

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

Natalia Cadavid Muñoz

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FISALIS  
(*PHYSALIS PERUVIANA* L.) EMPREGANDO  
QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS**

Santa Maria, RS  
2016

**Natalia Cadavid Muñoz**

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FISALIS (*PHYSALIS PERUVIANA* L.) EMPREGANDO QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS**

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

Orientador: Professor Dr. Renato Zanella

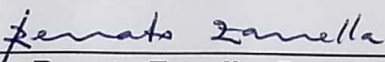
Santa Maria, RS, Brasil  
2016

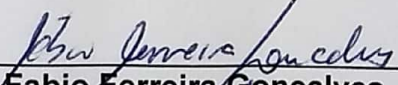
Natalia Cadavid Muñoz

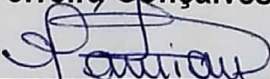
**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FISALIS  
(*PHYSALIS PERUAVIANA* L.) EMPREGANDO QuEChERS MODIFICADO E  
UHPLC-MS/MS**

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

**Aprovado em 29 de fevereiro de 2016:**

  
\_\_\_\_\_  
**Renato Zanella, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
**Fabio Ferreira Gonçalves, Dr. (FURG)**

  
\_\_\_\_\_  
**Osmar Damian Prestes, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2016

“Se ficar difícil, enfrente.  
E quando ficar fácil, agradeça.  
Se a tristeza rondar, alegre-se.  
E quando ficar alegre, contagie.  
Se o caminho for longo, persista.  
E quando chegar, comemore.  
Se achar que acabou, recomece.  
E quando recomeçar, acredite.”

(Autor desconhecido)

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella, agradeço pela orientação, pelo apoio e por estar sempre disposto a ajudar, proporcionando as condições para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP).

Ao Prof. Dr. Osmar Damian Prestes, pela co-orientação, dedicação e comprometimento durante a execução deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Martha Bohrer Adaime, muito obrigada pela oportunidade de fazer parte deste grupo e pela confiança recebida.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Renato Zanella, Prof. Dr. Osmar Damian Prestes e o Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves pela disponibilidade e por suas valiosas sugestões, as quais ajudaram a engrandecer este trabalho.

A todos os colegas do LARP, os quais tive o prazer de conhecer e conviver nestes dois anos. Agradeço pelas experiências e ideias compartilhadas, e também pelas conversas que foram fundamentais nos momentos de descontração. Agradeço de forma especial à colega Tiele pela ajuda no equipamento e no decorrer do desenvolvimento deste trabalho. À Lucila pela ajuda nas incontáveis mudanças de apartamento e pelos seus conselhos. Obrigada a vocês!

Agradeço de forma especial à colega e amiga Luana Floriano, pela amizade, pela convivência, pela valiosa ajuda, por ser essa pessoa que me incentivou e me apoiou até os meus últimos dias no Brasil. Sempre me lembrarei de tua frase “quem acredita sempre alcança”, que virou em um lema para mim! À colega Maiara de Souza, não tenho palavras para agradecer tudo o que fez por mim. Você se tornou uma grande amiga, vou sentir saudade de nossa “galerinha do terror”. Ao Nelson Bandeira, pela amizade, por todas as importantes sugestões que você fez para este trabalho e por estar sempre disponível para me ajudar, inclusive nas férias. À Mariele Mazuim, pela amizade, conselhos, por acalmar-me nos momentos mais angustiantes e também pela parceria nas horas alegres. À Danieli Bandeira por ser essa pessoa especial, que me transmitiu calma e a certeza de que tudo ia dar certo. À Debora Orso, que mesmo estando longe torcia por mim e aconselhava nos momentos de incerteza. Adoro todos vocês e desejo muito sucesso em suas vidas!! Aguardo por vocês na Colômbia.

À professora Grazielle dos Santos, pela amizade, paciência e ensinamentos transmitidos, os quais foram essenciais para o aprendizado do idioma.

Aos meus pais Gilberto e Rosana, a parte mais importante da minha vida e fonte de apoio incondicional. Apesar de distantes vocês estiveram sempre presentes, sem vocês esta conquista não teria sido possível. Muito obrigada, amo vocês!!!

Aos meus irmãos Patricia, Juan Carlos e Gilberto, agradeço por todo o carinho, apoio e torcer por mim na distância. Obrigada por tudo, amo muito vocês.

Ao Saul, pelo carinho, compreensão e apoio em todos os momentos que passei durante esta etapa. Obrigada por sempre acreditar em mim!

Aos meus amigos colombianos, pela paciência e compreensão nestes dois anos de ausência. Em especial a Julian pelos conselhos e incentivo para não desistir.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ), da UFSM, pela contribuição na minha formação acadêmica.

Ao Ademir e Valéria, funcionários do PPGQ, pela gentileza, simpatia e atenção no atendimento de suas tarefas.

A todos que de forma direta ou indireta, contribuíram com este trabalho.

À CAPES pelo auxílio financeiro fornecido.

Ao Programa de Alianzas para la Educación y la Capacitación OEA-GCUB 2013, pela oportunidade concedida e pelo privilégio de fazer parte deste intercâmbio cultural e científico.

A Deus pela força e proteção, guiando-me nos momentos mais difíceis e mostrando-me que quem acredita sempre alcança!!

## RESUMO

### **DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FISALIS (*PHYSALIS PERUVIANA* L.) EMPREGANDO QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS**

Autora: Natalia Cadavid Muñoz  
Orientador: Renato Zanella

O trabalho foi desenvolvido e validado um método multirresíduo rápido e eficaz para a determinação de 42 agrotóxicos em fisalis. O método QuEChERS modificado foi utilizado para o preparo de amostra seguido pela determinação por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS), com modo de ionização por eletronebulização empregando analisador triplo quadrupolo. Os resultados de validação foram satisfatórios, uma vez que o método apresentou recuperações entre 70 e 114%, com desvio padrão relativo (RSD) <20% para amostras branco fortificadas de 5 a 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Os limites de detecção e de quantificação do método foram de 1,5 e 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. O efeito matriz variou de -32 a 218% e foi corrigido utilizando curva analítica na matriz. A linearidade do método foi estabelecida de 2,5 a 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , com  $r^2 \geq 0.99$ . O método proposto combina as vantagens de uma etapa de preparo de amostra simples e rápida, aliado à elevada seletividade e sensibilidade do sistema UHPLC-MS/MS empregando monitoramento de reações selecionadas. O método foi aplicado com sucesso em amostras reais, provando ser uma alternativa eficiente para a análise de rotina. Cinco resíduos de pesticidas foram encontrados nas amostras avaliadas.

Palavras chave: agrotóxicos, fisalis, alimentos, QuEChERS, UHPLC-MS/MS

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN GOLDENBERRY (*PHYSALIS PERUVIANA* L.) BY MODIFIED QuEChERS METHOD AND UHPLC-MS/MS

Author: Natalia Cadavid Muñoz  
Advisor: Renato Zanella

In this study a fast and effective multiresidue method for the determination of 42 pesticides in goldenberry was developed and validated. A modified QuEChERS method was established for sample preparation followed by ultra-high-performance liquid chromatographic–tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) determination with electrospray ionization in a triple quadrupole system. Validation results were satisfactory, since the proposed method presented recoveries between 70 and 114% with relative standard deviations (RSD) <20% for blank samples spiked from 5 to 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . The method limits of detection and of quantification were 1.5 and 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively. Matrix effect ranged from -32 to 218% and was compensated using matrix matched calibration. Method linearity was established from 2.5 to 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  with  $r^2 \geq 0.99$ . The proposed method combines the advantages of a simple and fast sample preparation step by a modified QuEChERS method with the high selectivity and sensitivity of the UHPLC-MS/MS system using selected reaction monitoring. Method was successfully applied to real samples, proving to be an efficient alternative for routine analysis. Residues of five pesticides were found in the samples evaluated.

Keywords: pesticides, goldenberry, food, QuEChERS, UHPLC-MS/MS



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fisalis ( <i>Physalis peruviana</i> L.).....	16
Figura 2	Exportações de fisalis na Colômbia no período de 2010 a 2012.....	19
Figura 3	Esquema da fonte de ionização por eletronebulização (ESI).....	25
Figura 4	Esquema de um analisador de massas tipo triplo quadrupolo (TQ)...	26
Figura 5	Fluxograma dos métodos QuEChERS original, acetato e citrato.....	31
Figura 6	Representação do teste gravimétrico utilizado para a otimização da etapa de limpeza.....	43
Figura 7	Cromatograma de um nível de fortificação de 20 µg L <sup>-1</sup> na amostra de fisalis, obtido por UHPLC-MS/MS.....	48
Figura 8	Representação da etapa de limpeza: 1) extrato com PSA e MgSO <sub>4</sub> ; 2) extrato com PSA, MgSO <sub>4</sub> , C18 e GCB.....	51
Figura 9	Resultados de recuperação obtidos nos testes de extração T1, T2 e T3.....	51
Figura 10	Resultados de porcentagem de coextrativos obtidos nos testes gravimétricos, onde G1: sem etapa de limpeza, G2: etapa de limpeza sem C18 e G3: etapa de limpeza com 25 mg/4mL).....	52
Figura 11	Resultados de recuperação obtidos nos testes de limpeza com diferentes quantidades do sorvente C18 (A, B e C).....	53
Figura 12	Representação do método QuEChERS citrato modificado proposto para a extração de agrotóxicos em fisalis.....	54
Figura 13	Representação do efeito matriz para os todos compostos avaliados em fisalis por UHPLC-MS/MS.....	58
Figura 14	Resultados de exatidão em termos de recuperação, e RSD para os níveis de fortificação 5, 10 e 25 µg kg <sup>-1</sup> .....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição de nutrientes e minerais em 100 g de fisalis.....	17
Tabela 2	LMRs de agrotóxicos estabelecidos para tomate pela União Europeia, <i>Codex Alimentarius</i> e pelos órgãos colombianos, MPS e MADR.....	23
Tabela 3	Evolução dos métodos de preparo de amostra para análise multirresíduo em alimentos.....	28
Tabela 4	Diferentes metodologias empregadas na determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate e fisalis.....	32
Tabela 5	Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos.....	34
Tabela 6	Informações dos compostos utilizados neste trabalho, com suas respectivas classes, grupo químico, fórmula molecular, pKa e logK <sub>ow</sub> .....	38
Tabela 7	Gradiente da fase móvel utilizado no sistema UHPLC-MS/MS para determinação de agrotóxicos em fisalis.....	41
Tabela 8	Condições empregadas no sistema cromatográfico UHPLC-MS/MS para a validação do método proposto.....	47
Tabela 9	Agrotóxicos analisados com seus respectivos tempos de retenção (t <sub>R</sub> ), íons precursores, íons produtos e energia de colisão (EC) das transições monitoradas.....	49
Tabela 10	Coeficientes de determinação para curvas preparadas em solvente e extrato branco da matriz e efeito matriz obtidos para os compostos em estudo.....	56
Tabela 11	Resultados de recuperação (R) e RSD para os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária realizados em níveis de concentração entre 5, 10 e 25 µg kg <sup>-1</sup> .....	61
Tabela 12	Resultados da análise das amostras de fisalis empregando o método QuEChERS.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

C18 – sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano;

CI – ionização química, do inglês *chemical ionization*;

d-SPE – extração em fase sólida dispersiva, do inglês *dispersive solid phase extraction*;

ESI - ionização por eletronebulização, do inglês *electrospray ionization*;

EU – União Européia;

FAO – Organização das Nações Unidas para a alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*;

GCB – carvão grafitizado, do inglês *graphitized carbon black*;

GC-MS – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês *gas chromatography coupled to mass spectrometry*;

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

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial;

ISO – Organização Internacional para Padronização, do inglês *International Organization for Standardization*;

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*;

LC-MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série, do inglês *liquid chromatography coupled to mass spectrometry*;

LLE – extração líquido-líquido; do inglês *liquid- liquid extraction*;

LMR – limite máximo de resíduos;

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

LOD<sub>i</sub> – limite de detecção do instrumento;

LOD<sub>m</sub> – limite de detecção do método;

LOQ – limite de quantificação, do inglês *limit of quantification*;

LOQ<sub>i</sub> – limite de quantificação do instrumento;

LOQ<sub>m</sub> – limite de quantificação do método;

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

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

MADR - Ministério de Agricultura e Desenvolvimento Rural;

MPS –Ministério de Proteção Social;

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

m/z – razão massa carga;

PI – Padrão Interno;

pKa – constante de dissociação ácida;

pKb – constante de dissociação básica;

PLE – extração líquida pressurizada, do inglês *pressurised-liquid extraction*;

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes;

PSA – Amina primária e secundária, do inglês *primary secondary amine*;

QuEChERS – Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*;

$r^2$  – coeficiente de determinação;

RS – Rio Grande do Sul;

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

RSD<sub>pi</sub> – desvio padrão relativo em termos de precisão intermediária;

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

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

SPME - microextração em fase sólida, do inglês *solid phase micro extraction*;

SRM – monitoramento de reações selecionadas, do inglês *selected reaction monitoring*;

t<sub>R</sub> – tempo de retenção;

UHPLC-MS/MS: cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*;

USE – extração ultrassônica, do inglês *ultrasonic extraction*;

v/v – volume por volume.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1 Fisalis (<i>Physalis peruviana</i> L.)</b> .....	<b>16</b>
2.1.1 Composição e Usos .....	17
2.1.2 Produção e exportação .....	18
<b>2.2 Agrotóxicos</b> .....	<b>20</b>
2.2.1 Monitoramento de resíduos de agrotóxicos na Colômbia e no Brasil .....	21
2.2.2 Monitoramento de resíduos de agrotóxicos em fisalis .....	22
<b>2.3 A cromatografia na determinação de resíduos de agrotóxicos</b> .....	<b>24</b>
2.3.1 Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas .....	26
<b>2.4 Preparo de amostra na determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos</b> .....	<b>27</b>
2.4.1 Método QuEChERS .....	30
2.4.2 Determinação de resíduos de agrotóxicos em fisalis – métodos de extração e técnicas cromatográficas .....	32
<b>2.5 Validação</b> .....	<b>33</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1 Instrumentação</b> .....	<b>35</b>
<b>3.2 Reagentes, solventes e demais materiais utilizados</b> .....	<b>35</b>
<b>3.3 Preparo das soluções analíticas dos compostos analisados</b> .....	<b>36</b>
3.3.1 Padrão interno e de substituição .....	39
3.3.2 Amostras de fisalis .....	39
<b>3.4 Condições otimizadas no sistema UHPLC-MS/MS</b> .....	<b>40</b>
3.4.1 Escolha da fase móvel e gradiente .....	41
<b>3.5 Otimização do método QuEChERS para a determinação de resíduos de agrotóxicos em fisalis por UHPLC-MS/MS</b> .....	<b>42</b>
3.5.1 Extração.....	42
3.5.2 Limpeza.....	42
3.5.3 Otimização da quantidade de C18 .....	42
<b>3.6 Validação do método para a análise de resíduos de agrotóxicos em fisalis</b> .....	<b>44</b>

3.6.1 Seletividade .....	44
3.6.2 Curva Analítica e Faixa Linear .....	44
3.6.3 Efeito Matriz .....	44
3.6.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	45
3.6.5 Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão .....	45
3.6.6 Precisão (repetitividade) e Precisão intermediária .....	46
<b>3.7 Aplicação do método .....</b>	<b>46</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Condições cromatográficas .....</b>	<b>47</b>
<b>4.2 Avaliação do método QuEChERS modificado para a análise de resíduos de agrotóxicos em físalis .....</b>	<b>50</b>
<b>4.3 Validação do método QuEChERS citrato otimizado .....</b>	<b>54</b>
4.3.1 Seletividade .....	55
4.3.2 Linearidade, Faixa Linear e Efeito Matriz .....	55
4.3.3 Exatidão e Precisão .....	59
4.3.4 Limite de detecção e Limite de Quantificação .....	63
<b>4.4 Aplicação do método .....</b>	<b>63</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>65</b>
<b>6 REFERENCIAS .....</b>	<b>66</b>
<b>7 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS .....</b>	<b>75</b>
<b>8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A fisalis (*Physalis peruviana* L.) é uma fruta exótica originária do Peru, sendo também muito cultivada em outros países andinos (Equador, Colômbia e Chile). Esta fruta é muito apreciada por suas características organolépticas, nutricionais e, segundo estudos, demonstra potencial benéfico para a saúde, pois apresenta alto conteúdo de vitaminas e antioxidantes naturais (REDCORNUCOPIA, 2014).

O cultivo de fisalis é de extrema importância econômica para os países andinos, onde a Colômbia destaca-se como maior produtor e exportador mundial desta fruta (REDCORNUCOPIA, 2014). A fim de aumentar a produtividade e assegurar a qualidade do produto são utilizados agrotóxicos. Porém, uma vez empregados, os agrotóxicos podem deixar resíduos, tanto em sua forma química original como na forma de subprodutos (metabólitos) (FERMAM & ANTUNES, 2009).

A principal preocupação em relação a estes compostos é devido aos efeitos adversos que eles podem causar ao meio ambiente e à saúde humana. Assim, o estabelecimento e a regulamentação de Limites Máximos de Resíduos (LMR) em alimentos, por agências governamentais de diversos países, têm se tornado mais frequentes e visam garantir a segurança do consumidor e a regulamentação do comércio externo (FERMAM & ANTUNES, 2009).

Na Colômbia, o uso de agrotóxicos em alimentos para consumo humano, rações ou pastagens é definido pela Resolução 2906, emitida em 2007 pelo Ministério de Proteção Social e pelo Ministério de Agricultura e Desenvolvimento Rural. Esta resolução está baseada principalmente nos LMRs do *Codex Alimentarius* (COLÔMBIA, 2007).

A fisalis não possui uma legislação específica, entretanto, a União Europeia determinou, através do Regulamento Nº 600/2010, que esta fruta deve ser classificada no grupo do tomate, devido a similaridade dessas matrizes (RESTREPO *et al.*, 2014).

No Brasil, o órgão responsável pelo estabelecimento de LMRs é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Além desta, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) realiza um panorama nacional sobre a presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos, através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC). No entanto, é importante salientar que ainda não existem legislações que estabelecem LMRs para fisalis no país.

A determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos é um desafio, devido à complexidade das matrizes. Sendo assim, diversos métodos de preparo de amostra têm sido desenvolvidos com objetivo de isolar os analitos e remover compostos interferentes destas matrizes complexas (WILKOWSKA & BIZIUK, 2011). Um exemplo é o método QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), proposto por Anastassiades *et al.* em 2003. Este método está baseado em uma extração com pequenas quantidades de solvente (acetonitrila) e uma etapa de partição promovida pela adição de diferentes sais, possibilitando a análise de vários compostos com diferentes classes químicas, em um curto tempo de análise (PRESTES *et al.*, 2009).

Além dos métodos de preparo de amostra, é essencial a utilização de ferramentas como a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS, do inglês *ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*), que possibilitam análises mais rápidas e com maior resolução, podendo-se atingir limites mais baixos de resíduos nas amostras (ORSO *et al.*, 2015).

Este estudo mostra-se relevante devido à existência de poucos trabalhos científicos envolvendo a determinação de resíduos de agrotóxicos em fisalis. Atualmente, na Colômbia, este tipo de análise é realizado em laboratórios fora do país, o que prejudica e atrasa o processo de exportação. Sendo assim, a otimização de um método para a análise de fisalis é uma necessidade para o país e o estudo de um método adequado poderá trazer novas oportunidades neste âmbito e, ao mesmo tempo, impulsionar a análise de resíduos de agrotóxicos nesta matriz.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e validação de um método para a determinação de resíduos de 42 agrotóxicos em fisalis (*Physalis peruviana* L.), empregando o método QuEChERS modificado e UHPLC-MS/MS. Posteriormente, o método foi aplicado para análise de 16 amostras, sendo 14 importadas da Colômbia e 2 cultivadas no estado do Rio Grande do Sul (RS).



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Fisalis (*Physalis peruviana* L.)

A fisalis (*Physalis peruviana* L.), também conhecida como uchuva na Colômbia, uvilla no Equador, aguaymanto no Peru e *goldenberry* em países de língua inglesa, é uma planta arbustiva pertencente à família *Solanaceae*, gênero *Physalis* (Puente et al., 2011). Suas folhas, em formato de coração, são alternadas, com pecíolos e pubescentes, apresentando largura entre 4 e 10 cm e até 15 cm de comprimento. As flores são solitárias, pedunculadas e hermafroditas, crescem nas axilas das folhas e possuem formato de sino (FAO, 2014).

O fruto está coberto por uma membrana fina, fibrosa e não comestível denominada cálice ou cápsula (Figura 1). O cálice permite ao fruto uma vida útil de aproximadamente um mês, além de protegê-lo de pássaros, insetos, patógenos e de condições climáticas adversas (LIMA et al., 2013). A estrutura também representa uma fonte essencial de carboidratos durante os primeiros 20 dias de crescimento e desenvolvimento do fruto (FAO, 2007).

A fisalis caracteriza-se por sua casca alaranjada, lisa e brilhante, com polpa de sabor ácido açucarado (semiácido). O fruto possui formato de círculo ou ovóide, com diâmetro entre 1,25 e 2,5 cm, massa entre 4 e 10 gramas e aproximadamente 100 a 300 sementes pequenas (FAO, 2014).

Figura 1 - Fisalis (*Physalis peruviana* L.)



Fonte: (Adaptado de MATHIAS, 2013).

O cultivo de *fisalis* adapta-se a diversas condições climáticas, como por exemplo, solos ligeiramente ácidos e ricos em matéria orgânica. Necessita de precipitações entre 1000 e 2000 mm, bem distribuídos durante o ano, e a temperatura ótima para sua produção é 18 °C (FAO, 2007).

### 2.1.1 Composição e usos

Os benefícios associados a esta fruta exótica estão relacionados principalmente à sua composição nutricional (Tabela 1). Dentre seus principais componentes pode-se ressaltar: elevadas quantidades de ácidos graxos poli-insaturados; vitaminas A, B, C, E e K<sub>1</sub>; fitoesteróis; fisalinas; *withanolides* e minerais, como cálcio e fósforo. Fisalinas são seco-esteroides com propriedades imunossupressivas, enquanto *withanolides* são lactonas esteroidais que apresentam propriedades antimicrobianas, antitumorais, anti-inflamatórias, hepatoprotetoras e atividade antiparasitária. Além disso, a *fisalis* contém componentes bioativos que a caracterizam como um alimento funcional (PUENTE *et al.*, 2011).

Tabela 1 - Composição de nutrientes e minerais em 100 g de *fisalis*

<b>Componentes</b>	<b>Valor</b>
Umidade	78,9 g
Proteína	0,05 - 0,3 g
Lipídeos	0,15 - 0,2 g
Carboidratos	19,6 g
Fibra	4,9 g
Cinzas	1,0 g
Cálcio	8,0 mg
Fósforo	55,3 mg
Ferro	1,2 mg
Carotenoides	1,6 mg
Tiamina	0,1 mg
Riboflavina	0,03 mg
Niacina	1,70 mg
Ácido ascórbico	43,0 mg

Fonte: (Adaptado de RAMADAN, 2011).

A fruta fresca pode ser consumida em sucos, coqueteis, saladas, molhos e sorvetes, sendo também utilizada como ornamento em diversas receitas. A partir da fruta processada são elaborados néctares, marmeladas e polpas, podendo-se ainda desidratar e conservar em geleias. A planta também é empregada como cobertura protetora de terrenos contra a erosão (FAO, 2014).

Muitas propriedades medicinais têm sido atribuídas à fisalis, incluindo anti-asmático, anti-séptico, fortificante para o nervo óptico, tratamento de afecções da garganta e eliminação de parasitas intestinais, bem como albumina dos rins. Foram relatadas também propriedades antidiabéticas, sendo recomendado o consumo de cinco frutas por dia (RAMADAN, 2011).

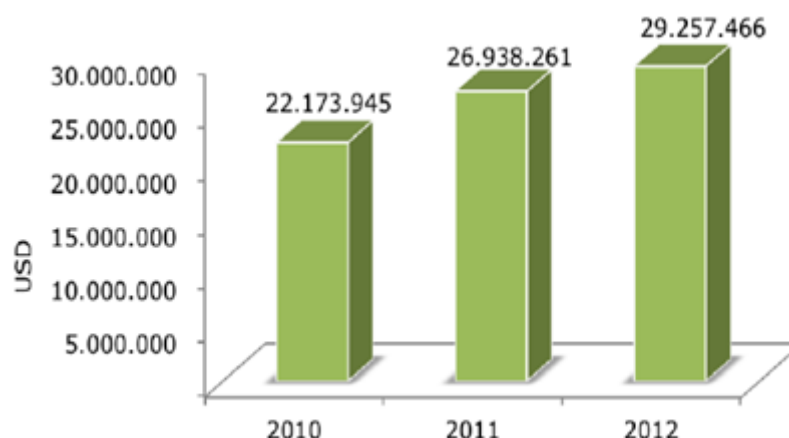
### **2.1.2 Produção e exportação**

A fisalis (*Physalis peruviana* L.) teve como centro de origem os andes peruanos e, atualmente, é cultivada em maior escala na Colômbia, Quênia, Zimbábue, Austrália, Nova Zelândia, Índia e Equador (FISCHER, ALMANZA-MERCHÁN & MIRANDA, 2014).

A Colômbia é o maior produtor e exportador de fisalis a nível mundial, sendo essa a segunda fruta mais importante do país (a banana ocupa a primeira posição) (MAZZORA, 2006). Em 2012, as exportações de fisalis totalizaram 29,2 milhões de dólares, sendo que os países que mais importaram a fruta foram: Holanda (67,9%), Alemanha (24,5%), Canadá (2,2%), França (1,4%), Brasil (1,0%) e Bélgica (0,5%) (LEGISCOMEX, 2013).

Embora o consumo per capita de fisalis na Colômbia seja muito baixo, cerca de 200 g por ano, o cultivo dessa fruta está aumentando constantemente no país para satisfazer as crescentes demandas na exportação, conforme pode ser observado na Figura 2 (FISCHER, ALMANZA-MERCHÁN & MIRANDA, 2014). O país produz 11.500 toneladas/ano de fisalis, porém o excedente da fruta atinge 50% do total da produção. Esse excedente não é exportável devido ao pequeno tamanho das frutas, porém é bastante utilizado para a elaboração de novos produtos, como por exemplo, os desidratados (CASTRO, RODRÍGUEZ & VARGAS, 2008).

Figura 2 - Exportações de fisalis na Colômbia no período de 2010 a 2012



Fonte: (LEGISCOMEX, 2013).

No Brasil, a cultura da fisalis é uma atividade agrícola ainda recente, sendo relatadas produções entre 2 e 3 toneladas por ano (FISCHER, ALMANZAMERCHÁN & MIRANDA, 2014). O mercado nacional ainda está pouco abastecido com o produto, mas os preços de venda obtidos pelos produtores são animadores, possibilitando boas taxas de retorno sobre o capital investido. A fruta é comercializada em grandes supermercados, apresentando um preço bastante elevado, entre R\$ 50,00 e R\$90,00/kg (MUNIZ *et al.*, 2011).

A planta apresentou fácil adaptação edafoclimática no território brasileiro, embora alguns aspectos devam ser observados: em regiões temperadas, especialmente nas regiões mais altas de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, a ocorrência de geadas no inverno pode provocar a morte da planta, fazendo com que a cultura se torne sazonal; já em regiões subtropicais, onde não ocorrem geadas, a produção pode se estender por até dois anos, mas após este período a produtividade e a qualidade dos frutos diminuem (MUNIZ *et al.*, 2011).

Embora não se tenha uma produção significativa, a comercialização de fisalis está sendo inserida gradativamente no mercado brasileiro, apresentando um comportamento semelhante ao dos demais frutos. Assim, destaca-se como uma excelente alternativa de consumo e também como mais uma opção de renda para os produtores rurais (MUNIZ *et al.* 2011).

## 2.2 Agrotóxicos

O termo agrotóxico, segundo o *Codex Alimentarius*, refere-se a qualquer substância ou mistura que tenha como objetivo prevenir, destruir 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, 2005).

Quanto ao emprego podem ser classificados em: inseticidas (combatem os insetos), herbicidas (combatem plantas daninhas), fungicidas (combatem fungos) e outros, tais como acaricidas, moluscocidas e rodenticidas (BAIRD, 2002).

Quanto à composição química, os agrotóxicos possuem uma enorme diversidade estrutural. Deste modo, quando possuem alguma característica em comum são classificados dentro de um mesmo grupo, como, por exemplo: organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretroides. Também, a classificação quanto à toxicidade é fundamental, uma vez que são compostos potencialmente perigosos para a saúde humana (BARBOSA, 2004).

O Brasil é o segundo maior produtor de alimentos do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos, mas ocupa o primeiro lugar no ranking mundial de consumo de agrotóxicos (MMA, 2016).

Segundo dados do Banco Mundial, o consumo anual de agrotóxicos por tonelada na Colômbia aumentou 379% entre 1997 e 1998. Entre 1990 e 1996, o consumo anual foi inferior a 20.000 toneladas, já entre 1998 e 2010, esta variável foi superior a 48.000 toneladas, alcançando um máximo de 151.686 toneladas no ano 2000 (SIC, 2013).

Embora o emprego de agrotóxicos na agricultura proporcione benefícios econômicos, uma vez que auxilia na melhoria da produtividade, a falta de conhecimento das boas práticas para a utilização destes compostos ocasiona a ocorrência de resíduos que, em níveis acima dos LMRs, podem representar risco à saúde humana (PRESTES, 2011).

Os LMRs 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, parece não oferecer risco apreciável à saúde, à luz dos conhecimentos atuais (FERMAM & ANTUNES, 2009).

Dentre as adversidades ocasionadas à saúde humana pela presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos, podem-se ressaltar: danos ao sistema nervoso central, diversos tipos de câncer, problemas no sistema reprodutivo e locomotor, deficiência mental, entre outros (BORGES, FIGUEIREDO & QUEIROZ, 2015).

Atualmente, diversos programas de monitoramento de agrotóxicos em alimentos são aplicados com a finalidade de proteger a saúde dos consumidores, melhorar a gestão dos recursos agrícolas e evitar perdas econômicas (GARRIDO *et al.*, 2004).

### **2.2.1 Monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos na Colômbia e no Brasil**

Durante os últimos 40 anos os registros de agrotóxicos duplicaram-se na Colômbia, de 186 moléculas em 1974 até 400 ingredientes ativos em 2003 (CÁRDENAS, SILVA & ORTIZ, 2010). Estudos prévios demonstraram que a população colombiana pode apresentar estes compostos em níveis perigosos no sangue devido à exposição direta aos agrotóxicos, tanto em processos de fabricação quanto na aplicação (IDROVO, 2000). No entanto, apesar das normas jurídicas, o Sistema Nacional de Vigilância em Saúde Pública (SIVIGILA) registrou 8.016 casos de envenenamento por agrotóxicos em 2010 (PÁEZ *et al.*, 2011). Está em desenvolvimento no país o Plano Nacional Subsetorial de Vigilância e Controle de Resíduos em Alimentos (PSVCR), coordenado pelo Instituto Colombiano Agropecuário (ICA) e pelo Instituto Nacional de Vigilância de Medicamentos e Alimentos (INVIMA). Este plano como objetivo vigiar e controlar os resíduos de agrotóxicos, medicamentos veterinários e contaminantes que possam estar presentes nos alimentos produzidos no país ou importados (MINSALUD, 2014).

Na Colômbia, os LMRs em alimentos para consumo humano, rações e pastagens estão definidos na Resolução 2906, emitida em 2007 pelo Ministério de Proteção Social (MPS) e pelo Ministério de Agricultura e Desenvolvimento Rural (MADR) (COLÔMBIA, 2007). Esta resolução está baseada principalmente no *Codex Alimentarius* (RESTREPO *et al.*, 2014).

Em decorrência de sua significativa importância, tanto em relação à sua toxicidade quando à escala de uso, os agrotóxicos possuem uma ampla cobertura legal no Brasil. O processo de registro de agrotóxicos envolve o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o Ministério do Meio Ambiente e o Ministério da Saúde, através ANVISA, a qual cabe a avaliação do impacto dos agrotóxicos na saúde humana e o estabelecimento dos LMRs (ANVISA, 2011).

Em 2001, foi criado pela ANVISA o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), com o objetivo de monitorar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor. Além disso, é responsável por planejar estratégias para diminuir os riscos que a presença de agrotóxicos não autorizados ou acima dos limites podem trazer (ANVISA, 2011a).

Além do PARA, foi criado em 2006 o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Este programa visa verificar a saúde do consumidor monitorando a presença de resíduos de substâncias químicas potencialmente nocivas à saúde do consumidor, tais como antibióticos, agrotóxicos e contaminantes ambientais (MAPA, 2013).

### **2.2.2 Monitoramento de resíduos de agrotóxicos em *fisalis***

A *fisalis* não possui uma legislação específica, entretanto, a União Europeia determinou, através do Regulamento N° 600/2010, que esta fruta deve ser classificada no grupo do tomate, devido a similaridade dessas matrizes (RESTREPO *et al.*, 2014). A Tabela 2 apresenta os limites máximos de resíduos estabelecidos para tomate pela União Europeia (2016), *Codex Alimentarius* (2013) e Colômbia (2007).

Tabela 2 – LMRs de agrotóxicos estabelecidos para tomate pela União Europeia, *Codex Alimentarius* e pelos órgãos colombianos, MPS e MADR

Compostos	LMR (mg kg <sup>-1</sup> )		
	União Europeia	<i>Codex Alimentarius</i>	Colômbia
Abamectina	0,02	0,02	0,02
Azinfós metílico	0,05	1,0	1,0
Azoxistrobina	3,0	-	-
Benalaxil	0,05	0,2	0,5
Bitertanol	0,01	3,0	3,0
Carbaril	0,01	-	5,0
Carbendazim	0,3	0,5	0,5
Carbofuram	0,002	-	-
Cimoxanil	0,2	-	-
Ciprodinil	1,5	-	0,5
Cletodim	1,0	1,0	1,0
Clorpirifós etílico	0,5	-	0,5
Clorpirifós metílico	0,5	1,0	0,5
Deltametrina	0,3	0,3	0,3
Diazinona	0,01	0,5	0,5
Dimetoato	0,02	-	-
Etefon	1,0	2,0	2,0
Etoprofos	0,02	0,01	0,01
Famoxadona	2,0	2,0	2,0
Fempropatrina	0,01	1,0	1,0
Fenamifós	0,04	-	0,2
Fenhexamida	1,0	2,0	2,0
Hexitiazox	0,5	0,1	0,1
Imidacloprido	0,5	0,5	0,5
Indoxacarb	0,5	0,5	0,5
Malationa	0,02	0,5	0,5
Metidationa	0,1	0,1	0,1
Metoxifenoazida	2,0	2,0	2,0
Miclobutanil	0,3	0,3	0,3
Oxamil	0,01	2,0	2,0
Penconazol	0,1	0,2	0,2
Piraclostrobina	0,3	0,3	0,3
Pirimicarbe	1,0	-	1,0
Profenofós	10,0	-	2,0
Propamocarbe	4,0	2,0	1,0
Propargito	0,01	2,0	2,0
Spinosad A	0,7	0,3	0,3
Spinosad D	0,7	0,3	0,3
Tebuconazol	0,9	0,7	0,2
Tebufenozida	1,0	1,0	1,0
Triadimefom	1,0	-	0,2
Triadimenol	1,0	-	0,5
Trifloxistrobina	0,5	0,7	0,7

Fonte: UNIÃO EUROPEIA (2016); CODEX ALIMENTARIUS (2013); COLÔMBIA (2007).



