbendazim, difenoconazol, bifentrina não apresentaram valores de recuperação satisfatórios ($>120\%$ ou $<70\%$). Portanto, estes compostos foram considerados não validados. A Figura 12 apresenta

os dados de precisão intermediária, os resultados dos ensaios de recuperação e RSD para os três níveis de fortificação são mostrados na Tabela 12.

Figura 12- Resultados de precisão intermediária em termos de recuperação e RSD para os níveis de fortificação de 25, 50, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

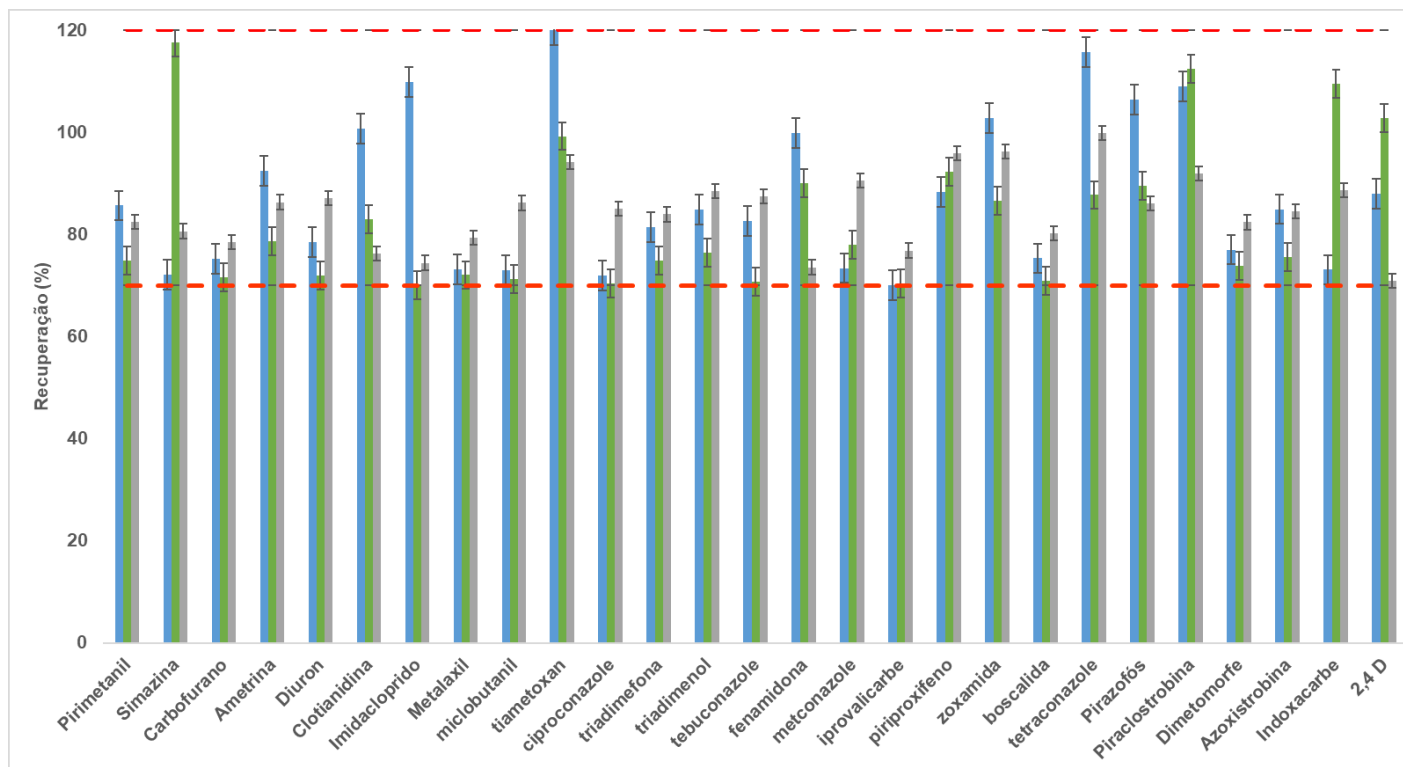


Tabela 12 - Resultados de exatidão e precisão intermediária (recuperação (%) e RSD (%)) obtidos durante a etapa de validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em uva.

Agrotóxicos	níveis de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
	25	50	100	25	50	100
	Recuperação (RSD)%			Precisão intermediária (RSD)%		
2,4 D	103(17)	121(1)	101(17)	88(7)	103(13)	71(15)
ametrina	70(9)	114(15)	89(3)	92(5)	79(9)	86(16)
azoxistrobina	120(13)	96(19)	90(6)	85(10)	76(17)	85(7)
boscalida	70(2)	112(12)	95(20)	75(12)	71(10)	80(17)
carbofurano	70(6)	112(17)	98(12)	75(11)	72(13)	78(17)
ciproconazole	88(15)	120(20)	117(15)	72(8)	70(8)	85(13)
clotianidina	119(19)	119(16)	97(8)	101(18)	83(18)	76(20)
cresoxim-metílico	70(29)	81(63)	97(10)	120(2)	119(11)	120(3)