### 2.3 A cromatografia na determinação de resíduos de agrotóxicos

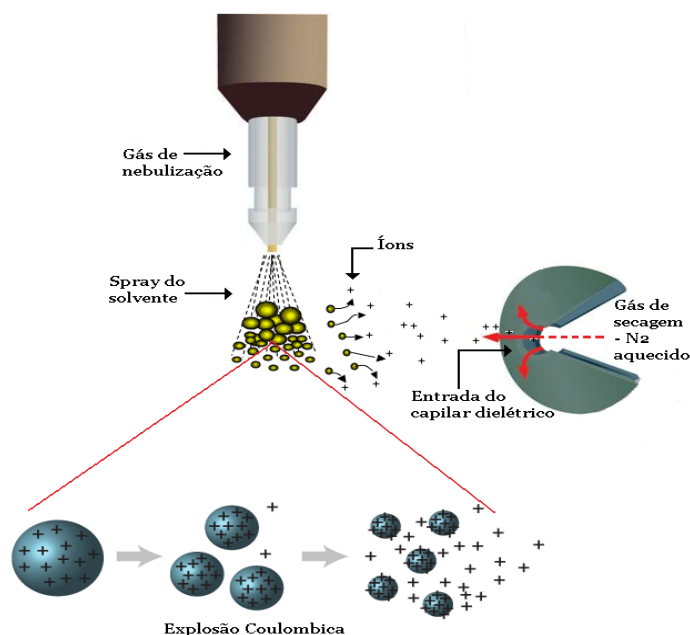
Devido à crescente preocupação em assegurar a inocuidade dos alimentos a serem consumidos pela população, diferentes metodologias para a determinação de resíduos de agrotóxicos são realizadas através da análise cromatográfica. Apesar da aplicabilidade da cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*) para a análise de resíduos de pesticidas em alimentos, muitos agrotóxicos modernos (polares ou iônicos) não podem ser analisados diretamente por GC. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS, do inglês *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*) é a melhor opção para a separação, identificação e confirmação de compostos com baixa volatilidade e/ou instabilidade térmica (QUEIROZ *et al.*, 2012).

O princípio básico da espectrometria de massas é a gerar íons de compostos orgânicos ou inorgânicos através de algum método adequado, a fim de separar esses íons pelas suas razões massa/carga ( $m/z$ ) e detectá-los qualitativa e quantitativamente. É uma técnica analítica eficaz para quantificar compostos conhecidos e identificar compostos desconhecidos em uma amostra (GROSS, 2004).

O espectrômetro de massas consiste em uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector, sendo que os dois últimos são operados sob condições de alto vácuo (a fonte de íons não necessariamente estará sob vácuo). As fontes de ionização mais comumente utilizadas em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas são a eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray ionization*) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*) (LANÇAS, 2009).

A eletronebulização, Figura 3, é fonte de ionização mais comumente utilizada, sendo ideal para análise de moléculas mais polares, de maior massa molecular.

Figura 3 - Esquema da fonte de ionização por eletronebulização (ESI)



Neste processo, a amostra é dissolvida e pressurizada em um tubo capilar de aço inox, no qual é aplicada uma voltagem tipicamente entre 3.000 e 5.000 V. Como resultado, o líquido emerge do capilar à pressão atmosférica, na forma de um aerossol. À medida que ocorre a dessolvatação, assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente  $N_2$ ), o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior do que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento ocorre a chamada “explosão coulombica”, que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais se originaram (CHIARADIA; COLLINS & JARDIM, 2008).

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. Neste processo, apenas a ionização ocorre à pressão atmosférica, o espectrômetro de massas se encontra sob vácuo (LANÇAS, 2009; CHIARADIA; COLLINS & JARDIM, 2008).

### 2.3.1 Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

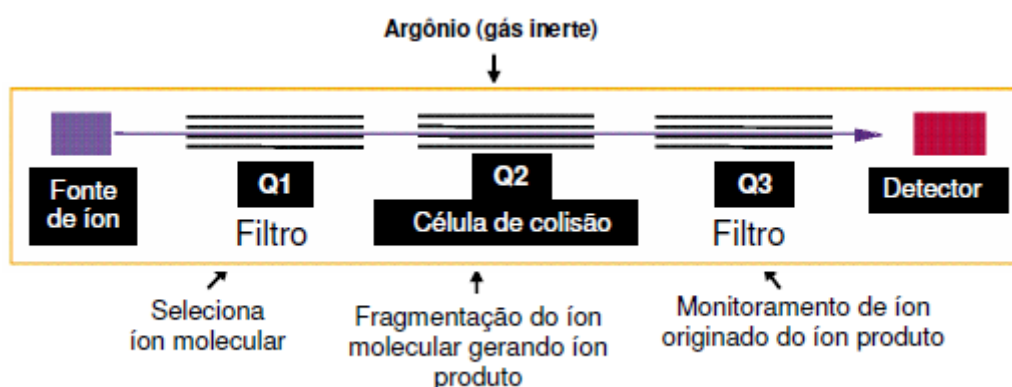
Uma análise multirresíduo inclui a varredura, a quantificação e a confirmação dos analitos. Esta abordagem envolve um grande número de compostos de interesse que necessitam:

- Ser monitorados, sendo que há muitos analitos em baixa concentração;
- Necessidade de confirmação, elucidação estrutural e /ou identificação;
- Analisar amostras de alta complexidade contendo os analitos de interesse.

Sendo assim, a UHPLC-MS/MS oferece algumas vantagens em relação à LC-MS/MS, como por exemplo a redução do tempo em análises multirresíduo (RODRIGUEZ-ALLER *et al.*, 2013).

Com um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (TQ), Figura 4, operando no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *selection reaction monitoring*) tem-se: a seleção do íon precursor no primeiro quadrupolo (Q1); as fragmentações desse íon na célula de colisão (q2), geralmente por colisão com um gás inerte (CID, do inglês *collision induced dissociation*), e a seleção dos fragmentos específicos (íons produto) no quadrupolo 3 (Q3). Este modo permite que o equipamento focalize apenas o íon precursor e o íon produto, aumentando a detectabilidade e a seletividade da análise (CHIARADIA; COLLINS & JARDIM, 2008).

Figura 4 - Esquema de um analisador de massas tipo triplo quadrupolo (TQ)



A UHPLC-MS/MS é muito utilizada na análise e detecção de compostos presentes em baixas concentrações em amostras complexas, pois a quantidade de informações a ser obtidas da amostra é maior, quando comparada a outras técnicas (CHIARADIA, COLLINS & JARDIM, 2008).

#### **2.4 Preparo de amostra na determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos**

O preparo de amostra é uma das etapas mais críticas em um método multirresíduo, devido principalmente à diversidade de agrotóxicos que precisam ser extraídos. Assim, a eficiência de extração deve ser aumentada de modo a obter recuperações satisfatórias para uma ampla gama de compostos (ORTELLI, EDDER & CORVI, 2004).

Nos últimos anos, foram desenvolvidos vários procedimentos de preparo de amostra para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos. Estes métodos visavam analisar um grande número de compostos de diferentes classes, uma maior praticidade e a redução de solventes e sais. A evolução dos métodos de preparo de amostra pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3 – Evolução dos métodos de preparo de amostra para análise multirresíduo em alimentos

Década	Método	Extração e Limpeza	Características
1960	Mills	O método baseia-se em uma extração com acetonitrila sendo utilizado basicamente na determinação de compostos organoclorados em amostras não-gordurosas. A etapa de limpeza é realizada através da utilização de uma coluna de florisil <sup>®</sup> .	A extração é seguida por uma etapa de partição com éter de petróleo. Compostos organofosforados apresentavam baixos percentuais de recuperação quando analisados por este método.
	Storherr	Realizou-se algumas modificações no método de Mills. A extração é realizada com acetonitrila, porém o éter de petróleo é substituído por diclorometano. A etapa de limpeza é realizada com carvão ativado	Este método possibilitou que o método de Mills fosse aplicado a compostos organoclorados e organofosforados em frutas e vegetais.
1970	Método para determinar organoclorados, organofosforados e nitrogenados	Utiliza acetona na etapa de extração. Este processo é seguido de uma partição líquido-líquido utilizando diclorometano ou mistura de diclorometano e éter de petróleo, a fim de remover da água. A etapa de limpeza é realizada com carvão ativado.	
	Luke	A extração dos agrotóxicos é realizada com acetona. Adiciona-se cloreto de sódio para saturar a fase aquosa, tendo como consequência maiores valores de recuperação dos compostos polares. A etapa de limpeza, quando realizada, é feita com coluna de florisil <sup>®</sup> .	Este é o primeiro método em que uma solução de cloreto de sódio foi adicionada ao extrato para promover o efeito "salting out".
1980		Esta época foi marcada pelo desenvolvimento de métodos que não exigiam a utilização de grandes quantidades de solventes clorados. Estes foram substituídos por outros, por exemplo, mistura 1:1 (v/v) de cicloexano e acetato de etila. Além disso, os solventes apolares foram substituídos por sais (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> , NaCl, etc), durante o processo de partição. A extração em fase sólida (SPE, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i> ) começou a ser amplamente utilizada, substituindo muitos métodos baseados na extração líquido-líquido.	A acetona continua sendo o solvente mais utilizado na etapa de extração. Porém, há o desenvolvimento de métodos, nos quais a etapa de extração era realizada com acetonitrila e acetato de etila. A fim de melhorar os percentuais de recuperação dos compostos polares o sulfato de sódio (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) foi amplamente utilizado. Além disso, diversos procedimentos de limpeza foram desenvolvidos.
Atual		Os avanços da química analítica em consonância com o conceito sustentabilidade levaram ao desenvolvimento de várias técnicas alternativas de extração como, por exemplo, a SFE, MAE, MSPD, SPME e ASE.	

Fonte: (PRESTES, 2011).

Métodos miniaturizados como a Microextração em Fase Sólida (SPME, do inglês *solid phase micro extraction*), Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE, do inglês *stir-bar sorptive extraction*) e outros como Extração Líquida Pressurizada (PLE, do inglês *pressurised-liquid extraction*), Extração Assistida por Micro-ondas (MAE, do inglês *microwave-assisted extraction*), Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD, do inglês *matrix solid phase dispersion*) e Extração Ultrassônica (USE, do inglês *ultrasonic extraction*) têm provado serem técnicas rápidas e eficientes para muitos tipos de amostras sólidas, incluindo amostras ambientais, alimentícias e biológicas, entretanto as diferentes propriedades físico-químicas dos analitos dificultam o emprego em análises multirresíduo (HYÖTYLÄINEN, 2009; CABRERA, 2012).

Entretanto, estas técnicas demandam analistas treinados e etapas de limpeza entre as extrações, o que implica em um maior tempo de análise. Outra desvantagem geralmente apresentada é o escopo limitado de agrotóxicos que podem ser extraídos sob determinadas condições. Sendo assim, estes procedimentos, podem ser empregados em algumas aplicações, mas estão distantes de ser considerados ideais para um método multirresíduo (WARDENCKI *et al.*, 2004).

#### **2.4.1 Método QuEChERS**

Anastassiades e colaboradores introduziram em 2003 o método QuEChERS), o qual tem proporcionado resultados satisfatórios na determinação de resíduos de agrotóxicos presentes em baixos níveis de concentração em matrizes complexas. Este método apresenta como vantagens a determinação de muitos compostos com diferentes classes químicas em um curto tempo de análise, utilizando pequenas quantidades de solvente (ORSO *et al.*, 2015).

O procedimento original consiste na extração com acetonitrila e adição de sais (NaCl) para promover o efeito *salting out*, o qual diminui a solubilidade dos compostos na fase aquosa, bem como, a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa. Juntamente com o método QuEChERS foi proposto um novo método de limpeza denominado extração dispersiva em fase sólida (d-SPE, do inglês *dispersive solid phase extraction*), onde uma quantidade de extrato é colocada em contato com uma mistura de sorventes com ou sem uso de sais secantes. A etapa de remoção de água resulta em um extrato de menor polaridade, facilitando a precipitação de

coextrativos polares. O sorvente possui a capacidade de reter interferências da matriz, e após a agitação manual e centrifugação o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico (PRESTES *et al.*, 2011).

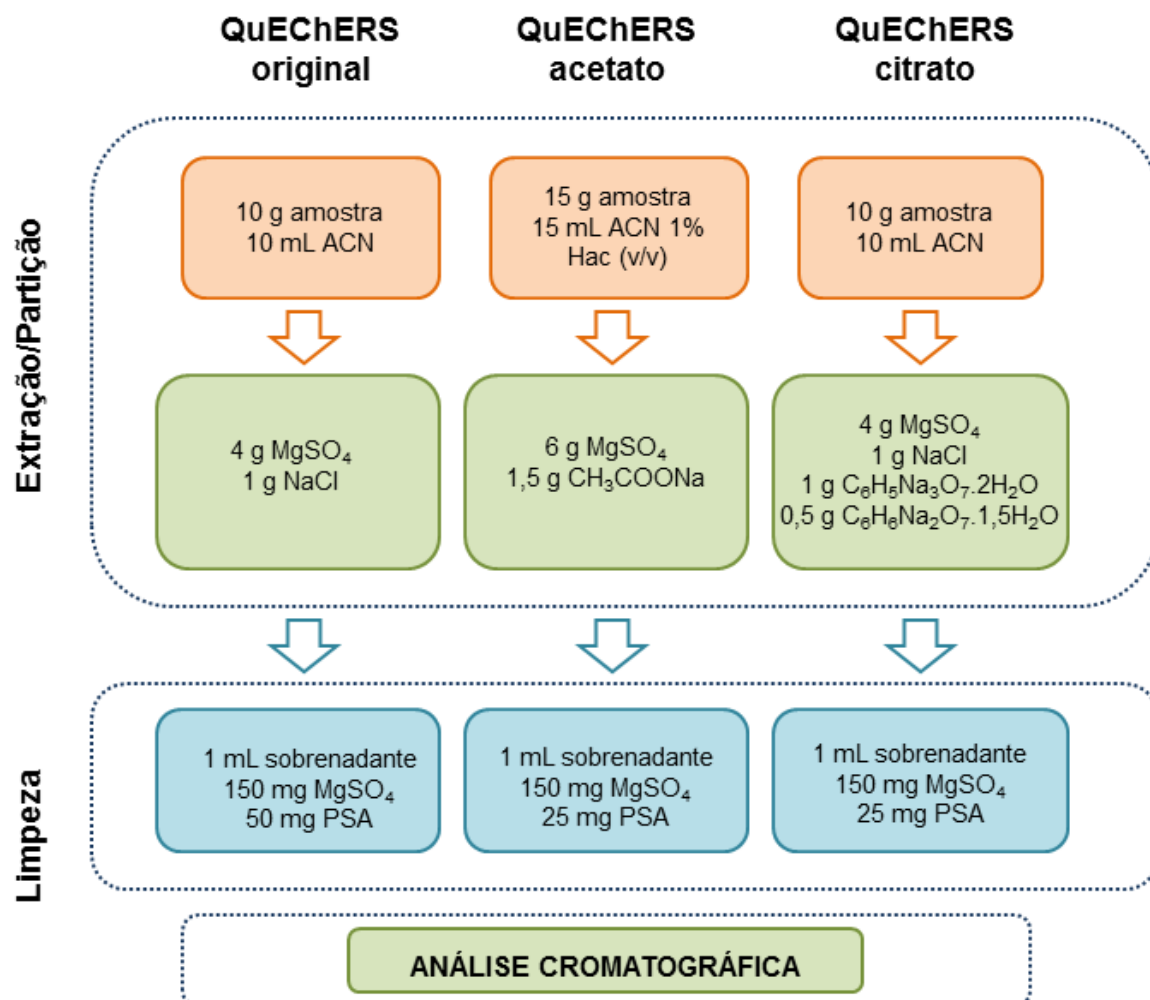
Entre os sorventes que podem ser utilizados na etapa de d-SPE, estão a amina primária-secundária (etilenodiamino-N-propil, PSA, do inglês *primary secondary amine*), a qual tem elevado efeito quelante devido a presença dos grupamentos amino primário e secundário, acarretando em remoção de ácido orgânicos polares, pigmentos polares, alguns açúcares e ácidos graxos. O tamanho de partícula do sorvente utilizado é, geralmente, de 40 µm. O sorvente PSA tem sido usado em associação com outros sorventes, principalmente com C18 ou carbono grafitizado (PRESTES *et al.*, 2009; WILKOWSKA & BIZIUK, 2011; CABRERA *et al.*, 2012).

O sorvente octadecilsilano (C18) é mais utilizado para matrizes com teor de gordura maior que 2%, pois remove com boa eficiência interferentes apolares, tais como ácidos graxos e lipídios. No entanto, tem sido utilizado em conjunto com PSA na etapa de d-SPE, para promover uma limpeza mais efetiva de diferentes tipos de matrizes e analitos, tendo um custo inferior ao do PSA. O tamanho de partícula mais utilizado é de 40 µm (CABRERA *et al.*, 2012).

O sorvente carvão grafitizado (GCB, do inglês *graphitized carbon black*) é caracterizado por apresentar grupos altamente polares na superfície, com elevado potencial para formação de pontes de hidrogênio. Todavia, o uso desse sorvente deve ser moderado, uma vez que possui uma forte retenção de analitos planares, resultando em baixas recuperações para estes compostos (KOESUKWIWAT *et al.*, 2010; HENNION, 2000).

Na otimização do método QuEChERS, percebeu-se que a utilização de tampões (pH 5,0) promoviam recuperações satisfatórias (>70%) para compostos dependentes do pH. Assim, Lehotay *et al.* (2005) desenvolveram o método QuEChERS-acetato, no qual o efeito tamponante (pH 4,8) é promovido pela adição de acetato de sódio e adição de ácido acético à acetonitrila. Em 2007, Anastassiades *et al.* propuseram o método QuEChERS-citrato, o qual utiliza uma mistura de citrato de sódio di e sesquidratados como responsáveis pelo efeito tamponante (pH 5,0-5,5). Na Figura 5 estão representadas as principais versões do método QuEChERS, original, acetato e citrato.

Figura 5 - Fluxograma dos métodos QuEChERS original, acetato e citrato



Fonte: (Adaptado de PRESTES *et al.*, 2011).



### 2.4.1 Determinação de agrotóxicos em fisalis - métodos de extração e técnicas cromatográficas

Na literatura tem sido relatado o uso de diferentes técnicas de preparo de amostra para a extração de agrotóxicos em alimentos da família *Solanaceae*, como por exemplo, fisalis e tomate. A Tabela 4 apresenta alguns destes métodos:

Tabela 4 - Diferentes métodos empregados na determinação de resíduos de agrotóxicos em fisalis e tomate.