dimetomorfe	83(6)	118(5)	108(5)	77(11)	74(6)	82(12)
diuron	71(17)	106(12)	100(15)	78(12)	72(19)	87(14)
fenamidona	70(7)	70(11)	74(11)	100(14)	90(18)	74(18)
imidacloprido	70(6)	91(9)	92(15)	110(15)	70(3)	74(13)
indoxacarbe	72(12)	105(7)	118(16)	73(18)	109(6)	89(19)
iprovalicarbe	114(14)	110(13)	102(10)	70(5)	70(4)	77(12)
metalaxil	70(10)	107(15)	101(13)	73(8)	72(15)	79(17)
metconazol	111(5)	110(8)	102(3)	73(12)	78(15)	91(9)
miclobutanil	70(14)	107(18)	102(12)	73(14)	71(19)	86(17)
piraclostrobina	78(5)	102(6)	120(7)	109(15)	112(10)	92(12)
pirazofós	70(13)	88(16)	101(18)	106(4)	90(18)	86(4)
pirimetanil	71(10)	108(16)	99(10)	86(12)	75(15)	82(16)
piriproxifeno	82(14)	82(1)	116(8)	88(12)	92(13)	96(11)
simazina	70(6)	109(20)	102(17)	72(8)	118(6)	81(17)
tebuconazol	90(5)	110(17)	83(6)	83(13)	71(14)	87(7)
tetraconazol	84(19)	114(11)	96(7)	116(13)	88(17)	100(14)
tiametoxan	120(10)	120(12)	115(4)	120(4)	99(6)	94(11)
triadimefona	118(5)	112(18)	99(8)	81(13)	75(6)	84(12)
triadimenol	115(18)	110(13)	97(16)	85(14)	76(10)	89(12)
zoxamida	116(15)	107(20)	103(8)	103(18)	86(14)	96(5)

4.7 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Assim, todos os compostos validados apresentaram LOQ de 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e respectivo LOD de 7 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Estes valores estão abaixo dos LMRs de alguns compostos estabelecidos. Dessa forma, mostra que o método proposto apresenta boa aplicabilidade em rotinas laboratoriais, como também demonstra a habilidade de realizar determinações a níveis traço.

4.8 EFEITO MATRIZ

Neste trabalho, o efeito matriz (EM) foi calculado através da comparação da inclinação das curvas analíticas obtidas no solvente e no extrato da matriz (uva) (Tabela 13). De acordo com Oshita & Jardim (2015) o EM é utilizado para verificar a eficiência de ionização do analito no detector, que pode causar alterações negativas ou positivas

no sinal analítico, devido à supressão iônica ou acréscimo de sinal, respectivamente. Além disso, considera-se que quando essas variações nas respostas do detector estiverem entre -20 a +20% não há efeito matriz. Valores superiores a $\pm 20\%$ podem significar que há presença de coextrativos presentes no extrato “branco” da matriz, influenciando de maneira significativa na análise cromatográfica levando, entre outras coisas a erros de quantificação (BERNARDI et al., 2017).

Tabela 13 - Resultados de efeito matriz (%) obtidos durante a etapa de validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em uva.

analitos	efeito matriz (%)	analitos	efeito matriz (%)
2,4 D	-32	metalaxil	-18
ametrina	-25	metconazol	9
azoxistrobina	8	miclobutanil	-3
boscalida	-2	piraclostrobina	54
carbofurano	-17	pirazofós	32
ciproconazole	-12	pirimetanil	-13
clotianidina	-11	piriproxifeno	288
cresoxim-metílico	24	simazina	-24
dimetomorfe	1	tebuconazol	5
diuron	-7	tetraconazol	5
fenamidona	-43	tiametoxan	-24
imidacloprido	-14	triadimefona	-10
indoxacarbe	362	triadimenol	-9
iprovalicarbe	-16	zoxamida	8

Os valores obtidos de EM foram prioritariamente negativos, ou seja, indicam efeito de supressão do sinal cromatográfico. De acordo com Oshita & Jardim (2015), quando ocorre supressão de sinal cromatográfico é comum assumir que os compostos co-eluídos, oriundos da matriz, competem com os analitos na ionização.

O efeito matriz depende da complexidade das amostras, ou seja, do número e quantidade de substâncias que estão na sua composição e que podem vir a interferir na determinação analítica. O preparo de amostra, principalmente a etapa de limpeza, é essencial para reduzir o efeito matriz pela remoção dos interferentes (Oshita & Jardim (2015). Apesar de a uva ser uma matriz com aproximadamente 81% de água em sua composição, existem também na sua composição pigmentos antociânicos, açúcares e ácidos graxos de cadeia longa. No caso do método QuEChERS, mesmo com a

utilização da etapa de diluição de 40x para minimizar o número de coextrativos do extrato, presume-se que esses compostos estejam relacionados com os valores de EM obtidos. Para a maioria dos compostos validados, o EM ficou entre $\pm 20\%$ como pode ser observado na Tabela 13.

Além do preparo de amostra, algumas alternativas são propostas para a diminuição do efeito matriz como, por exemplo, a construção da curva analítica na própria matriz, diluição da amostra, otimização da separação cromatográfica e alterações nas condições do detector, como o modo de ionização, tipo de fonte ou transições SRM não interferentes (OSHITA & JARDIM, 2015). Dentre essas alternativas, a construção da curva analítica no extrato da matriz e a diluição dos extratos vêm sendo amplamente utilizadas assegurando a atenuação do efeito matriz e garantindo a confiabilidade dos resultados de quantificação (KRUIVE et al., 2008;; BERNARDI et al., 2017).

No presente trabalho, tendo em vista os resultados obtidos de efeito matriz e para atenuar esse problema, as curvas analíticas utilizadas para a quantificação dos compostos foram construídas no extrato da matriz (branco).

4.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO EM AMOSTRAS REAIS

Neste trabalho, 20 amostras de uva tinta foram utilizadas para aplicação do método validado. As amostras foram coletadas pela SEAPI-Fiscalização Vegetal em diferentes cidades da Região Central do Estado do Rio Grande do Sul (Brasil) como, por exemplo, Santa Maria, Ivorá, Silveira Martins, Cacequi, Jaguari etc.

Estas amostras foram analisadas utilizando o procedimento de extração validado neste trabalho. Os resultados estão listados na Tabela 14. Onde 11 amostras apresentaram resíduos de um ou mais analitos na faixa de concentração entre 0,03 a 0,16 mg kg⁻¹. Todas as amostras positivas apresentaram resíduos de um ou mais dos seguintes compostos: pirimetanil, metalaxil, tebuconazol, fenamidona, cresoxim-metílico e dimetomorfe. Estes são fungicidas sistêmicos e seu uso pode estar relacionado com o clima quente e chuvoso no final da safra 2018/2019 na Região Central do RS.

O metalaxil é um fungicida muito utilizado em fruticultura, principalmente no cultivo da uva. Esse composto está entre os mais utilizados no mundo e é importante considerar seus possíveis impactos na saúde e qualidade do solo. Por isso seu controle

é de suma importância para o controle da qualidade de produção. Neste trabalho, este fungicida foi detectado em duas amostras na faixa entre 0,026 mg kg⁻¹; – 0,03 mg kg⁻¹, o LMR para este composto em uva no Brasil é de 1 mg kg⁻¹.

Tabela 14 - Resultados (mg kg⁻¹) obtidos utilizando o método QuEChERS citrato acidificado e UHPLC-MS/MS para amostras de uva positivas para a presença de agrotóxicos.

Amostras	cresoxim- metílico	dimetomorfe	fenamidona	metalaxil	pirimetanil	tebuconazol
A-01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,019	n.d.
A-02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A-03	0,023	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,14
A-04	n.d.	0,06	n.d.	0,026	n.d.	n.d.
A-05	n.d.	0,16	0,03	0,03	0,011	n.d.
A-06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,10	n.d.
A-07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,16	0,06
A-08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,06
A-09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,04
A-10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,04
A-11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. - não detectado

O agrotóxico pirimetanil foi detectado em 3 amostras na faixa entre 0,011 – 0,16 mg kg⁻¹. De acordo com o MAPA esse fungicida é classificado como muito perigoso sendo considerado um produto altamente persistente no meio ambiente (EFSA, 2011; MÜLLER et al., 2012). Por isso seu controle deve ser acompanhado para evitar que sua aplicação irregular gere problemas futuros ao meio ambiente.

O cresoxim metílico, positivo para uma amostra 0,023 mg kg⁻¹. De acordo com a ANVISA os valores de ingestão diária aceitáveis, para que não cause intoxicação nos seres humanos são de 500 µg kg⁻¹; uma vez que todos os seus efeitos a longo prazo ainda não são conhecidos, deve se manter a vigilância para evitar danos ambientais e humanos.

A fenamidona (0,03 mg kg⁻¹) devido a sua elevada contaminação das águas subterrâneas, a União Europeia (EU) proibiu seu uso a partir de fevereiro de 2019.

Os compostos dimetomorfe, fenamidona e tebuconazol foram encontrados nas amostras analisadas. Dentre eles o fungicida tebuconazol foi o que apareceu com maior frequência (5 amostras). Sendo a maior concentração encontrada na amostra A-08 (0,16 mg kg⁻¹). No Brasil, esse composto é autorizado para cultivo de uva e possui um

LMR de 2 mg kg⁻¹. Todos os compostos encontrados nas amostras apresentam concentração < LMR.

Os resultados encontrados para as 20 amostras de uva tinta, demonstraram a existência de resíduos de agrotóxicos na maioria das amostras. Atualmente, o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em uvas exige a necessidade de aumento do escopo para atender futuras necessidades. Os agricultores, muitas vezes, procuram formas imediatas de controle que muitas vezes podem gerar contaminações agudas ou mesmo cruzada entre as plantações. Além disso, os elevados valores de LMR estabelecidos no Brasil autorizam a aplicação de agrotóxicos em grandes quantidades, aumentando a probabilidade de encontrar esses compostos com maior frequência de amostras de uvas *in natura* e também em seus derivados, tais como, vinho, doces. Esses valores encontrados são valores aceitáveis segundo a ANVISA para o consumo diário de uva, não gerando efeitos contra a saúde humana.

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou o uso de diferentes fatores de diluição como alternativa à etapa de limpeza do método QuEChERS para a remoção de coextrativos, especialmente as antocianinas, presentes em extratos de amostras de uva. Um fator de diluição de 40x, apresentou maior eficiência na minimização de coextrativos, com redução satisfatória dos teores de pigmentos sem interferências significativas no sinal dos analitos, tendo em vista que a obtenção de extratos limpos é fundamental para o alcance de resultados confiáveis e para a preservação do sistema cromatográfico UHPLC-MS/MS.