Agrotóxicos analisados	Matriz	Extração/Etapa de limpeza	Técnica	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Recuperação	Referência
4	Tomate	SLE-LTP	GC-ECD+MS	0,0125	79-97	PINHO <i>et al.</i> , 2010
13	Tomate	DLLME	GC-FPD	-	-	BIDARI <i>et al.</i> , 2011
30	Tomate	DLLME	GC-MS	0,0089-0,84	62-109	MELO <i>et al.</i> , 2012
24	Tomate	QuEChERS/ d-SPE	LC-MS	0,01-0,8	71-112	ARIAS <i>et al.</i> , 2014
28	Fisalis	QuEChERS/ d-SPE	PTV-GC-MS	20	25-109	RESTREPO <i>et al.</i> , 2014
109	Tomate	QuEChERS/ d-SPE	LC-MS/MS	0,5-10,8	77-113	GOLGE & KABAK, 2015
50	Fisalis	QuEChERS/ d-SPE	GC-MS	0,01	-	AMÓRTEGUI & DALLOS, 2015
57	Tomate	QuEChERS/ d-SPE	LC-MS/MS	0,002-0,01	71-116	ANDRADE <i>et al.</i> , 2015

SLE-LTP = Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura; DLLME = Microextração líquido-líquido dispersiva; d-SPE = Extração em fase sólida dispersiva; ECD = Detector por captura eletrônica; FPD = Detector fotométrico de chama; PTV = Injetor por vaporização com temperatura programada.

## 2.5 Validação

Um método analítico é composto de uma série de procedimentos, realizados desde o recebimento da amostra até a obtenção do resultado final. A validação de um método é uma exigência na prática das análises químicas, e tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ZANELLA *et al.*, 2015).

No Brasil, a ANVISA, com a Resolução - RE nº 27, de 17 de maio de 2012, e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), através do decreto DOQ-CGCRE-008 (revisão 04) de 2011, estabelecem guias para validação de processos analíticos (INMETRO, 2011).

O INMETRO sugere que seja realizado um planejamento da validação, o qual deve levar em consideração os seguintes itens: definição da aplicação, objetivo e escopo do método; definição dos parâmetros de validação e critérios de aceitação; verificação das características de desempenho do equipamento, se as mesmas estão compatíveis com o exigido pelo método em estudo; qualificação dos materiais (por exemplo, reagentes); planejamento dos experimentos de validação, incluindo o tratamento estatístico, e execução dos experimentos de validação (INMETRO, 2011).

Na Colômbia, entretanto, ainda não existem órgãos regulamentadores no âmbito da validação de métodos analíticos. Sendo assim, o procedimento de validação deve ser realizado de acordo com órgãos internacionais, tais como: SANCO/12571/2013, ISO 17025:2005 ou Eurachem CNM- MRD- 030 - 2ª edição.

Alguns dos parâmetros envolvidos no processo de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos estão destacados na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos

Parâmetro	Definição	Aplicação	Referência
Seletividade	Distinção de resposta entre analitos.	Extração de matriz "branco"	INMETRO
Especificidade	Distinção da resposta do analito na presença de interferentes.	Extração de matriz "branco"	SANCO
Linearidade	Correlação entre resposta analítica e concentração	Curva Analítica ( $y = ax + b$ )	INMETRO ANVISA
Faixa Linear de trabalho	Intervalo de concentrações em que y e x correlacionam-se linearmente	Curva Analítica ( $y = ax + b$ )	INMETRO ANVISA
EfeitoMatriz	Influência dos componentes da matriz na resposta (y)	Comparação entre curvas preparadas em solvente e em extrato branco	SANCO
LOD	Concentração limite de distinção entre analito e ruído	S/R = 3	INMETRO ANVISA
LOQ		S/R = 10	
Precisão	Proximidade de resultados obtidos por diferentes amostragens	Repetitividade e Reprodutibilidade	INMETRO ANVISA
Exatidão	Proximidade de resultado em relação a uma referência	Ensaio de fortificação	INMETRO ANVISA

ANVISA, 2003; INMETRO, 2011; SANCO, 2013

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho proposto consistiu no desenvolvimento e validação de um método de preparo de amostra visando à determinação de resíduos de agrotóxicos em *fisalis* por UHPLC-MS/MS. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

#### 3.1 Instrumentação

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram:

- ✓ Sistema de purificação de água, Milli-Q Direct UV3R (Millipore, França);
- ✓ Lavadora ultrassônica, linha Soniclean (Sanders, Brasil);
- ✓ Centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- ✓ Centrífuga 80-2B (Centribio, Brasil);
- ✓ Agitador Vortex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ✓ Processador de alimentos Walita (Philips, China);
- ✓ Balança analítica de precisão APX-200 (Shimadzu, Japão);
- ✓ Balança analítica de precisão UX-420H (Shimadzu, Japão);
- ✓ Micropepitadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- ✓ Sistema UHPLC-MS/MS, modelo Xevo TQ™ (Waters, EUA), contendo: analisador triplo quadrupolo, amostrador automático sample manager (Acquity); sistema de aquisição de dados *MassLynx V 4.1*; sistema gerador de nitrogênio PEAK, modelo NM30L-MS (Peak Scientific, Escócia) e gás argônio 6.0, usado como gás de colisão.
- ✓ Coluna analítica ACQUITY UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm);

#### 3.2 Reagentes, solventes e demais materiais utilizados

Reagentes, solventes e demais materiais utilizados estão listados abaixo:

- ✓ Padrões sólidos dos compostos em estudo (Dr. Erhenstorfer, Alemanha);
- ✓ Acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- ✓ Ácido acético glacial 100% (J. T. Baker, EUA);
- ✓ Água purificada em sistema Milli-Q Direct UV3R (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- ✓ Metanol, grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);

- ✓ Formiato de amônio (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas, de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro p.a. (J.T. Baker, Japão);
- ✓ Sulfato de sódio (Merck, Brasil)
- ✓ Cloreto de sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- ✓ Acetato de sódio anidro (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Citrato de sódio diidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Hidrogenocitrato de sódio sesquidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Sorvente Bondesil C<sub>18</sub> com d.p. de 40 µm (Agilent, EUA);
- ✓ Sorvente Bondesil PSA com d.p. de 40 µm (Agilent, EUA);
- ✓ Carvão Supelclean ENVI-Carb d.p 105-125 µm (SUPELCO, EUA);
- ✓ Acetona grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- ✓ Hexano (95% n-hexano) (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Filtros de nylon de 13 mm e porosidade de 0,2 µm (Vertical, Tailândia);
- ✓ Frascos de vidro (vial), capacidade de 2 mL (Agilent, EUA);
- ✓ Extran<sup>®</sup> neutro e alcalino (Merck, Brasil);
- ✓ Vidraria comum de laboratório.

### 3.3 Preparo das soluções analíticas dos compostos analisados

Os agrotóxicos analisados neste trabalho foram selecionados principalmente de acordo com os compostos que possuem LMRs estabelecidos para a matriz tomate na União Europeia (2016), no Codex Alimentarius (2013) e na Colômbia (Resolução 2906/07).

Os padrões foram preparados individualmente através das soluções analíticas estoque 1000 mg L<sup>-1</sup> de cada composto, considerando a pureza dos padrões sólidos (todos com pureza ≥ 93%). A massa do padrão sólido pesado foi dissolvida em acetonitrila e as soluções estoque foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura de -18 °C. A partir destas soluções, preparou-se uma mistura contendo todos os agrotóxicos na concentração 10 mg L<sup>-1</sup>, e uma mistura 1 mg L<sup>-1</sup>, ambas em acetonitrila.

Para injeção no sistema UHPLC-MS/MS, foram preparadas soluções nas concentrações 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0 µg L<sup>-1</sup>, em acetonitrila e no extrato da matriz. Por fim, foram realizadas diluições destas soluções na proporção 1:4 (v/v) em água ultrapura, da mesma forma que é efetuado para as amostras, resultando

nas concentrações finais de 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A Tabela 6 apresenta informações dos compostos analisados, com suas respectivas purezas, classe, grupo químico, fórmula molecular, pKa e  $\log K_{ow}$ .

Tabela 6 - Informações dos compostos utilizados neste trabalho, com suas respectivas classes, grupo químico, fórmula molecular, pKa e logK<sub>ow</sub>

Analitos	Classe	Grupo Químico	Fórmula Molecular	pKa	logK <sub>ow</sub>
Abamectina	Ac/I/N	Avermectina	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub> + C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> O <sub>14</sub>	-	4,4
Atrazina (PC)	H	Triazina	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub>	1,7	2,7
Azinfós metílico	I	Organofosforado	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	5	2,96
Azoxistrobina	F	Estrobilurina	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	-	2,5
Benalaxil	F	Ácido acilamino	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	-	3,54
Bitertanol	F	Triazol	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	-	4,1
Carbaril	I	Carbamato de naftila	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	10	2,36
Carbendazim	F	Benzimidazol	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	4,2	1,48
Carbofuram	Ac/I/N	Carbamato	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	-	1,8
Cimoxanil	F	Cianoacetamida oxima	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	9,3	0,67
Ciprodinil	F	Anilinopirimidina	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub>	4,44	4
Cletodim	H	Ciclohexanodiona	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> ClNO <sub>3</sub> S	4,47	4,14
Clorpirifós etílico	I	Organofosforado	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	-	4,7
Clorpirifós metílico	I	Organofosforado	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	-	4
Deltametrina	I	Piretroide	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Br <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	-	4,6
Diazinona	Ac/I	Organofosforado	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	2,6	3,69
Dimetoato	Ac/I	Organofosforado	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	-	0,704
Etefon	R	Organofosforado	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> ClO <sub>3</sub> P	2,82	-1,89
Etoprofós	Ac/N	Organofosforado	C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> O <sub>2</sub> PS <sub>2</sub>	-	2,99
Famoxadona	F	Oxazol	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-	4,65
Fempropatrina	Ac/I	Piretroide	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	-	6,04
Fenamifós	N	Organofosforado	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>3</sub> PS	-	3,3
Fenhexamida	F	Hidroxianilida	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	7,3	3,51
Hexitiazox	Ac	Carboxamida	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	-	2,67
Imidacloprido	I	Neonicotinoide	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	-	0,57
Indoxacarb	I	Oxadiazina	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	-	4,65
Malationa	I	Organofosforado	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> PS <sub>2</sub>	-	2,75
Metidationa	I	Organofosforado	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>3</sub>	-	2,57
Metoxifenoazida	I	Diacilhidrazina	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	3,72
Miclobutanil	I	Triazol	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub>	2,3	2,89
Oxamil	Ac/I/N	Carbamato	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	-2,11	-0,44
Penconazol	F	Triazol	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	1,5	3,72
Piraclostrobina	F	Metoxicarbamato	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-	3,99
Pirimicarbe	F	Carbamato	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	4,4	1,7
Profenofós	Ac	Organofosforado	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> BrClO <sub>3</sub> PS	-	1,7
Propamocarbe	F	Carbamato	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9,5	0,84
Propargito	Ac	Éster sulfito	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> S	-	5,7
Spinosad A	I	Lactona macrocíclica	C <sub>41</sub> H <sub>65</sub> NO <sub>10</sub>	8,1	4,0
Spinosad D	I	Lactona macrocíclica	C <sub>42</sub> H <sub>67</sub> NO <sub>10</sub>	7,87	4,5
Tebuconazol	F	Triazol	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O	-	3,7
Tebufenozida	I	Diazilhidrazina	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	4,25
Triadimefom	F	Triazol	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	-	3,18
Triadimenol	F	Triazol	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	-	3,18
Trifenilfosfato (PI)	RF	Organofosforado	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> P	-	4,59
Trifloxistrobina	F	Estrobilurina	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-	4,5

Onde: Ac = Acaricida; F = Fungicida; FR: Retardante de chama; H = Herbicida; I = Inseticida; N = Nematicida; PC = Padrão de controle; PI= Padrão Interno; R: Regulador de crescimento de plantas.

Fonte: <http://sitem.herts.ac.uk/aeu/iupac/>

### 3.3.1 Padrão interno e de substituição

Estes compostos são adicionados em diferentes estágios do procedimento analítico, anterior à extração (padrão de substituição, PS) e no extrato final (padrão interno, PI) e tem o objetivo de assegurar a execução correta do procedimento de extração e de análise no sistema cromatográfico, respectivamente. Desta forma os padrões utilizados, auxiliam na localização de fontes de erros, além de melhorar a robustez do método, corrigindo vários fatores dentro do procedimento analítico que pode ter um impacto sobre os resultados da análise (SANCO, 2013).

Utilizou-se como padrão interno o composto trifenilfosfato (TPP, do inglês *triphenylphosphate*) na concentração de 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O padrão de substituição, atrazina deuterada, foi adicionado nas amostras e nas fortificações na concentração de 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . A recuperação de atrazina nestes ensaios foi calculada através de uma curva preparada no extrato da matriz “branco” na concentração referente a cada um dos pontos de calibração.

Os resultados não foram empregados para quantificação de nenhum dos analitos, apenas para a verificação da resposta do equipamento e avaliação do procedimento de extração respectivamente.

### 3.3.2 Amostras de *fisalis*

As amostras “branco” de *fisalis* utilizadas para a otimização e a validação do método foram cultivadas isentas dos compostos avaliados, em uma propriedade rural localizada na cidade de Santa Maria (RS).

As frutas inteiras, sem pedúnculo e cálice, foram processadas e homogeneizadas com auxílio de um processador de alimentos, conforme descrito no *Codex Alimentarius*. Após o processamento, as amostras foram armazenadas em potes individuais de polipropileno devidamente identificados, e mantidas em freezer (abaixo de - 10 °C) até a sua utilização.

Na etapa de aplicabilidade do método foram adquiridas 16 amostras comerciais de *fisalis*, 2 cultivadas no estado do Rio Grande do Sul (Brasil) e 14 importadas da Colômbia.



### 3.4 Condições otimizadas no sistema UHPLC-MS/MS

Os testes foram realizados UHPLC-MS/MS, pois esta técnica fornece vantagens significativas com relação à detectabilidade, seletividade e velocidade de análise. Além disso, a capacidade de medir compostos a níveis de traços e diferenciar moléculas com diferentes massas e padrões de fragmentação fazem da UHPLC-MS/MS uma poderosa ferramenta analítica (QUEIROZ, 2012).

Os parâmetros relacionados às condições de ionização de cada composto foram obtidas segundo KEMMERICH *et al.* (2015) e ORSO *et al.* (2015). A seguir estão descritas as condições utilizadas para a otimização do método e análise dos agrotóxicos em amostras de *Physalis* por análise em UHPLC-MS/MS.

- Temperatura da coluna: 40 °C;
- Voltagem do capilar: 2,0 kV;
- Temperatura de dessolvatação: 500 °C;
- Vazão do gás de dessolvatação: 600 L h<sup>-1</sup>;
- Vazão do *spray*: 80 L h<sup>-1</sup>;
- Vazão do gás de colisão: 0,15 mL min<sup>-1</sup>;
- Temperatura da fonte: 150 °C;
- Volume de injeção: 10 µL.
- Tempo de residência (dwell time): 0,01 s.

Com o objetivo de otimizar as condições de análise de cada um dos agrotóxicos estudados, primeiramente fez-se o uso do banco de dados “*Quanpedia*”, onde constam informações dos compostos, tais como: íons precursores e íons produtos, energias de colisão e energias do cone. Para os compostos inexistentes neste banco de dados, foram realizadas injeções diretas (infusões) no MS com soluções analíticas individuais dos analitos na concentração 100 µg L<sup>-1</sup>.

A partir destas infusões, realizou-se o monitoramento dos íons característicos de cada composto no quadrupolo 1 (Q1) e a varredura do íon produto no quadrupolo 3 (Q3), variando-se as energias de colisão. Assim, selecionou-se o modo de ionização da fonte (ESI+), voltagem do capilar e as energias de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos.

Em seguida, o sistema cromatográfico operou no modo SRM para que fossem avaliadas as transições a serem utilizadas para a quantificação (transição de maior

intensidade) e para a confirmação (segunda de maior intensidade) dos compostos estudados. Finalmente, realizou-se a análise de uma mistura contendo todos os agrotóxicos na concentração  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  em acetonitrila, a fim de verificar o tempo de retenção dos analitos e a intensidade do sinal analítico.

### 3.4.1 Escolha da fase móvel e gradiente

De acordo com estudos anteriores, fases móveis contendo os aditivos ácido fórmico e formiato de amônio fornecem melhores resultados para a análise de resíduos de pesticidas empregando UHPLC-MS/MS, aumentando a eficiência de ionização (KEMMERICH et al., 2015; RIZZETTI et al., 2016). Sendo assim, a fase móvel empregada neste trabalho consistiu em: A) água:metanol (98:2, v/v) e B) metanol, ambas contendo ácido fórmico 0,1% (v/v) e formiato de amônio  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ , conforme o gradiente descrito na Tabela 7. A vazão foi mantida constante em  $0,225 \text{ mL min}^{-1}$ , com volume de injeção de  $10 \mu\text{L}$  e tempo total de corrida de 10 min.

Tabela 7 - Gradiente da fase móvel utilizado no sistema UHPLC-MS/MS para determinação de resíduos de agrotóxicos em *Physalis*

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

### 3.5 Otimização do método QuEChERS para a determinação de resíduos de agrotóxicos em *fisalis* por UHPLC-MS/MS

Diferentes versões do método QuEChERS (original, acetato e citrato) (PRESTES *et al.*, 2009) foram testados em *fisalis* a fim de avaliar o melhor procedimento de preparo de amostra em termos de recuperações e efeito matriz.

#### 3.5.1 Extração

Para os testes de extração, foram pesados  $5,0 \pm 0,1$  g de amostra em um tubo de polipropileno de 50 mL. Após, realizou-se fortificação ( $n=6$ ) no nível de  $25 \mu\text{g kg}^{-1}$  e agitou-se em vortex por 1 min. Posteriormente, o solvente de extração foi adicionado e realizou-se novamente a agitação em vortex por 1 min. Em seguida, acrescentaram-se quantidades adequadas de sais para cada procedimento: QuEChERS original (Teste 1, T1): 5 mL de acetonitrila; 2,0 g de  $\text{MgSO}_4$  e 0,5 g de NaCl; QuEChERS acetato (Teste 2, T2): 5 mL de acetonitrila com 1% (v / v) de ácido acético; 2,0 g de  $\text{MgSO}_4$  e 0,5 g de  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , e QuEChERS citrato (Teste 3, T3): 5 mL de acetonitrila; 2,0 g de  $\text{MgSO}_4$ , 0,5 g de NaCl, 0,5 g de citrato de sódio diidratado e 0,25 g de hidrogenocitrato sesquidrato de sódio.

#### 3.5.2 Limpeza

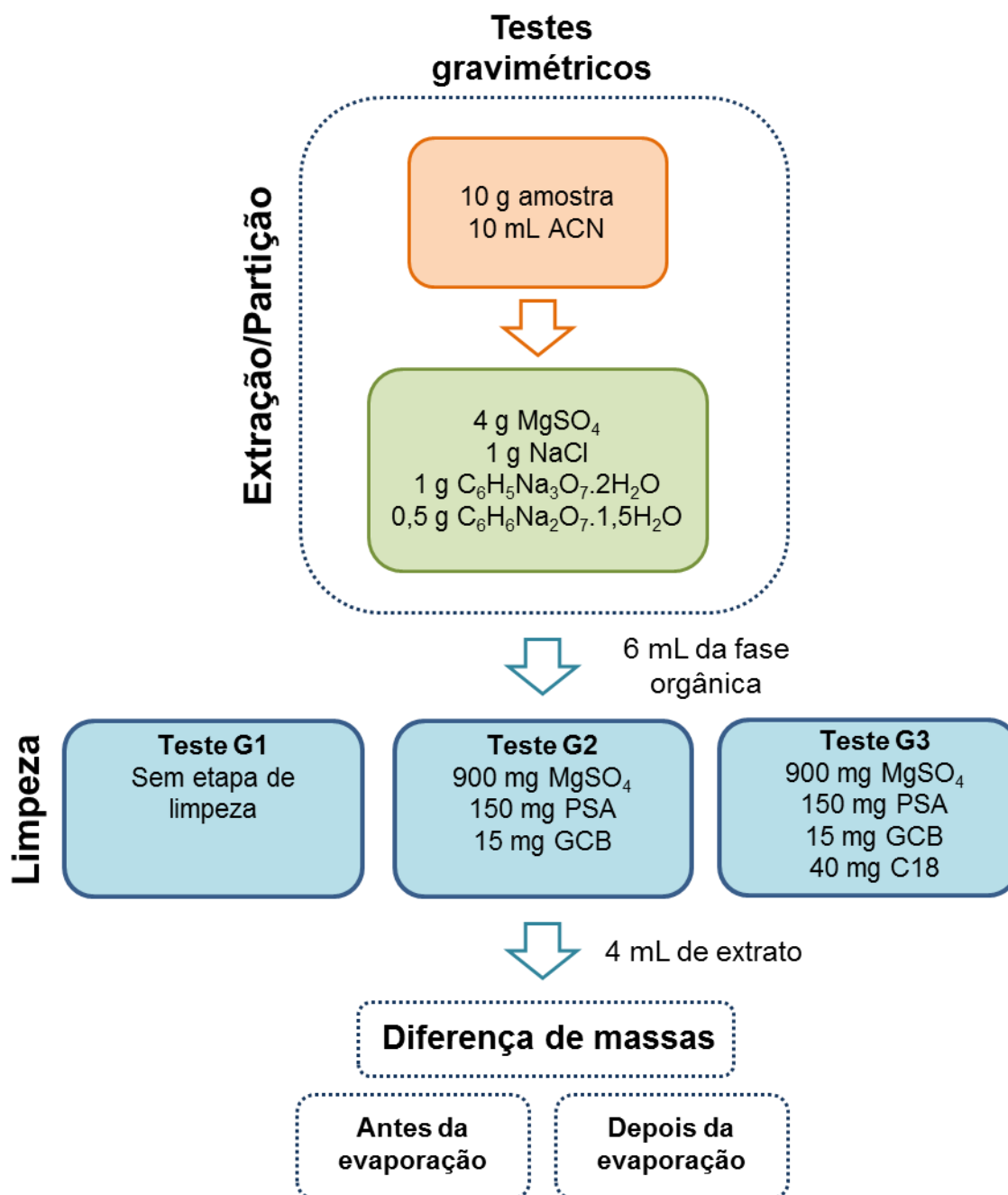
Após a adição dos sais, os tubos foram agitados durante 1 min e centrifugados a 3400 rpm durante 8 min, a  $10^\circ\text{C}$ . Diferentes procedimentos foram testados na etapa de limpeza (*clean-up*) dos três métodos de extração para 1 mL de extrato: *clean-up* 1 (C1): 150 mg de  $\text{MgSO}_4$  e 25 mg de PSA, aplicados para QuEChERS original e citrato; *clean-up* 2 (C2): 150 mg de  $\text{MgSO}_4$  e 50 mg de PSA foi usado para QuEChERS acetato, e *clean-up* 3 (C3): 150 mg de  $\text{MgSO}_4$ , 25 mg de PSA, 25 mg de C18 e 2,5 mg de GCB.

#### 3.5.3 Otimização da quantidade de C18

Para verificar a influência do sorvente octadecilsilano (C18) na etapa de limpeza dos extratos, foram realizados os seguintes testes gravimétricos ( $n=6$ ): sem *clean-up* (G1), sem C18 no *clean-up* (G2) e com 40 mg de C18 no *clean-up* (G3).

Para isso, transferiu-se 4 mL do sobrenadante para um tubo cônico (previamente pesado em uma balança analítica) e evaporou-se o solvente com o auxílio de uma corrente de nitrogênio. Posteriormente, obteve-se a diferença entre as massas (antes e após a evaporação), conforme mostrado na Figura 6.

Figura 6 - Representação do teste gravimétrico utilizado para a otimização da etapa de limpeza



Entretanto, a quantidade de C18 deve ser otimizada uma vez que pode influenciar na recuperação dos compostos de interesse. A escolha da quantidade apropriada de C18 foi realizada através da comparação das recuperações no nível de fortificação de  $25 \mu\text{g kg}^{-1}$  ( $n= 3$ ) com três quantidades de sorvente C18 na etapa de limpeza: (teste A) 150 mg; (teste B) 75 mg; e (teste C) 25 mg.

### 3.6 Validação do método para a análise de resíduos de agrotóxicos em *ficus*

Os parâmetros utilizados neste trabalho para a validação do método analítico foram: seletividade; curva analítica e faixa linear; limites de detecção e quantificação; efeito matriz; exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária).

#### 3.6.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando os cromatogramas obtidos com as injeções no sistema UHPLC-MS/MS de extratos de amostras “branco”, ou seja, ausente dos compostos em estudo e da amostra fortificada com estes compostos.

#### 3.6.2 Curva Analítica e Faixa Linear

As curvas analíticas foram preparadas no solvente e no extrato da matriz de *ficus*, em 6 níveis de concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 20,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . As curvas analíticas foram injetadas em triplicata e posteriormente avaliou-se o coeficiente de determinação ( $r^2$ ). Os dados de regressão foram obtidos com auxílio do software (*MassLynx V 4.1*) do equipamento.

#### 3.6.3 Efeito Matriz

A avaliação do efeito matriz realizou-se pela comparação entre as inclinações das curvas analíticas dos padrões no solvente (acetonitrila) e aquelas obtidas com soluções analíticas preparadas no extrato da matriz. O critério de validação para efeito matriz é  $\pm 20\%$  (SANTE, 2015). O cálculo será efetuado através da Equação 1:

$$\text{Efeito matriz} = \left( \frac{X_1 - X_2}{X_2} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

$X_1$  = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em extrato da matriz.

$X_2$  = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em solvente (acetonitrila).

### 3.6.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de quantificação do método  $LOQ_m$  em  $\mu\text{g kg}^{-1}$  foram estabelecidos experimentalmente como a menor concentração da matriz fortificada que apresentou resultados de recuperações entre 70 e 120%, com RSD% menor ou igual a 20%, de acordo com SANCO (2013). Os valores de  $LOD_m$  foram obtidos dividindo-se o valor de  $LOQ_m$  por 3,33. O limite de detecção do instrumento ( $LOD_i$ ) e o limite de quantificação do instrumento ( $LOQ_i$ ) foram obtidos considerando a diluição final de 1:4 (v/v), realizada no final da etapa de preparo de amostra.

### 3.6.5 Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão

Para o estudo da exatidão do método, foram utilizados ensaios de fortificação, avaliando-se dessa maneira, a recuperação dos compostos em estudo. Foram realizadas fortificações das amostras “branco” em três níveis de concentração (5, 10 e 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e 6 replicatas para cada nível de fortificação.

A exatidão, expressa em percentagem de recuperação foi calculada com o auxílio do *software* (*MassLynx V 4.1*) do equipamento. Conforme recomendações do guia de validação do INMETRO (2011), o cálculo de recuperação é feito de acordo com a Equação 2.

$$\text{Recuperação (\%)} = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde:

$C_1$  = Concentração determinada na amostra fortificada;

$C_2$  = Concentração determinada na amostra não fortificada;

$C_3$  = Concentração usada para fortificação.

### 3.6.6 Precisão (repetitividade) e Precisão intermediária

A precisão pode ser calculada através da fórmula do desvio padrão relativo (RSD), de acordo com a Equação 3:

$$RSD (\%) = \left( \frac{s}{\bar{X}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde:

s = estimativa de desvio padrão absoluto =  $\{\sum(x_i - x_m)^2/n-1\}^{1/2}$ ;

$x_i$  = valores individuais;

$\bar{X}$  = média das medidas em replicatas;

n = número de medidas.

A precisão do método, em termos de repetitividade ( $RSD_r$ ) foi efetuada procedendo-se a extração e análise das amostras fortificadas, sendo realizadas em replicata (n= 6) para cada nível de concentração, injetada uma única vez.

A precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ) do método foi realizada através da injeção de três níveis de fortificação, nas concentrações 5; 10 e 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  em dias diferentes em relação à repetibilidade do método. Foram considerados resultados significativamente iguais aos valores que não apresentaram diferença estatística no nível de 5%.

### 3.7 Aplicação do método

O método desenvolvido foi validado e aplicado na determinação de resíduos de agrotóxicos em 16 amostras de *fisalis*, sendo 14 importadas da Colômbia e 2 cultivadas no estado do Rio Grande do Sul (RS).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Condições cromatográficas

A Tabela 8 apresenta as condições cromatográficas utilizadas na separação dos agrotóxicos avaliados neste estudo.

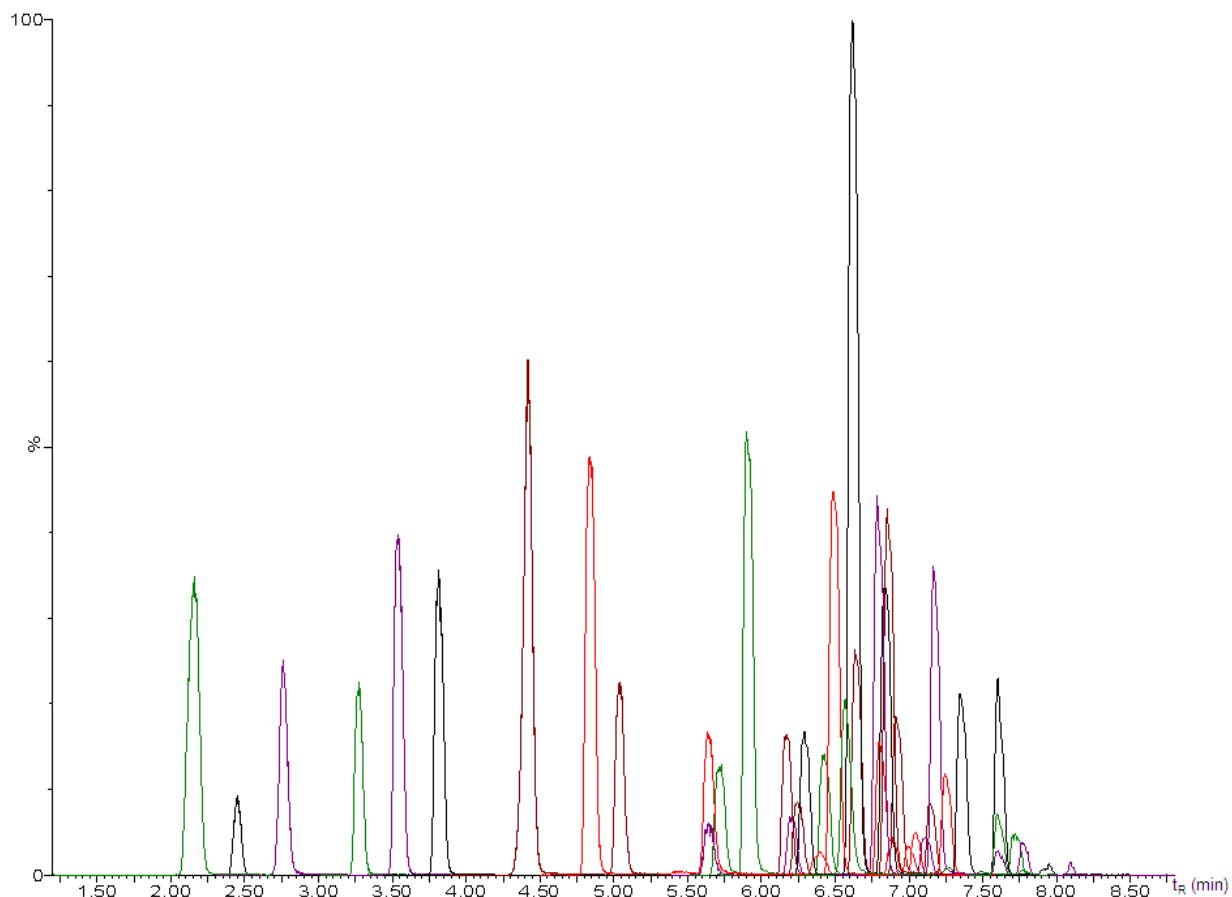
Tabela 8 - Condições empregadas no sistema cromatográfico UHPLC-MS/MS para a validação do método proposto

PARÂMETROS	UHPLC-MS/MS
Coluna analítica	ACQUITY UPLC <sup>®</sup> BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)
Fase móvel	Água:metanol (98:2, v/v), acidificada com 0,1% de ácido fórmico e 5mM de formiato de amônio (A) e metanol acidificado com 0,1% de ácido fórmico e 5mM de formiato de amônio (B)
Gradiente de eluição	95% (A) e 5% (B) de 0 a 0,25 min, alternando até atingir 100% (B) em 7,75 min (permanecendo até 8,50 min); alternando até 95% (A) e 5% (B) em 8,51 min (permanecendo até 10 min)
Vazão da fase móvel	0,225 mL min <sup>-1</sup>
Volume de injeção	10 µL
Fonte de ionização	ESI
Detector	Espectrômetro de massas, do tipo triplo quadrupolo, operando no modo MS/MS

Na Figura 7 está representado o cromatograma da amostra branco fortificada na concentração 20 µg L<sup>-1</sup>. Apesar de alguns compostos terem coeluído em tempos de retenção muito próximos, a utilização do UHPLC-MS/MS proporcionou alta seletividade e eficiência de separação, bem como a informação estrutural. Sendo assim, foi possível a identificação e quantificação de todos os compostos em estudo.



Figura 7 - Cromatograma de um nível de fortificação de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  na amostra de fisis, obtido por UHPLC-MS/MS



A Tabela 9 apresenta os agrotóxicos que foram analisados por UHPLC-MS/MS, utilizando o modo de ionização ESI (+), no modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ), íons precursores, íons produto e energia de colisão das transições monitoradas.

Para cada composto foram selecionadas duas transições: a transição mais intensa (utilizada para quantificação) e a segunda transição mais intensa (utilizada para confirmação).

Tabela 9 - Agrotóxicos analisados com seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ), íons precursores, íons produtos e energia de colisão (EC) das transições monitoradas

Compostos	$t_R$ (min)	Transições SRM, m/z (EC, eV)	
		Quantificação	Confirmação
Propamocarbe	2,09	189>102 (17)	189>144 (12)
Oxamil	2,40	237>90 (10)	237>72 (10)
Carbendazim	2,70	192>160 (28)	192>132 (18)
Imidacloprido	3,22	256>209 (20)	256>175 (15)
Dimetoato	3,56	230>199 (20)	230>125 (10)
Cimoxanil	3,76	199>128 (18)	199>111 (8)
Pirimicarbe	4,37	239>182 (21)	239>72 (16)
Carbofuram	4,79	222>165 (16)	222>123 (16)
Carbaril	5,00	202>145 (28)	202>117 (22)
Etefon	5,61	145>85 (8)	145>73 (14)
Metidationa	5,61	303>145 (20)	303>85 (10)
Azinfós metílico	5,69	318>261 (8)	318>160 (8)
Azoxistrobina	5,89	404>372 (30)	404>329 (15)
Malationa	6,17	331>99 (24)	331>127 (12)
Metoxifenoazida	6,21	369>149 (18)	369>313 (8)
Triadimefom	6,25	294>197 (20)	294>69 (15)
Miclobutanil	6,30	289>125 (18)	289>70 (15)
Triadimenol	6,39	296>70 (10)	296>99 (15)
Fenhexamid	6,43	302>55 (38)	302>97 (22)
Etoprofos	6,49	243>131 (31)	243>97 (20)
Ciprodinil	6,58	226>93 (33)	226>108 (25)
Fenamifós	6,63	304>217 (36)	304>202 (24)
Tebufozida	6,67	353>297 (20)	353>133 (8)
Atrazina (PC)	6,82	216>174 (18)	216>96 (23)
Penconazol	6,82	284>159 (16)	284>70 (34)
Tebuconazol	6,83	308>125 (22)	308>125 (40)
Benalaxil	6,86	326>148 (34)	326>91 (20)
Diazinona	6,88	305>169 (35)	305>97 (22)
Famoxadona	6,91	392>331 (18)	392>238 (8)
Piraclostrobina	6,94	388>194 (25)	388>163 (12)
Trifenilfosfato (PI)	6,93	327>215 (37)	327>152 (28)
Bitertanol	7,02	338>99 (8)	338>70 (16)
Spinosad A	7,02	733>142 (59)	733>98 (31)
Clorpirifós metílico	7,15	322>290 (20)	322>125 (16)
Indoxacarbe	7,18	528>203 (22)	528>150 (40)
Trifloxistrobina	7,21	409>145 (40)	409>186 (16)
Spinosad D	7,26	747>142 (53)	747>98 (31)
Cletodim	7,29	360>268 (18)	360>164 (12)
Profenofós	7,39	373>303 (40)	373>128 (20)
Clorpirifós etílico	7,65	350>198 (32)	350>97 (20)
Hexitiazox	7,65	353>228 (26)	353>168 (14)
Propargito	7,78	368>175 (15)	368>271 (15)
Fempropatrina	7,82	350>125 (34)	350>97 (14)
Deltametrina	7,97	523>281 (18)	523>506 (11)
Abamectina	8,18	891> 305 (30)	891>567 (25)

## 4.2 Avaliação do método QuEChERS modificado para a análise de resíduos de agrotóxicos em *fisalis*

Primeiramente realizou-se testes com as diferentes versões de QuEChERS a fim de verificar qual o procedimento seria mais adequado em termos de recuperação de um maior número de resíduos de agrotóxicos (70 - 120%, RSD  $\leq$  20%). Os extratos obtidos não foram considerados limpos o suficiente para a injeção no UHPLC-MS/MS, uma vez que estavam muito pigmentados, e a presença de coextractivos pode afetar a resposta do sistema cromatográfico. Além disso, podem ser necessárias manutenções técnicas mais frequentes no equipamento. Desta forma, a limpeza dos extratos torna-se essencial para promover a robustez e confiabilidade dos resultados. Aumentando a eficiência da etapa da limpeza, o efeito matriz é reduzido (PINHO *et al.*, 2009).