Para isto, foram realizados testes com diferentes versões do método QuEChERS na etapa de preparo das amostras e avaliação dos extratos através de técnicas auxiliares, como testes gravimétricos, análise qualitativa por HPLC-UV/Vis e GC-MS/MS (modo *full scan*), para fins de otimização do método desenvolvido e posterior validação do mesmo empregando UHPLC-MS/MS para a determinação dos agrotóxicos selecionados. As técnicas complementares utilizadas se mostraram adequadas para o monitoramento de testes no desenvolvimento de novos métodos analíticos.

O método QuEChERS citrato acidificado com ácido fórmico 5% (v/v) associado ao fator de diluição de 40x demonstrou ser eficiente para a extração e determinação de resíduos de 28 agrotóxicos em amostras de uva por UHPLC-MS/MS. Os resultados de recuperação obtidos foram satisfatórios, na faixa entre 70 a 120% para 28 dos 36 agrotóxicos inicialmente avaliados, com valores de RSD $\leq 20\%$. O método apresentou valores de LOD de $7,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ e LOQ de $25,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ para todos os compostos avaliados.

As soluções analíticas, utilizadas para a construção das curvas de calibração e consequente obtenção dos resultados de precisão e exatidão, foram preparadas no extrato da matriz, devido ao método ter evidenciado efeito matriz significativo, com a finalidade de descontar as interferências provenientes da matriz e, assim, evitar resultados não satisfatórios.

O método validado foi aplicado para a determinação de resíduos dos 28 agrotóxicos estudados em 20 amostras de uva coletadas na Região Central do RS, dos quais 6 agrotóxicos foram detectados, estando todas as concentrações dentro dos limites estabelecidos pela legislação disponível para a cultura.

O método QuEChERS citrato acidificado, proposto neste trabalho apresenta como vantagens em relação aos métodos tradicionais de extração, ser um procedimento simples e rápido, com um menor número de etapas analíticas, o que diminui a probabilidade de erros e perdas, além de ser relativamente barato e ambientalmente correto, devido ao baixo consumo de solventes orgânicos. Além disso, permite a determinação de compostos como o herbicida 2,4-D.

Portanto, conclui-se que o método desenvolvido é adequado à análise de resíduos de agrotóxicos em uva, podendo ser estendido para outras culturas semelhantes e utilizado em análises de rotina de laboratórios, visto que, todos os parâmetros de validação encontraram-se dentro dos limites exigidos para validação de métodos cromatográficos, atendendo satisfatoriamente os objetivos traçados para este trabalho.

6 DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos gerados durante o desenvolvimento deste trabalho foram armazenados em recipientes adequados e encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química (DQ) da UFSM, o qual é o responsável pela destinação dos resíduos gerados que serão posteriormente tratados por uma empresa terceirizada capacitada nessa área.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Ampliar o escopo de compostos e de matrizes a serem analisados;
- Ampliar o estudo de novas soluções e de outros fatores de diluição;
- Comparar o método proposto com outras técnicas de preparo de amostras;
- Desenvolver método cromatográfico empregando a técnica de cromatografia líquida (LC) para a determinação de resíduos de agrotóxicos em hortaliças não passíveis de análise por UHPLC;
- Avaliar a aplicabilidade do método desenvolvido para diferentes tipos de frutas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J. B. Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glycosides of Cyanidin I. in acidified aqueous solution at 100 °C. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.24, 747 p., 1973.

AFBR- Alimentos Funcionais Brasil. Disponível em:
<https://alimentosfuncionais.wordpress.com/2009/05/07/uva-%E2%80%93-fonte-de-resveratrol/> acesso em 30 de agosto de 2018 às 12:42.

AHAMUDA, D. A.; ZAMUDIO, A. M.; Matrix Effect in Pesticide Analysis by Ultra-Fast Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry **Journal. Braziliam Chemistry Society**, v. 23, 4, 661-669 p., 2012.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY S. J.; STAJNBAHER D.; SCHENCK F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-31, 2003

ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM E.; TAŞDELEN.; ŠTAJNBAHER D. Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis. Crop Protection, Public Health, Environmental Safety, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 439, 2007

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2018; editora Gazeta. Acesso em 15/11/2018.

ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária), Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos>. Acesso em 31 de agosto de 2018 às 15:27.

ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária), Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/AnvisaPortal/Anvisa/Inicio/AgrotoxicoseToxicologia/AssuntosdeInteresse/ProgramadeAnalisedeResiduosdeAgrotoxicosemAlimentos>>. Acesso em 31 de agosto de 2018 às 15:53.

ARIAS, J. L. de O.; ROMBALDI, C.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Alternative sorbents for the dispersive solid phase extraction step in Quick, easy, Cheap, effective, rugged and safe method for extraction of pesticides from rice paddy soils with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1360, p. 66-75, 2014.

ARIAS, J. L. de O.; Schneider, A. J.; Andrade, A. B.; Vieira, A. A.; Gehrke, V. R.; Camargo, S. S.; Gilberto, E.; Evaluation of dilute-and-shoot and solid-phase extraction methods for the determination of Smetolachlor and metolachlor-OA in runoff water samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, 9, 5777, 2017.

BAIRD, C. **Química Ambiental**, 2a ed., Bookman: Porto Alegre, 2002, cap. 6 e 7.

BARBOSA, L. C. A. Os pesticidas, o homem e o meio ambiente. Visosa, UFV, 2004. 215 p.