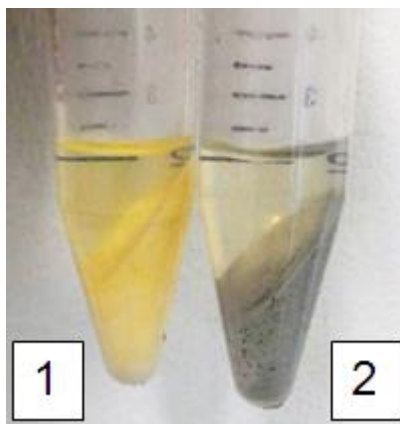
Para a otimização da etapa de limpeza foi necessário empregar os sorventes C18 (25 mg por mL) e carvão grafitizado (2,5 mg por mL), além dos utilizados nas versões do método QuEChERS.

A matriz *fisalis* contém 2% de óleo, dos quais 1,8% são provenientes das sementes e 0,2% da casca da fruta (RAMADAN & MORSEL, 2003). Deste modo foi necessária a utilização de C18 para remover de forma eficaz os interferentes apolares, como por exemplo, ácidos graxos e lipídeos (BORGES, FIGUEIREDO & QUEIROZ, 2015). Além disso, esse sorvente auxilia na remoção de amido e açúcar de algumas amostras (KOESUKWIWAT, 2010).

O uso de PSA na etapa de limpeza é essencial, pois a *fisalis* apresenta 19,6% de carboidratos (RESTREPO *et al.*, 2014). O sorvente PSA pode remover ácidos graxos, açúcares, alguns pigmentos e outros coextractivos que formam ligações de hidrogênio (MASTOVSKÀ *et al.*, 2004).

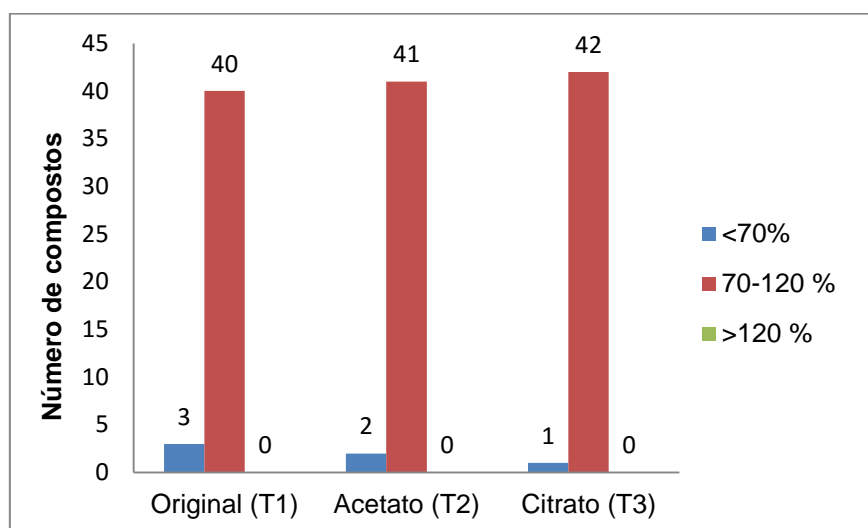
A *fisalis* também contém em sua composição 1,6% de carotenoides (pigmentos). A utilização de carvão grafitizado é necessária para reduzir o teor de pigmentos responsáveis pela cor aralaranjada do *fisalis* e também auxilia na remoção de coextractivos apolares (LEHOTAY *et al.*, 2010) (Figura 8).

Figura 8 - Representação da etapa de limpeza: 1) extrato com PSA e MgSO<sub>4</sub>; 2) extrato com PSA, MgSO<sub>4</sub>, C18 e GCB



Para avaliar quais dos três métodos QuEChERS apresentaram as melhores recuperações para os compostos em estudo foram utilizadas amostras “branco” de fisalis. A avaliação foi feita em triplicata fortificando a matriz na concentração de 20 µg kg<sup>-1</sup>. A Figura 9 mostra os resultados obtidos.

Figura 9 - Resultados de recuperação obtidos nos testes de extração T1, T2 e T3



Ao comparar as três versões do método QuEChERS, observou-se que os resultados foram satisfatórios e muito similares. As melhores recuperações foram obtidas com os testes T1 e T3, sendo que com o T1, 93% dos compostos apresentaram resultados satisfatórios, enquanto o T3 mostrou-se adequado para 98% dos compostos. A única exceção foi o propamocarbe (recuperação média de 56

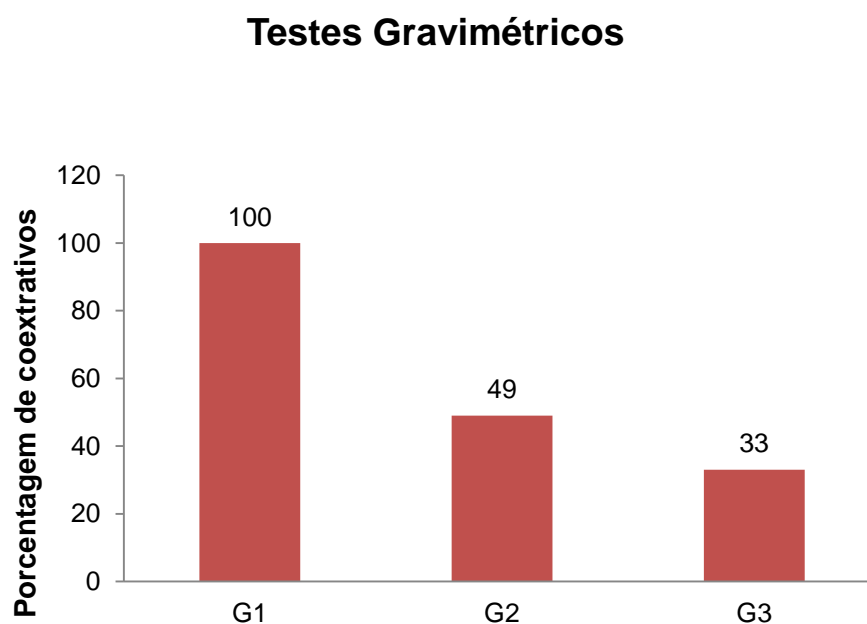
e RSD de 3,8%), o qual é considerado um composto instável por sofrer fotodegradação (BURROWS *et al.*, 2002).

Os melhores resultados para o T3 podem ser explicados pela acidez da matriz fisalis (pH de aproximadamente 3,5) o que dificulta a extração de alguns analitos suscetíveis ao pH ácido. No entanto, é indispensável promover um efeito tamponante (aumentar o pH). No T3 a mistura de citrato de sódio di-hidratado ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ) e hidrogenocitrato sesqui-hidratado ( $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1,5H_2O$ ) eleva o pH para valores entre 5,0 e 5,5 o qual facilita a extração de compostos suscetíveis a pH baixos (PRESTES *et al.*, 2011).

O extrato proveniente do teste T2 apresentou recuperações entre 70-120% para 95% dos compostos analisados. Apesar da boa recuperação, este teste não é considerado uma boa opção de extração devido à evidência de turbidez.

A partir da realização dos testes gravimétricos (n=3), obtiveram-se as médias, as quais estão apresentadas na Figura 10. Pode-se observar que a adição de C18 na etapa de limpeza é essencial para a remoção dos coextrativos, visto que foi o teste G3 apresentou uma menor porcentagem de coextrativos (33%) em relação ao teste G2 (49%), no qual não foi adicionado este sorvente. O teste G1 foi utilizado apenas para fins de comparação.

Figura 10 - Resultados de porcentagem de coextrativos obtidos nos testes gravimétricos, onde G1: sem etapa de limpeza, G2: etapa de limpeza sem C18 e G3: etapa de limpeza com 25 mg/ 4mL)

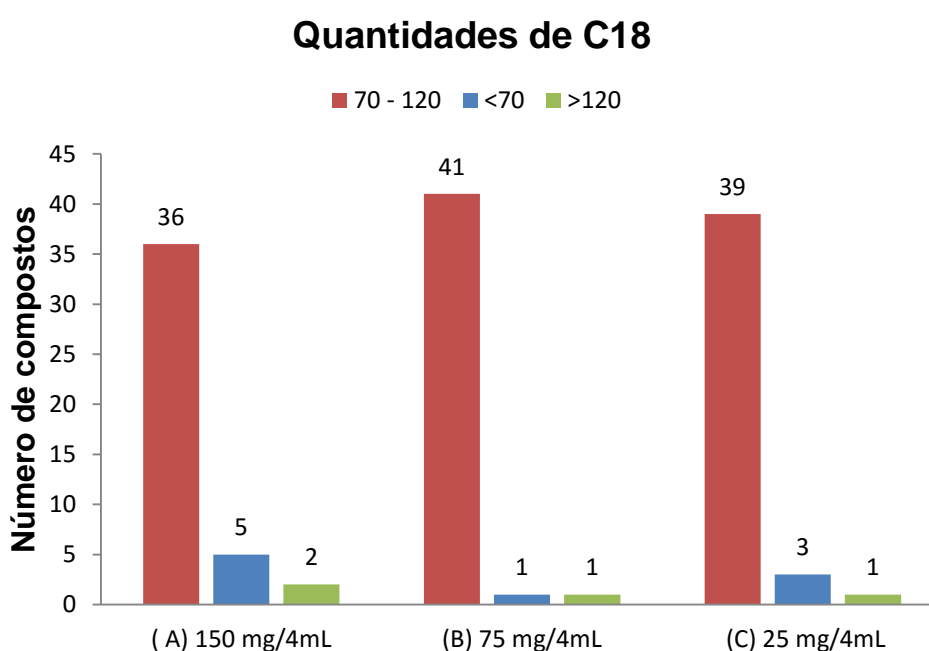


O sorvente C18 é conhecido pela alta remoção de compostos apolares, no entanto, a quantidade deste sorvente pode influenciar a recuperação dos compostos de interesse. A partir dos testes realizados para determinar a quantidade apropriada de C18, pode observar que 84% dos compostos analisados no Teste A tiveram recuperações entre 70 e 120%. No teste de B, 95% dos compostos foram recuperados e no Teste C, 91%, conforme Figura 11.

Após a avaliação dos testes, optou-se pelo teste B o qual apresentou boas recuperações com uma quantidade intermediária de C18. Desta forma, pode-se atingir uma remoção eficaz dos coextractivos sem interferir na recuperação dos analitos. Portanto, para a etapa de validação, fez-se a adição de 20 mg de C18/mL de extrato.

Restrepo *et al.* (2014) utilizou o método QuEChERS citrato para a determinação de resíduos de agrotóxicos em físalis por GC-MS. Com a etapa de limpeza otimizada (150 mg de MgSO<sub>4</sub>, 25 mg de C18 e 25 mg de PSA/mL de extrato), apenas 28 dos 46 pesticidas em estudo apresentaram uma recuperação adequada. Comparado ao estudo de Restrepo *et al.*, o presente trabalho foi semelhante na etapa de limpeza exceto pela utilização de 2,5 mg de GCB e uma menor quantidade de C18 (20 mg).

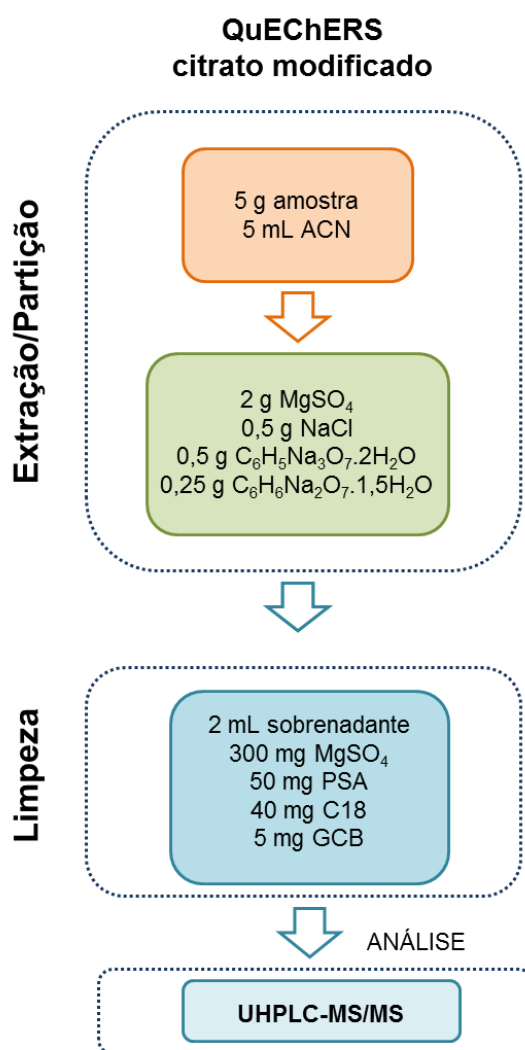
Figura 11 - Resultados de recuperação obtidos nos testes de limpeza (A, B e C) com diferentes quantidades do sorvente C18



### 4.3 Validação do método QuEChERS citrato otimizado

O método otimizado foi validado de acordo com o guia SANCO/12571/2013 (SANCO 2013). A validação do método QuEChERS foi realizada seguindo o procedimento descrito na Figura 12, para os agrotóxicos mostrados na Tabela 10. Todas as soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em acetonitrila (curva no solvente) e no extrato branco da matriz físalis (curva na matriz). Deste modo, foi possível avaliar: seletividade e linearidade, faixa de trabalho, efeito matriz, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária).

Figura 12 - Representação do método QuEChERS citrato modificado proposto para a extração de agrotóxicos em físalis



### 4.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi garantida, uma vez que não há interferentes com os mesmos íons de quantificação e confirmação nos mesmos tempos de retenção de cada agrotóxico nas amostras “branco”. Como na matriz não se identificou a presença de nenhum resíduo de agrotóxico acima do LOD do método, as amostras avaliadas foram utilizadas na confecção da curva analítica e nos ensaios de fortificação.

### 4.3.2 Linearidade, Faixa Linear e Efeito Matriz

Os coeficientes de determinação obtidos para as curvas preparadas em solvente e extrato branco da matriz, bem como o efeito matriz são apresentados na Tabela 10. O efeito matriz também pode ser observado na Figura 13.

Os compostos carbaril ( $r^2=0,9896$ ), cimoxanil ( $r^2=0,6092$ ), dimetoato ( $r^2=0,7823$ ), famoxadona ( $r^2=0,6873$ ), oxamil ( $r^2=0,9876$ ), spinosad A ( $r^2=0,9749$ ) e spinosad D ( $r^2=0,9828$ ) não atingiram o coeficiente de determinação necessário quando avaliados em relação à curva preparada no solvente. Assim, obrigatoriamente, estes compostos são quantificados através da curva preparada na matriz. Os compostos carbaril e oxamil poderiam ser quantificados pela curva preparada em solvente, já que apresentam menos de 20% de efeito matriz. Entretanto, os coeficientes de determinação em curva preparada no solvente não foram considerados ideais e, portanto, todas as quantificações foram realizadas através da curva preparada em extrato branco da matriz.