BARKER, S. A.; LONG, A. R.; SHORT, C. R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 475, n. 2, p. 353-361, 1989.

BECRO-GONZALEZ, E.; GONZALEZ-CASTRO, M. J.; MUNIATEGUI-LORENZO, S., LOPEZ-MAHIA, P., PRADA-RODRIGUEZ, D. Analytical methodology for the determination of organochlorine of pesticides in vegetation. **Journal of Chromatography A**, v. 475, n. 2, p. 353-361.

BERNARDI, G.; RIZZETTI, T. M.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R.; PRESTES, O. D.; Fast Sample Preparation Method Using Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry for Natamycin Determination in Wine Samples, **Journal of the Brazilian Chemical Society** v. 28, n. 5, 831-837p., 2017.

BORGES, K. B; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1ª edição Rio de Janeiro: LTC, 2015. 263 p.

BRASIL. Decreto 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989. Brasília, DF. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm acesso em 30 de agosto de 2018 às 16:10.

BRIGGS, SHIRLEY A. 1992. Basic guide to pesticides: Their characteristics and hazards. Hemisphere Publishing Corporation. Philadelphia, PA.

CABRAS P.; ANGIONI, A. Pesticide Residues in Grapes, Wine, and Their Processing Products. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 967-973, 2000.

CABRERA, L. da C.; MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Extração em fase sólida dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 227-240, 2012.

CAJKA, T.; SANDY, C.; BACHANOVA, V.; DRABOVA, L.; KALACHOVA, K.; PULKRABOVA, J.; HAJLSLOVA, J. Streamlining sample preparation and gas chromatography-tandem mass spectrometry analysis of multiple pesticide residues in tea. **Analytica Chimica Acta**, v. 743, p. 51-60, 2012.

CAMPONE, L.; CELANO, R.; PICCINELLI, A. L.; PAGANO, I.; CICERO, N.; SANZO, R. S.; CARABETTA, S; RUSSO, M.; RASTRELLI, L., Ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction for fast and accurate analysis of chloramphenicol in honey, **Food Research International**, V.115, 2019.

CARNEIRO, F. F. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde, 2015. Disponível em: http://www.abrasco.org.br/dossieagrototoxicos/wp_115_content/uploads/2013/10/DossieAbrasco_2015_web.pdf. Acessado em 30 de agosto de 2018 às 16:23.

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

CODEX ALIMENTARIUS, Pesticide Residues em Food and Feed. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/commodities/details.html?id=113> acesso em 30 de agosto de 2018 às 15: 53.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-uva> acesso em 20 de agosto de 2018 às 10:40.

ČUŠ, F.; ČESNIK H. B.; BOLTA Š. V.; GREGORČIČ A. Pesticide residues and microbiological quality of bottled wines. **Food Control**, v. 21, p.150–154, 2010.

Dahlin, J. L.; Michael, P.; John, L.; Petrides, A. K.; A Rapid Dilute-and-Shoot UPLC-MS/MS Assay to Simultaneously Measure 37 Drugs and Related Metabolites in Human Urine for Use in Clinical Pain Management. **The Journal of Applied Laboratory Medicine**, v. 3, n.4, 2018.

DETONI, A. M.; CLEMENTE, E.; BRAGA, G. C.; HERZOG, N. F. M. Uva Niagara Rosada cultivada no sistema orgânico e armazenada em diferentes temperaturas. *Ciência Tecnologia Alimentos*, Campinas, v. 25, n.3, p. 546-552, 2005.

DI CORCIA, D.; D'URSO, F.; GERACE, E.; SALOMONE, A.; VINCENTI, M. Simultaneous Determination in Hair of Multiclass Drugs of Abuse (Including THC) by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 899, p. 154–159, 2012.

DONATO, F. F.; MARTINS, M. L. MUNARETTO, J. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R.; **Journal of the Brazilian Chemical Society**, V. 26, N. 10, 2077-2087, 2015

DZUMAN, Z., ZACHARIASOVA, M., VEPRIKOVA, Z., GODULA, M., & HAJŠLOVA, J. Multianalyte high performance liquid chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry method for control of pesticide residues, mycotoxins, and pyrrolizidine alkaloids. **Analytica Chimica Acta**, 863 p. 29–40, 2015.

ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S.; TSIPI, D. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216 p. 5856–5867, 2009.

EFSA. European Food Safety Authority. Review of the maximum residue levels (MRLs) for pyrimethanil according to Article 12 of Regulation (EC) N° 396/2005. *EFSA Journal*, v. 9, n. 11, p. 1-65, 2011.

EU – European commission <http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/home.asp?LabID=500&Lang=EN> acesso em 07/10/2018.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), 2005.

FAOSTAT – Glossary search. Disponível em: <[http:// faostat.fao.org/ site/379 /Desktop Default.aspx?PageID=379](http://faostat.fao.org/site/379/DesktopDefault.aspx?PageID=379)> Acesso em: 26 dez.2014.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Summary of world food and agriculture statistics. Roma, 2010. Disponível em: <[://typo3.fao.org/fileadmin/templates/ess/ess_test_folder/documents/Summary_of_agricultural_statistics/Summary_of_world_and_agricultural_statistics_rev11oct2010_.pdf](http://typo3.fao.org/fileadmin/templates/ess/ess_test_folder/documents/Summary_of_agricultural_statistics/Summary_of_world_and_agricultural_statistics_rev11oct2010_.pdf)>

FENOLL, J.; HELLIN, P.; Gonzalez, A.; FLORES, P. Determination of pesticides residues in lettuce by chromatography with electron-capture detection. *Journal of AOAC International*, v. 90, n. 6, 2007.