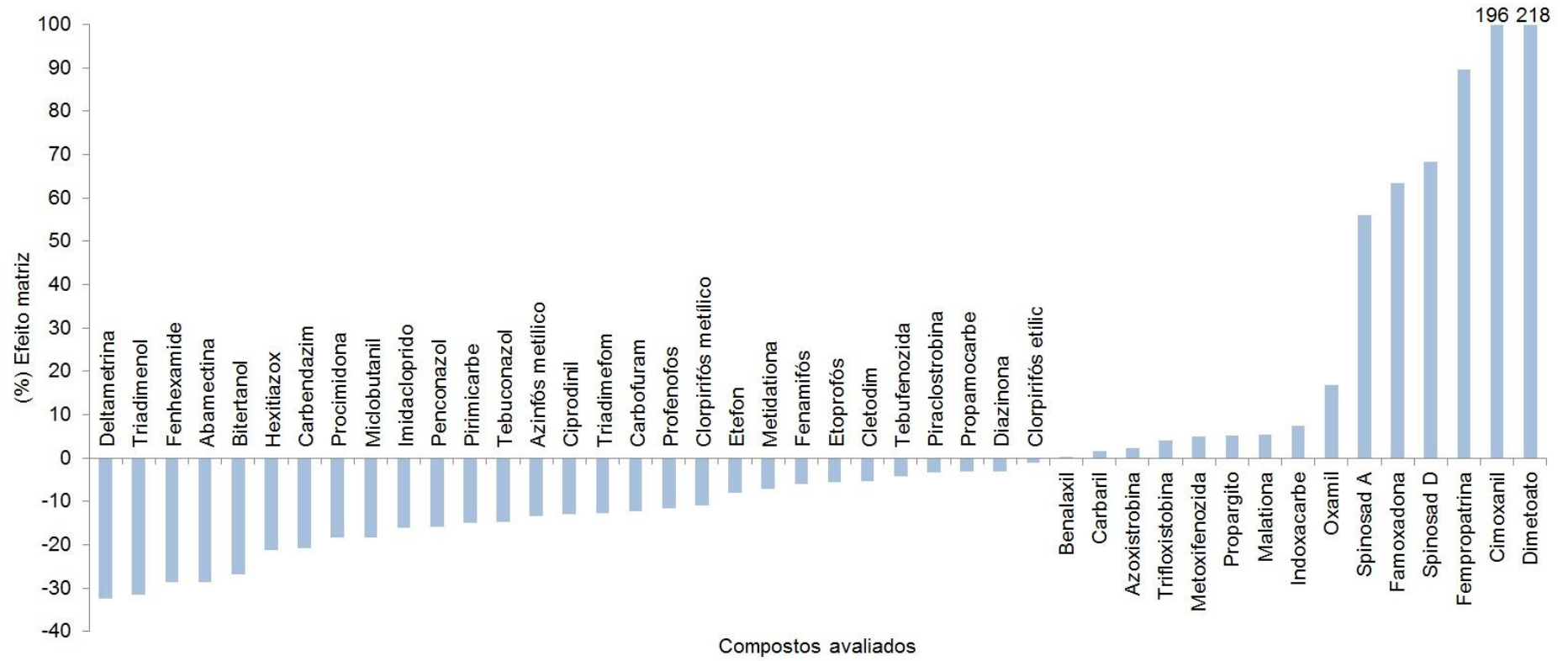
Tabela 10 - Coeficientes de determinação para curvas preparadas em solvente e extrato branco da matriz e efeito matriz obtidos para os compostos em estudo

Compostos	Curva no solvente	Curva na matriz	Efeito matriz (%)
Abamectina	0,9987	0,9910	-29
Azinfós metílico	0,9998	0,9980	-13
Azoxistrobina	0,9998	0,9983	2
Benalaxil	0,9998	0,9990	0
Bitertanol	0,9997	0,9905	-27
Carbaril	0,9886	0,9998	2
Carbendazim	0,9997	0,9999	-21
Carbofuram	0,9992	0,9998	-12
Cimoxanil	0,6092	0,9995	196
Ciprodinil	0,9998	0,9992	-13
Cletodim	0,9996	0,9986	-5
Clorpirifós etílico	0,9971	0,9987	-1
Clorpirifós metílico	0,9992	0,9988	-11
Deltametrina	0,9985	0,9949	-32
Diazinona	0,9997	0,9993	-3
Dimetoato	0,7823	0,9998	218
Etefon	0,9989	0,9987	-8
Etoprofós	0,9998	0,9988	-5
Famoxadona	0,6873	0,9950	63
Fempropatrina	0,9934	0,9967	90
Fenamifós	0,9998	0,9987	-6
Fenhexamide	0,9993	0,9988	-29
Hexitiazox	0,9977	0,9992	-21
Imidacloprido	0,9997	0,9996	-16
Indoxacarb	0,9967	0,9996	8
Malationa	0,9988	0,9966	6
Metidationa	0,9991	0,9989	-7
Metoxifenoziata	0,9965	0,9985	5
Miclobutanil	0,9997	0,9978	-18
Oxamil	0,9876	0,9991	17
Penconazol	0,9997	0,9993	-16
Piraclostrobina	0,9996	0,9983	-3
Pirimicarbe	0,9996	0,9998	-15
Profenofós	0,9999	0,9994	-12
Propamocarbe	0,9997	0,9998	-3
Propargito	0,9957	0,9968	5
Spinosad A	0,9749	0,9993	56
Spinosad D	0,9828	0,9981	68
Tebuconazol	0,9989	0,9979	-15
Tebufenozida	0,9993	0,9980	-4
Triadimefon	0,9978	0,9975	-13
Triadimenol	0,9988	0,9981	-31
Trifloxistobina	0,9993	0,9985	4

O efeito matriz causado pela influência de coextrativos presentes no extrato branco variou de -32% para deltametrina a 218% para dimetoato. Todos os compostos de interesse, com exceção de benalaxil, apresentaram efeito matriz. Para trinta compostos, o efeito matriz ficou na faixa entre -20 e +20%, sendo que os demais excederam estes limites. Considerando os coeficientes de determinação e os valores aceitáveis de efeito matriz ( $\pm 20\%$ , conforme SANTE, 2015) em ambas as curvas, no solvente e na matriz, um maior número de compostos pode ser analisado utilizando a curva preparada no extrato da matriz. Baseado nestes resultados empregou-se a curva no extrato na matriz para a validação.

Andrade *et al.* (2015) determinaram 57 resíduos de agrotóxicos em tomate empregando QuEChERS acetato e LC-MS/MS. Azoxistrobina, benalaxil, carbaril, carbofuran, clorpirifós etil, fenamifós, indoxacarbe, malation, oxamil, tebuconazole e trifloxistrobina apresentaram um efeito matriz menos pronunciado do que o método proposto para *Physalis*. Cinco compostos apresentaram valores mais elevados de efeito de matriz (cimoxanil, dimetoato, fenpropratrina, imidacloprido e triadimenol), enquanto para o composto pirimicarbe teve-se o mesmo valor (-15%) em ambas as matrizes.

Figura 13 – Representação do efeito matriz para os todos compostos avaliados em físalis por UHPLC-MS/MS



### 4.3.3 Exatidão e Precisão

Com exceção do composto propamocarbe, que apresentou recuperação média de 56% e RDS de 3,8%, o método validado forneceu resultados satisfatórios de recuperações (70 – 120%) e precisão (RSDs  $\leq 20\%$ ) para todos os compostos, em todos os níveis de fortificação (5, 10 e 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Para os ensaios de repetibilidade e de precisão intermediária, as recuperações variaram de 70 a 114%, com RSDs de 1 a 20%, conforme Tabela 11 e Figura 14. Em ambos os ensaios, propamocarbe apresentou recuperações entre 50 e 57% em todos os níveis. Este comportamento pode ser explicado devido à tendência deste composto à fotodegradação (BURROWS *et al.*, 2002).

Restrepo *et al.* (2014) obtiveram resultados semelhantes para a determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate, físalis e *tamarillo* por GC-MS. Entretanto, os autores obtiveram uma recuperação menor para carbaril (53,6%), quando comparada às recuperações obtidas no presente trabalho (87 a 97%). Ainda, os autores tiveram problemas com os compostos metalaxil e famoxadona, que não puderam ser validados devido à sobreposição com compostos provenientes da matriz. Os autores compararam os resultados de validação entre tomate, físalis e *tamarillo*; a diferença observada foi atribuída ao caráter mais ácido dos demais em relação ao tomate.

Em outro estudo, publicado em 2015, Andrade *et al.*, utilizando o método QuEChERS acetato (Lehotay *et al.*, 2010) para a determinação de agrotóxicos em tomate por LC-MS/MS, obtiveram recuperação semelhantes e desvios abaixo da faixa recomendada, exceto para clorpirifós etil, fempropatrina e trifloxistrobina. Golge & Kabak (2015) utilizaram QuEChERS acetato para a determinação multiclasse de 109 agrotóxicos em tomates por LC-MS/MS, obtendo recuperações entre 77,1% e 113,2%. Arias *et al.* (2014) também utilizaram o método QuEChERS acetato para a determinação de 24 resíduos de agrotóxicos em tomates frescos por LC-MS.

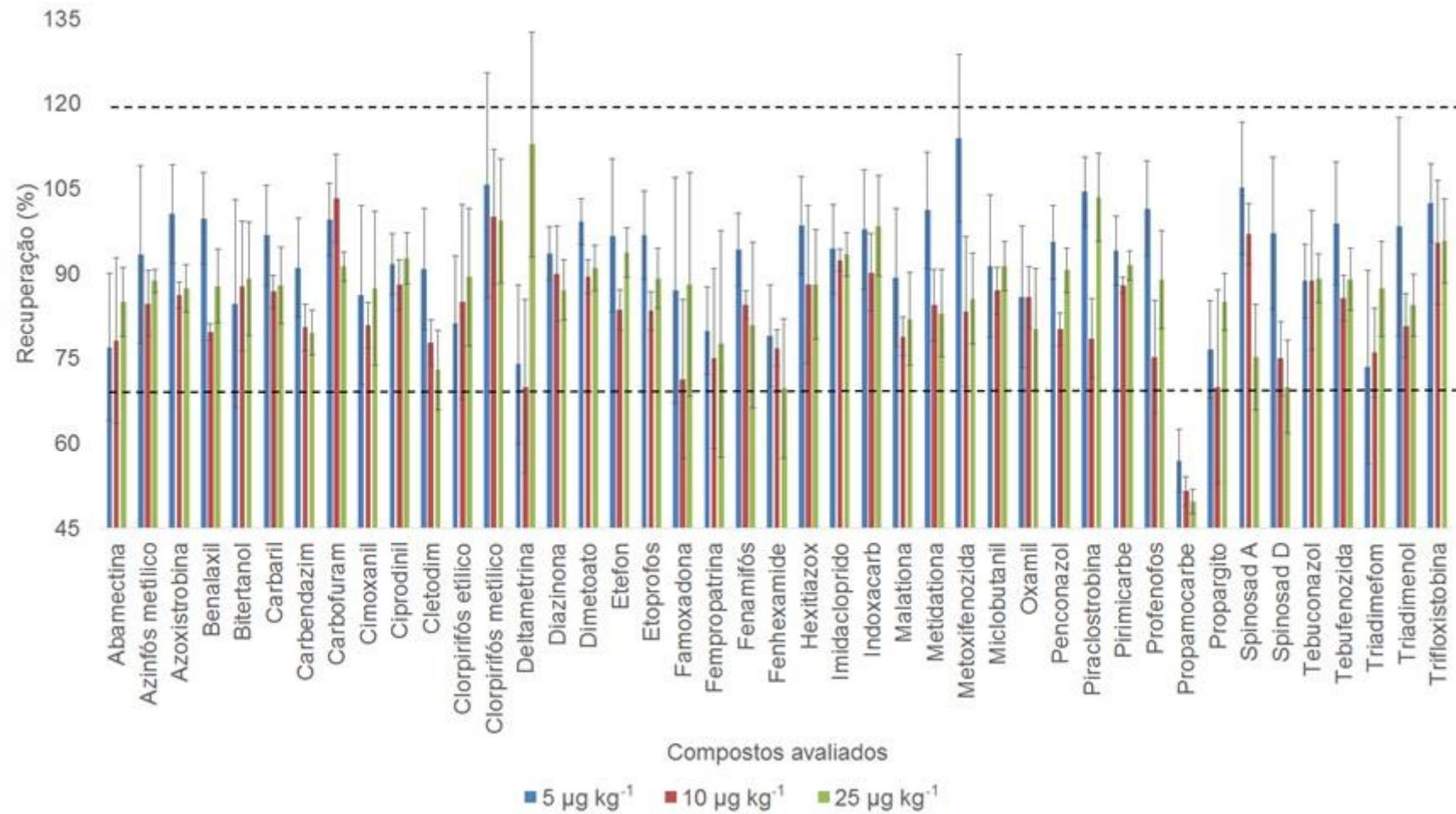
Os valores de LMRs estabelecidos ou adotados (do grupo do tomate) para físalis variam de 0,01 a 2  $\text{mg kg}^{-1}$  de acordo com o *Codex Alimentarius* (2013), de 0,01 a 5  $\text{mg kg}^{-1}$  pela Resolução 2906/07 (COLÔMBIA, 2007) e de 0,002 a 10,0  $\text{mg kg}^{-1}$  pela União Europeia (2016). Assim, como o LOQ<sub>m</sub> experimental (0,005  $\text{mg kg}^{-1}$ ) obtido neste trabalho está abaixo desses LMRs, com exceção do composto carbofuram (0,002  $\text{mg kg}^{-1}$ , de acordo com a União Europeia), o método proposto mostra-se adequado para o monitoramento dos compostos avaliados.

Propamocarbe apresentou recuperações entre 50 e 57%, mas pode-se dizer, conforme SANTE (2015), que este composto atingiu os critérios de validação, visto que apresentou valores satisfatórios de precisão ( $\leq 20\%$ ). Entretanto, os ensaios de exatidão e precisão devem ser avaliados regularmente.

Tabela 11 - Resultados de recuperação (R) e RSD para os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária realizados em níveis de concentração entre 5 e 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ 

Compostos	Níveis de repetibilidade ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )			Precisão interm. ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		
	5	10	25	5	10	25
	R $\pm$ RSD (%)			R $\pm$ RSD (%)		
Abamectina	77 $\pm$ 13	78 $\pm$ 15	85 $\pm$ 6	77 $\pm$ 13	94 $\pm$ 11	81 $\pm$ 10
Azinfós metílico	93 $\pm$ 16	85 $\pm$ 6	89 $\pm$ 2	93 $\pm$ 11	84 $\pm$ 8	89 $\pm$ 2
Azoxistrobina	101 $\pm$ 9	86 $\pm$ 2	87 $\pm$ 4	101 $\pm$ 16	74 $\pm$ 4	87 $\pm$ 4
Benalaxil	100 $\pm$ 8	80 $\pm$ 1	88 $\pm$ 7	100 $\pm$ 9	86 $\pm$ 8	88 $\pm$ 7
Bitertanol	85 $\pm$ 18	88 $\pm$ 11	89 $\pm$ 10	81 $\pm$ 8	89 $\pm$ 15	89 $\pm$ 10
Carbaril	97 $\pm$ 9	87 $\pm$ 3	88 $\pm$ 7	97 $\pm$ 18	89 $\pm$ 10	88 $\pm$ 7
Carbendazim	91 $\pm$ 9	80 $\pm$ 4	80 $\pm$ 4	91 $\pm$ 6	80 $\pm$ 12	80 $\pm$ 4
Carbofuram	99 $\pm$ 6	103 $\pm$ 8	91 $\pm$ 2	99 $\pm$ 9	99 $\pm$ 16	91 $\pm$ 2
Cimoxanil	86 $\pm$ 16	81 $\pm$ 4	87 $\pm$ 14	86 $\pm$ 5	83 $\pm$ 15	87 $\pm$ 14
Ciprodinil	92 $\pm$ 5	88 $\pm$ 4	93 $\pm$ 5	92 $\pm$ 9	73 $\pm$ 3	93 $\pm$ 5
Cletodim	91 $\pm$ 11	78 $\pm$ 4	73 $\pm$ 7	91 $\pm$ 4	90 $\pm$ 16	73 $\pm$ 7
Clorpirifós etílico	81 $\pm$ 12	85 $\pm$ 17	89 $\pm$ 12	81 $\pm$ 16	99 $\pm$ 17	89 $\pm$ 12
Clorpirifós metílico	106 $\pm$ 20	100 $\pm$ 12	99 $\pm$ 11	106 $\pm$ 11	88 $\pm$ 8	99 $\pm$ 11
Deltametrina	74 $\pm$ 14	70 $\pm$ 15	113 $\pm$ 20	74 $\pm$ 12	71 $\pm$ 4	93 $\pm$ 7
Diazinona	94 $\pm$ 5	90 $\pm$ 8	87 $\pm$ 5	94 $\pm$ 20	84 $\pm$ 11	87 $\pm$ 5
Dimetoato	99 $\pm$ 4	89 $\pm$ 3	91 $\pm$ 4	99 $\pm$ 14	101 $\pm$ 6	91 $\pm$ 4
Etefon	97 $\pm$ 14	84 $\pm$ 4	94 $\pm$ 4	97 $\pm$ 5	100 $\pm$ 11	94 $\pm$ 4
Etoprofós	97 $\pm$ 8	83 $\pm$ 3	89 $\pm$ 5	97 $\pm$ 4	75 $\pm$ 8	89 $\pm$ 5
Famoxadona	87 $\pm$ 20	71 $\pm$ 14	88 $\pm$ 20	81 $\pm$ 14	87 $\pm$ 20	95 $\pm$ 15
Fempropatrina	80 $\pm$ 8	75 $\pm$ 16	78 $\pm$ 20	80 $\pm$ 6	114 $\pm$ 7	91 $\pm$ 7
Fenamifós	94 $\pm$ 6	84 $\pm$ 2	81 $\pm$ 15	94 $\pm$ 8	105 $\pm$ 16	81 $\pm$ 15
Fenhexamide	79 $\pm$ 9	77 $\pm$ 3	70 $\pm$ 12	79 $\pm$ 17	108 $\pm$ 13	70 $\pm$ 12
Hexitiazox	99 $\pm$ 9	88 $\pm$ 14	88 $\pm$ 10	99 $\pm$ 9	113 $\pm$ 9	88 $\pm$ 10
Imidacloprida	94 $\pm$ 8	92 $\pm$ 2	93 $\pm$ 4	94 $\pm$ 8	84 $\pm$ 16	93 $\pm$ 4
Indoxacarbe	98 $\pm$ 10	90 $\pm$ 7	98 $\pm$ 9	98 $\pm$ 9	97 $\pm$ 16	98 $\pm$ 9
Malationa	89 $\pm$ 12	79 $\pm$ 3	82 $\pm$ 8	89 $\pm$ 8	88 $\pm$ 13	82 $\pm$ 8
Metidationa	101 $\pm$ 10	84 $\pm$ 6	83 $\pm$ 8	101 $\pm$ 10	95 $\pm$ 13	83 $\pm$ 8
Metoxifenozone	114 $\pm$ 15	83 $\pm$ 13	86 $\pm$ 8	111 $\pm$ 10	100 $\pm$ 18	86 $\pm$ 8
Miclobutanil	91 $\pm$ 13	87 $\pm$ 4	91 $\pm$ 4	91 $\pm$ 12	80 $\pm$ 9	91 $\pm$ 4
Oxamil	86 $\pm$ 12	86 $\pm$ 5	80 $\pm$ 11	86 $\pm$ 13	95 $\pm$ 16	80 $\pm$ 11
Penconazol	96 $\pm$ 6	80 $\pm$ 3	91 $\pm$ 4	96 $\pm$ 14	92 $\pm$ 18	91 $\pm$ 4
Piraclostrobina	104 $\pm$ 6	79 $\pm$ 7	104 $\pm$ 8	104 $\pm$ 12	100 $\pm$ 14	104 $\pm$ 8
Pirimicarbe	94 $\pm$ 6	88 $\pm$ 1	91 $\pm$ 3	94 $\pm$ 6	71 $\pm$ 7	91 $\pm$ 3
Profenofós	101 $\pm$ 8	75 $\pm$ 10	89 $\pm$ 9	101 $\pm$ 6	109 $\pm$ 2	89 $\pm$ 9
Propamocarbe	57 $\pm$ 6	52 $\pm$ 3	50 $\pm$ 2	57 $\pm$ 6	72 $\pm$ 4	50 $\pm$ 2
Propargito	77 $\pm$ 9	70 $\pm$ 17	85 $\pm$ 5	77 $\pm$ 8	102 $\pm$ 10	85 $\pm$ 5
Spinosad A	105 $\pm$ 12	97 $\pm$ 5	75 $\pm$ 9	105 $\pm$ 6	98 $\pm$ 14	75 $\pm$ 9
Spinosad D	97 $\pm$ 13	75 $\pm$ 7	70 $\pm$ 8	97 $\pm$ 9	103 $\pm$ 13	66 $\pm$ 8
Tebuconazol	89 $\pm$ 7	89 $\pm$ 12	89 $\pm$ 4	89 $\pm$ 12	94 $\pm$ 12	89 $\pm$ 4
Tebufenozide	99 $\pm$ 11	86 $\pm$ 4	89 $\pm$ 5	99 $\pm$ 13	108 $\pm$ 9	89 $\pm$ 5
Triadimefon	73 $\pm$ 17	76 $\pm$ 8	87 $\pm$ 8	73 $\pm$ 7	83 $\pm$ 14	87 $\pm$ 8
Triadimenol	98 $\pm$ 19	81 $\pm$ 6	84 $\pm$ 5	98 $\pm$ 11	102 $\pm$ 17	84 $\pm$ 5
Trifloxistrobina	102 $\pm$ 7	96 $\pm$ 11	96 $\pm$ 7	102 $\pm$ 17	95 $\pm$ 12	96 $\pm$ 7

Figura 14 - Resultados de exatidão em termos de recuperação, e RSD para os níveis de fortificação 5, 10 e 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$



#### 4.3.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O LOQ do método, estabelecido como o menor nível fortificado que forneceu resultados adequados na validação, foi  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ . O  $\text{LOD}_m$  do método corresponde a  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ . O  $\text{LOQ}_m$  pode ser considerado adequado porque está abaixo do LMR estabelecido para físalis ou para o grupo do tomate por diferentes legislações. Considerando a diluição final de 1:4 (v/v) adotada antes da análise por UHPLC-MS/MS, os limites de detecção e de quantificação do instrumento ( $\text{LOD}_i$  e  $\text{LOQ}_i$ ) correspondem a 0,3 e  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

#### 4.4 Aplicação do método

O método foi aplicado para 16 amostras de físalis, sendo 2 adquiridas em diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul (Cruz Alta e Santa Maria) e 14 importadas da Colômbia.