FERMAM, R. K. S.; ANTUNES, A. M. de S. Uso de defensivos agrícolas, Limites Máximos de Resíduos e impacto no comercio internacional: estudo de caso. *Economia e Agronegócio*, v. 7, p. 197-214, 2009.

FU, W.; MAGNÜSDÓTTIR, M.; BRYNJÓLFSON, S.; PALSSON, B.; PAGLIA, G. UHPLC-UV-MS analysis for quantification and identification of major carotenoid and chlorophyll species in algae. ***Analytical and bioanalytical Chemistry***, v. 404, p. 3145-3154, 2012.

FLAMINI, R.; TRALDI, P. Grape and wine pesticides, In: *Mass Spectrometry in Grape and Wine Chemistry*. 2010.

GIOVANNINI, E. Manual de viticultura. Porto Alegre: Bookman, 2014, 253 p.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, R. M.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Multiresidue determination of 11 new fungicides in grapes and wines by liquid-liquid extraction/clean-up and programmable temperature vaporization injection with analyte protectants/gas chromatography/ion trap mass spectrometry. ***Journal of Chromatography A***, v.1216, p. 6033–6042, 2009.

GUERRA, C. C. et.al. Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos. In: EMBRAPA, Bento Gonçalves, 2009. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/documentos/doc048.pdf>. Acesso em: 29 de janeiro de 2018.

HAN, L.; MATARRITA, J.; SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTTAY, S. J. Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix co-extractives in the analysis of pesticides residue and environmental contaminants in foods. ***Journal of Chromatography A***, v. 1449, p. 17-29, 2016.

HANOT, V., GOSCINNY, S., DERIDDER, M. A simple multi-residue method for the determination of pesticides in fruits and vegetables using a methanolic extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Optimization and extension of scope. ***Journal of Chromatography A***, v. 1384, p. 53-66, 2015.

HENNION, M. C. J. Graphitized carbons for solid-phase extraction. ***Journal of Chromatography A***, v. 885, p. 73-95, 2000.

HERNÁNDEZ, F.; CERVERA, M. I.; PORTOLÉS, T.; BELTRÁN, J.; PITARCH, E., The role of GC-MS/MS with triple quadrupole in pesticide residue analysis in food and the environment, **Anal. Methods**, v 5, 5875-5894, 2013.

HILTON, B.W.; LIN, R.I.; TOPOR, M.G., et al. Processed anthocyanin pigment extracts, Patente Americana 4.320.009, 1982.

HOU, X.; ZHENG, X.; ZHANG, C.; MA, X.; LING, Q.; ZHAO, L. Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of a floating organic droplet followed by gas chromatography for the determination of eight pyrethroid pesticides in tea samples. **Journal of Chromatography B**, v. 969, p. 123–127, 2014.

HONG, J. A. K.; OKAMOTO, M.; KANETSUKI, K.; MAKINO, T.; HAMADA, N. Fundamental study of a novel membrane filtration cleanup method for pesticide analysis in agricultural products. **Food Control**, n. 64, p. 401-407, 2016.

IBRAVIN – Instituto Brasileiro do Vinho, Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/dados-estatisticos>>. Acesso em 28 de agosto de 2018 de 2017 às 14:31.

IBRAVIN – Instituto Brasileiro do Vinho, Disponível em: <http://www.ibravin.org.br/Regioes-Produtoras>. Acesso em 29 de agosto de 2018 às 13:31.

INETI – Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial, Processo de preparação de concentrados da baga de sabugueiro e outras matérias primas vegetais para utilização como corante em produtos alimentares, cosméticos e farmacêuticos, Patente Portuguesa 98517B, 1994.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE- 008, ver. 7, 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/Tabela/listabl.asp?c=1613&z=t&o=11>>. Acessado em: 20 de agosto de 2018

KEMMERICH, M.; RIZZETTI, T.M.; MARTINS, M.L.; PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. Optimization by Central Composite Design of a Modified QuEChERS Method for Extraction of Pesticide Multiresidue in Sweet Pepper and Analysis by Ultra-High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**. v. 8, p.728–739, 2015.

KRUBE, A.; KUNNAPAS, A.; HERODES, K.; LEITO, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, p. 58-66, 2008.

KWON, H.; LEHOTAY, S.J. Geis-Asteggiane L. Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography–mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops. **Journal of Chromatography A**, v. 1270, p. 235–245, 2012.

LAI, J.F.; FRANKE, A. A. Analysis of circulating lipid-phase micronutrients in humans by HPLC: Review and overview of new developments, **Journal of Chromatography B**, v. 931, p. 23–41, 2013.

LAZZAROTTO, J. J., FIORAVANÇO, J. C. Tendências e sazonalidades nas exportações brasileiras de uva de mesa. *Informações econômicas*, São Paulo, v. 43, n. 1, jan/fev, 2013. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftpiea/publicacoes/ie/2013/tec4-0113.pdf> Acesso em: 30 de agosto de 2018.

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 AOAC International**, v. 88, p. 615-629, 2005.

LEHOTAY S. J., SON K. A., KWON H., KOESUKWIWAT U., FU W., MASTOVSKA K., HOH E., LEEPIPATPIBOON N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 2548-2560, jan. 2010.

LEHOTAY S. J., QuEChERS sample preparation approach for mass spectrometric Analysis of pesticide residues in Foods, in *Mass Spectrometry in Food Safety*, v. 747 of the series *Methods in Molecular Biology*, p. 65-91, 2011.

LIGOR T, AMANN A, BUSZEWSKI B. Evaluation of septa quality for automatic SPME-GC-MS trace analysis. **J Chromatogr Sci**, 50(1), p.10-4, 2012.

LI, Y.; TANG, HONGXIA; BLACK, K. C.; DONG, M.; WANG, W.; SONG, W., Determination of fluazinam in vegetables and fruits using a modified QuEChERS method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, **Food Anal. Methods**, 10:1881–1887, 2017.

LOZOWICKA, B.; Jankowska, M., Influence of QuEChERS modifications on recovery and matrix effect during the multi-residue pesticide analysis in soil by GC/MS/MS and GC/ECD/NPD, **Environ Sci Pollut Res** v. 24, p. 7124–7138, 2017.

MALACHOVA, A., SULYOK, M., BELTRAN, E., BERTHILLER, F., & KRŠKA, R. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. **Journal of Chromatography A**, 1362 p. 145–156, 2014.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. *Scientia Chromatographica*, v. 4, p. 197-207, 2012.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/uva>>. Instrução - NORMATIVA, N° 11, 07/05/2014. Acesso em: 28/11/2018.

MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ, G., NIETO-GARCÍA, A. J., ROMERO-GONZÁLEZ, R., FRENICH, A. G. Application of QuEChERS based method for the determination of pesticides in nutraceutical products (*Camellia sinensis*) by liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 177, p. 182–190, 2015.

MAZZA G, BROUILLARD, R. The mechanism of copigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. **Phytochemistry**, 29,1097,1995.

MELLO, L. M. R., MACHADO, E C. A. E. Área cultivada com videiras no Rio Grande do Sul: 2008-2012. Documentos / Embrapa Uva e Vinho, Documento 87, 49 p. 2013. Acesso em: 30 de agosto de 2018.

MILLS, P. A.; ONLEY, J. H.; GUITER, R. A. Rapid method for Chlorinated pesticide residues in non-fatty foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemist**, v. 5, p. 430-439, 1963.

MORRISON, S. A.; SIEVE, K. K., RATAJCZAK, R. E., BRINGOLF, R. B., R. B., BELDEN, J. B. Simultaneous extraction and cleanup of high-lipid organs fro, white sturgeon for multiple legacy and emerging organic contaminants using QuEChERS sample preparation. **Talanta**, v. 146, p. 16-22, 2016.

MÜLLER, R.; SEELAND, A.; JAGODZINSKI, L.S.; DIOGO, J. B.; NOWAK, C.; OEHLMANN, J. Simulated climate change conditions unveil the toxic potential of the fungicide pyrimethanil on the midge *Chironomus riparius*: a multigeneration experiment. **Ecology and Evolution**, v. 2, n.1, p. 196–210, 2012.

MUÑOZ, N. C.; FLORIANO, L.; SOUZA, M. P.; BANDEIRA, N. M. G.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R. Determination of pesticide residues in goldenberry by modified QuEChERS method and ultra-high-efficiency liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry. **Analytical Methods**, 2016.

OSHITA, D.; JARDIM, I.C.S. F. Comparação de Métodos por Cromatografia Líquida na Determinação de Multirresíduos de Agrotóxicos em Morangos. **QUÍMICA NOVA**, v. 38, p. 1273-1281, 2015.

OELLIG, C.; SCHWACK, W., Planar solid phase extraction clean-up for pesticide residue analysis in tea by liquid chromatography-mass spectrometry, **J. Chromatogr. A** 1260, 42-53p., 2012

PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/AnvisaPortal/Anvisa/Inicio/AgrotoxicoseToxicologia/Assuntosde Interesse/ProgramadeAnalisedeResiduosde AgrotoxicosemAlimentos>>. Acesso em 31 de agosto de 2018 às 15:53.

PASCUAL, J.A.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T.; MORENO, J.L.; ROS, M. Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation process. **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, p.1877-1883, 2000.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, p. 987-995, 2009.

PIGNATI, W.A.; LIMA, F. A. N.; LARA, S. S.; LEÃO, L. H; Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde Ciência & Saúde Coletiva, 22, 3281-3293, 2017.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados a espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.

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.

PU, C.; LIN, S.; CHUANG, S.; SHYU, T., Modified QuEChERS method for 24 plant growth regulators in grapes using LC-MS/MS, **Journal of Food and Drug Analysis**, V. 26, n. 2, 637-648, 2017.

RAHMAN, M.M.; ABD EL-ATY A.M., SHIM, J.H. Matrix enhancement effect: A blessing or a curse for gas chromatography? A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 801, p. 14–21, 2013.

RAMBLA-ALEGRE, M.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **Journal of Chromatography A**, v. 1232, p. 101-109, 2012.