Dentre as amostras analisadas, 81,3% apresentaram resíduos de um ou mais analitos na faixa de concentração entre 2,0 a  $55,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Carbendazim, clorpirifós etílico, dimetoato, propamocarbe e tebuconazol apresentaram resíduos abaixo dos valores de LMR estabelecidos para físalis. (Tabela 12).

O fungicida carbendazin está presente em quase todas as amostras, em uma faixa de concentração entre 4,8 e  $55,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Propamocarbe e tebuconazol, ambos fungicidas, foram encontrados na amostra A1 na concentração de 18,8 e  $3,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. O inseticida clorpirifós foi detectado somente em A3, em uma concentração de  $2,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

O dimetoato é um inseticida com LMR estabelecido em  $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$  pela União Europeia para o grupo tomate, no entanto, este LMR não está disponível no *Codex Alimentarius* ou nas legislações da Colômbia e do Brasil. Entretanto, a ocorrência deste composto nas amostras ( $2,0$  a  $6,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) sugere a necessidade de uma regulamentação.



Tabela 12 - Resultados da análise das amostras de físalis empregando o método QuEChERS

Amostra	Concentração de resíduos de agrotóxicos ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )				
	Carbendazim	Clorpirifós etílico	Dimetoato	Propamocarbe*	Tebuconazol
A1	n.d.	n.d.	n.d.	33,6	<LOQ
A2	6,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A3	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A4	53,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A5	15,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A6	55,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A7	17,9	n.d.	6,8	n.d.	n.d.
A8	11,8	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.
A9	11,9	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.
A10	15,8	n.d.	5,4	n.d.	n.d.
A11	14,1	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.
A12	7,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A13	25,3	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
	LMR ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )				
União Europeia	0,003	0,005	0,00002	0,004	0,009
<i>Codex Alimentarius</i>	0,005	-	-	0,002	0,007
Colômbia	0,005	0,005	-	0,001	0,002

Todas as amostras são da Colômbia, com exceção de A3 e A4 (Brasil). A14 -A16 não apresentaram resíduos dos agrotóxicos estudados;

\*Valor estimado (com relação à média das recuperações);

n.d. = não detectado ou abaixo do LOD.

## 5 CONCLUSÕES

O método QuEChERS modificado otimizado neste estudo mostrou-se eficaz para a determinação de 42 resíduos de agrotóxicos em *fisalis*. O sistema UHPLC-MS/MS com fonte ESI (+) proporcionou satisfatória detectabilidade, seletividade e precisão. O método apresentou recuperações adequadas (70-114%) e RSD (<20%) para todos os compostos, exceto para propamocarbe. Além destes parâmetros, a faixa linear para a curva de trabalho na matriz foi satisfatória para todos os analitos, com valores de  $r^2$  maiores que 0,99. Em relação ao efeito matriz da *fisalis*, pode-se observar que há uma grande influência nos agrotóxicos avaliados, sendo fundamental o preparo de curvas analíticas na matriz, a fim de diminuir o efeito de coextrativos e/ou interferentes.

O uso moderado de acetonitrila (5 mL) na etapa de extração é vantajoso e minimiza a geração de resíduos. Além disso, a escolha do sorvente para a etapa de limpeza mostrou-se essencial para melhorar as recuperações e diminuir o efeito matriz causado pela presença de pigmentos e coextrativos.

Dentre os agrotóxicos analisados somente carbendazim, clorpirifós, dimetoato, propamocarbe e tebuconazole estavam presentes nas amostras reais, no entanto, os LRMs estavam abaixo dos limites estabelecidos pela União Europeia (2016), Resolução 2906/07 (COLÔMBIA, 2007) e *Codex Alimentarius* (2013).

Considerando os poucos estudos existentes para a análise de agrotóxicos em *fisalis*, especialmente por cromatografia líquida, o método desenvolvido demonstra ser uma boa alternativa para análise multirresíduo em laboratórios DE rotina uma vez que é um procedimento simples e rápido.

## 6 REFERÊNCIAS

AMÓRTEGUI, J. C. E.; DALLOS, J. A. G. Practical aspects in gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of pesticide residues in exotic fruits. **Food Chemistry**, v. 182, p. 14-22, 2015.

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. 412-431, 2003.

ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM E.; TAŞDELENB.; ŠTAJNBAHER D. Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis. **Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety**. Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2007) 439 p.

ANDRADE, G. C. R. M.; MONTEIRO, S. H.; FRANCISCO, J. G.; FIGUEIREDO, L. A.; BOTELHO, R. G.; TORNISIELO, V. L. .Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry and dynamic multiple reaction monitoring method for determining multiple pesticide residues in tomato. **Food Chemistry**, v. 175, p. 57-65, 2015.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2003. **Resolução – RE Nº 889/2003**. Disponível em <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE\\_899\\_2003\\_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 02 nov. 2015.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2011. **Agrotóxicos e Toxicologia**. Disponível em <<http://www.portalanvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicologia/>>. Acesso em: 16 dez. 2015.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2011a. **Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+T>

oxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Análise+de+Resíduos+de+Agrotóxicos+em+Alimentos>. Acesso em: 16 dez. 2015.

ARIAS, L. A.; BOJOCÁ, C. R.; AHUMADA, D. A.; SCHREVEENS, E. Monitoring of pesticide residues in tomato marketed in Bogota, Colombia. **Food Control**, v. 35, p. 213-217, 2014.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002, 622 p.

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

BIDARI, A.; GANJALI, M. R.; NOROUZI, P.; HOSSEINI, M. R. M.; ASSADI, Y. Sample preparation method for the analysis of some organophosphorus pesticides residues in tomato by ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1840-1844, 2011.

BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015, cap. 24, 263 p.

BURROWS, H. D.; CANLE L, M.; SANTABALLA, J. A.; STEENKEN, S. Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 67, p. 71-108, 2002.

CABRERA, L. 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, p. 227-240, 2012.

CÁRDENAS, O.; SILVA, E.; ORTIZ, J. E. Uso de plaguicidas inibidores de la acetilcolinesterasa en once entidades territoriales de salud en Colombia, 2002-2005. **Biomédica**, v. 30, p. 95-106, 2010.

CASTRO, A., RODRIGUEZ, L.; VARGAS, E. Drygooseberry (*Physalis peruviana L*) with pretreatment of osmotic dehydration. *Vitae - Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, v. 15, p. 226-231, 2008.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à 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, 2013. Disponível em <[http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pestres/commodities-detail/en/?c\\_id=320](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pestres/commodities-detail/en/?c_id=320)>. Acesso em: 03 fev. 2016.

COLÔMBIA, Ministerio De La Protección Social, 2007. Por la cual se establecen los Límites Máximos de Residuos de Plaguicidas – LMR em alimentos para consumo humano y em piensos o forrajes. Resolución 2906 (p. 50). Bogotá, D.C. Issued 22.08.07

EURACHEM CNM – MRD- 030 - 2a edição, 2005. Disponível em <<http://www.metroquimica.com.ar/descargas/Eurachem-Guia-Validacion-CNM-MRD-030-2da-Ed.pdf>>. Acesso em: 03 mar. 2016.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2005. Disponível em <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?hasbulk=0&subset= FoodQuality&&language=EN>>. Acesso em: 17 out. 2015.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2007. **Guía de campo de los cultivos andinos**. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/010/ai185s/ai185s00.htm>>. Acesso em: 17 out. 2015.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2014. Disponível em <http://www.fao.org/3/a-au173s.pdf>. Acesso em: 26 jan. 2016.

FERMAM, R. K. S.; ANTUNES, A. M. S. Uso de defensivos agrícolas, limites máximos de resíduos e impacto no comércio internacional: Estudo de caso. **Revista de Economia e Agronegócio**, v. 7, p. 197-213, 2009.

FISCHER, G.; ALMANZA-MERCHÁN P. J.; MIRANDA, D. Importancia y cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 01-15, 2014.

GARRIDO, A. F., Martínez, J. L., López, T., Cortés, S., & Martínez, I. Monitoring multi-class pesticide residues in fresh fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1048, p. 199-206, 2004.

GOLGE, O.; KABAK, B. Evaluation of QuEChERS sample preparation and liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry method for the determination of 109 pesticide residues in tomatoes. **Food Chemistry**, v. 176, p. 319-332, 2015.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry. A textbook**. 1ª ed., Alemanha:Springer, 2004.

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

HYÖTYLÄINEN, T. Critical evaluation of sample pretreatment techniques. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, p. 743-758, 2009.

IDROVO, A. J. Vigilancia de las Intoxicaciones con Plaguicidas en Colombia **Revista de Salud Pública**, v. 2, p. 36-46, 2000.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia), DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de métodos analíticos, revisão 4, 2011, 20 p.

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.

KOESUKWIWAT, U.; LEHOTAY, S. J.; MAŠTOVSKÁ, K.; DORWEILER, K. J.; LEEPIPATPIBOON, N. Extension of the QuEChERS Method for Pesticide Residues in Cereals to Flaxseeds, Peanuts, and Doughs. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v.58, p. 5950, 2010.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 35-61, 2009.

LEGISCOMEX, 2013. **Inteligencia de mercados - Exportación de frutas exóticas colombianas**. Disponível em <<http://legiscomex.com/BancoMedios/Documentos%20PDF/exportaciones-estudio-frutas-exoticas.pdf>>. Acesso em: 19 dez. 2015.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, J. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and esay 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.; FUD, 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, 2010.

LIMA, C. S. M.; SEVERO, J.; ANDRADE, S. B.; AFFONSO, L. B.; ROMBALDI, C. V.; RUFATO, A. R. Qualidade pós-colheita de *Physalis* sob temperatura ambiente e refrigeração. **Revista Ceres**, v. 60, p. 311-317, 2013.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 2013. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/Pncrc>>. Acesso em: 16 dez. 2015.

MAŠTOVSKÁ, K., LEHOTAY, S. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, p. 259-272, 2004.

MATHIAS, J. Como plantar physalis. **Revista Globo Rural**, 12 dez. 2013. Disponível em <<http://revistagloborural.globo.com/vida-na-fazenda/como-plantar/noticia/2013/12/como-plantar-physalis.html>>. Acesso em: 25 jan. 2015.

MAZORRA, M. F.; QUINTANA, A. P.; MIRANDA, D.; FISCHER, G.; VALENCIA, M. C. Aspectos anatómicos de la formación y crecimiento del fruto de uchuva *Physalis peruviana* (Solanaceae). **Acta Biológica Colombiana**, v. 11, p. 69-81, 2006.

MELO, A.; CUNHA, S. C.; MANSILHA, C.; AGUIAR, A.; PINHO, O.; FERREIRA, I. M. Monitoring pesticide residues in greenhouse tomato by combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas-chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.135, p. 1071-1077, 2012.

MINSALUD (Ministerio de Salud Y Protección Social), 2014. **Resolución N° 000770/2014**. Disponível em [https://www.minsalud.gov.co/Normatividad\\_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%200770%20de%202014.pdf](https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%200770%20de%202014.pdf)>. Acesso em 18 fev. 2016.

MMA (Ministério do Meio Ambiente) Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em: 02 mar. 2016.

MUNIZ, J.; **Sistemas de condução e espaçamentos para o cultivo de physalis (*Physalis peruviana* L.) no planalto catarinense**. 2011. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), UDESC, Lajes, 2011.

ORSO, D.; FLORIANO, L.; RIBEIRO, L. C.; BANDEIRA, N. M. G.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R. Simultaneous determination of multiclass pesticides and antibiotics in honey samples based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Analytical Methods**. doi:10.1007/s12161-015-0339-8. (2015)



ORTELLI, D.; EDDER, P.; CORVI, C. Multiresidue analysis of 74 pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 520, p.33-45, 2004.

PÁEZ, M. I.;URIBE, M. V.; Díaz, S. M.; Castro, R. A, Barbosa, E., Carvajal, N.; LONDOÑO, A. Evaluación de riesgo en humanos por plaguicidas en tomate cultivado con sistemas tradicional y BPA (Buenas Prácticas Agrícolas). **Revista de Ciencias**, v.15, p. 153-166, 2011.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Matrix effect in pesticide quantification by gas chromatography. **Química Nova**, v. 32, p. 987-995, 2009.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Pesticide determination in tomates by solid-liquid xtraction with purification at low temperature and gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 121, p. 251-256, 2010.

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 à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.

PRESTES, O. D. **Método rápido para determinação simultânea de residuos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origen animal por LC- MS/MS**. 2011.130 p.Tese (Doutorado em Química) - UFSM, Santa Maria, 2011.

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, p. 51-64, 2011.

PUENTE, L. A.; PINTO-MUÑOZ, C. A.; CASTRO, E. S.; CORTÉS, M. Physalis peruviana Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. **Food Research International**, v. 44, p. 1733-1740, 2011.

QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; ROSA, M. A. Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando QuEChERS e UPLC-MS/MS. **Química Nova**, v. 35, p. 185-192, 2012.

RAMADAN, M. F. Oil goldenberry (*Physalis peruviana*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 969-974, 2003.

RAMADAN, M. F. Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): An overview. **Food Research International**, v. 44, p. 1830-1836, 2011.

REDCORNUCOPIA, 2014. **Physalis peruviana L: fruta andina para el mundo**. Disponível em <[http://redcornucopia.org/formacion\\_detalle/201407o12-physalis-peruviana-l-fruta-andina-para-el-mundo-para-descargar-pdf.html](http://redcornucopia.org/formacion_detalle/201407o12-physalis-peruviana-l-fruta-andina-para-el-mundo-para-descargar-pdf.html)>. Acesso em: 22 nov. 2015.

RESTREPO, A. R.; ORTIZ, A. F. G.; OSSA, D. E. H.; MESA, G. A. P. QuEChERS GC-MS validation and monitoring of pesticide residues in diferente foods in the tomato classification group. **Food Chemistry**, v. 158, p. 153-161, 2014.

RIZZETTI, T. M.; KEMMERICH, M.; MARTINS, M. L.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in the orange juice by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 196, p. 25-33, 2016.

RODRIGUEZ-ALLER, M.; GURNY, R.; VEUTHEY, J.; GUILLARME, D. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 2-18, 2013.

ROSSI, M. O “alarmante” uso de agrotóxicos no Brasil atinge 70% dos alimentos. **El País - Brasil, São Paulo**, 30 abr. 2015. Disponível em <[http://brasil.elpais.com/brasil/2015/04/29/politica/1430321822\\_851653.html](http://brasil.elpais.com/brasil/2015/04/29/politica/1430321822_851653.html)>. Acesso em: 25 jan. 2015.

SANCO (2013) Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feeds. Commission of the European communities. SANCO/12571/2013.

SANTE, EUROPEAN COMMISSION. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document n° SANTE/11945/2015, 2015.

SIC (Superintendencia Industria Y Comercio), 2013. **Estudio sobre el sector de Plaguicidas en Colombia.** Disponível em <<http://www.sic.gov.co/drupal/documentos-elaborados-por-el-grupo-de-estudios-economicos>>. Acesso em: 22 nov. 2015.

UNIÃO EUROPEIA, 2016. **EU Pesticides Database.** Disponível em <<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=product.resultat&language=EN&selectedID=116>>. Acesso em 08 fev. 2016.

WARDENCKI, E.; MICHULEC, M., CURYLO, J. A review of theoretical em practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. **International Journal of Food Science Technology**, v. 39, p. 703-717, 2004.

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

ZANELLA, R.; PRESTES, O.; MARTINS, M.; ADAIME, M. **Quantitative Analysis and Method Validation** In: Chromatographic Science Series. 1a ed. Boca Raton, FL, USA. CRC Press, 2015, p 303-324.

## **7 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS**

Nas atividades de pesquisa gera-se uma quantidade significativa de resíduos líquidos e sólidos, os quais devem ser adequadamente tratados ou descartados.

Sendo assim, os resíduos gerados durante o desenvolvimento deste trabalho foram armazenados em recipientes apropriados e encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química (DQ) da UFSM. Este setor é responsável pela destinação dos resíduos gerados que serão posteriormente tratados por uma empresa terceirizada especializada nessa área.

## 8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Ampliar o escopo de agrotóxicos para as futuras análises em UHPLC-MS/MS.
- Desenvolver um método cromatográfico empregando GC-MS/MS para determinação de resíduos de agrotóxicos em fisalis, não passíveis de análise por UHPLC-MS/MS.
- Avaliar a aplicabilidade do método para o monitoramento de outras frutas exóticas, por exemplo pitaya.
- Ampliar o estudo de sorventes que sejam adequados para a etapa de limpeza.