RAVELO-PÉREZ, L.M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; BORGES-MIQUELA, T. M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M.Á. Solid-phase microextraction and sample stacking micellar electrokinetic chromatography for the analysis of pesticide residues in red wines. **Food Chemistry**, v. 111, p. 764–770, 2008.

REJCZAK, T., TUZIMSKI, T. Recent Trends in Sample Preparation and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for Pesticide Residue Analysis in Food and Related Matrixes. **Journal of AOAC International**, v. 98, p. 1143-62, 2015.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIZZON, L. A.; MIELE, A.; MENEGUZZO, J. Avaliação da uva cv. Isabel para a elaboração de vinho tinto. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.20. n.1, p. 115-121, 2000.

SANTE EUROPEAN COMMISSION. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. Documento nº SANTE/11813/2017, 2017.

SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J., Multi-class, multi-residue, analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography tandem mass spectrometry. **Analytica chimica acta** 758, p. 80-92, 2013.

SCHIPPER, P. N.; VISSERS, M. J.; VAN L.; Pesticides in groundwater and drinking water wells: overview of the situation in the Netherlands, **Water Sci Technol** v.57 n. 8 1277-1286, 2008.

SILVA, L. P. DA; MADUREIRA, F; VARGAS, E. A.; FARIA, A. F.; AUGUSTI, R., Development and validation of a multianalyte method for quantification of mycotoxins and pesticides in rice using a simple dilute and shoot procedure and UHPLC-MS/MS, **Food Chemistry**, V. 270, 420-427p., 2019.

SOARES, C. E. S.; Neves, A. A; Queiroz, M. E. L. R.; Oliveira, A. F.; Costa, A. I. G.; Assisa, R. C.; Determination of Pesticides in Soil Using a Hyphenated Extraction Technique **J. Braz. Chem. Soc.**, V. 26, N. 9, 1790-1797, 2015.

SOUSA, F. A.; COSTA, A. I. G.; QUEIROZ, M. E. L. R, TEÓFILO, R. F., PINHO, G. P., NEVES, A. N. Influence of pH and Matrix Components in the Chromatographic Response of Pesticides Residues Analysis. **Chromatographia**, v. 76, p. 67-73, 2013.

STACHNIUK, A.; FORNAL, E., Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food, **Food Anal. Methods**, v. 9, n. 6 1654 p., 2016.

TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos http://www.cfn.org.br/wp-content/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf. Acesso em 07/10/2018.

WALORCZYK, S.; DROŹDŹYŃSKI, D.; BOGUSŁAW, G. Multiresidue determination of 160 pesticides in wines employing mixed-mode dispersive-solid phase extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 85, p. 1856–1870, 2011.

WALORCZYK, S.; DROŹDŹYŃSKI, D.; KIERZEK, R. Determination of pesticide residues in samples of green minor crops by gas chromatography and ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem quadrupole mass spectrometry. **Talanta**, v. 132, p. 197–204, 2015.

WANG, J.; CHOW, W.; WONG, W. J.; LEUNG, D.; CHANG, J.; LI, M., Non-target data acquisition for target analysis (nDATA) of 845 pesticide residues in fruits and vegetables using UHPLC/ESI Q-Orbitrap, **Anal Bioanal Chem**, 01-11p., 2019.

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

WHO – World Health statistic <
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272596/9789241565585-eng.pdf?ua=1>>
acesso em 10/09/2018.

UNIÃO BRASILEIRA DE VITINICULTURA - UVIBRA. Dados estatísticos 2002-2011. Disponível em: <http://www.uvibra.com.br/pdf/producao98_03.pdf>. Acesso em: 20 de agosto de 2018.

YUSA, V.; MILLET, M.; COSCOLLA, C.; ROCA, M. Analytical methods for human biomonitoring of pesticides. **A Review Analytica Chimica Acta**, v. 891, p. 15-31, 2015.

ZHANG, L.; LIU, S.; CUI, X.; PAN, C.; ZHANG, A.; CHEN, F. A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, p. 900–925, 2012.

ZHANG, X.; SONG, Y.; JIA, Q.; ZHANG, LI.; ZHANG, W.; MU, P.; JIA, Y.; QIAN, Y.; QIU, J., Simultaneous determination of 58 pesticides and relevant metabolites in eggs with a multi-functional filter by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, 2019.

ZHANG Y.; LEE, H.K. Application of ultrasound-assisted emulsification microextraction based on applying low-density organic solvent for the determination of organochlorine pesticides in water samples. **Journal of Chromatography A**, v.1252, p. 67-73, 2012b.

ZHANG, K.; WONG, J.W.; HAYWARD, D.G.; SHELADIA, P.; KRYNITSKY, A.J.; SCHENCK, F.J.; WEBSTER, M.G.; AMMANN, J.A.; EBELER, S.E. Multiresidue Pesticide Analysis of Wines by Dispersive Solid-Phase Extraction and Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57 4019–4029, 2009.

ZHAO, Z.; YANG, X.; ZHAO, X.; BAI, B.; YAO, C.; LIU, N.; WANG, J.; ZHOU, C. Vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of major *Aspergillus* and *Penicillium* mycotoxins in rice wine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Control**, v. 73 p. 862-868, 2017.

ZROSTLIKOVAJITKA, H. J.; POUSTKA J.; BEGANY, P. Alternative calibration approaches to compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography–electrospray ionisation tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in plant materials. **Journal of Chromatography A**, v. 973, p.13–26, 2002.