

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

Karolaine da Silva Albarnaz

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO PARA
DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM SUCO DE UVA INTEGRAL
UTILIZANDO MÉTODO QUECHERS ACETATO E LC-MS/MS**

Santa Maria, RS

2021

Karolaine da Silva Albarnaz

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO
DE AGROTÓXICOS EM SUCO DE UVA INTEGRAL UTILIZANDO MÉTODO
QUECHERS ACETATO E LC-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 a obtenção do grau de **Mestre em Química**.

Orientador: Prof^o. Dr. Osmar Damian Prestes

Santa Maria, RS
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Albarnaz, Karolaine
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO PARA
DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM SUCO DE UVA INTEGRAL
UTILIZANDO MÉTODO QUECHERS ACETATO E LC-MS/MS / Karolaine
Albarnaz.- 2021.
119 p.; 30 cm

Orientador: Osmar Damian Prestes
Coorientador: Martha Bohrer Adaime
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2021

1. QuEChERS 2. Suco de uva 3. Preparo de amostras 4.
Química Analítica 5. LC-MS/MS I. Damian Prestes, Osmar
II. Bohrer Adaime, Martha III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

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

Karolaine da Silva Albarnaz

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO
DE AGROTÓXICOS EM SUCO DE UVA INTEGRAL UTILIZANDO MÉTODO
QUECHERS ACETATO E LC-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 a obtenção do grau de **Mestre em Química**.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2021:



Osmar Damian Prestes, Dr., UFSM
(Orientador)



Liane Maldaner, Dra., UEM



Aline Lima Hermes Muller, Dra., UFSM

Santa Maria, RS
2021

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar forças e manter a minha fé durante essa jornada.

À minha família, que sempre foi meu porto seguro, que entendeu minhas faltas durante esse período, que me apoia em todos os momentos difíceis e que comemora comigo todas as minhas vitórias. Mãe, pai e avós, esta conquista foi para vocês!

Ao Maikon, meu amor, que está sempre ao meu lado, me incentivando, apoiando e aconselhando. Obrigada por ser meu parceiro de vida, te amo muito!

Aos professores do LARP, Renato, Martha e Osmar, que me receberam de braços abertos, me deram essa grande oportunidade de crescimento profissional e compartilharam comigo seus conhecimentos. Um agradecimento especial ao meu orientador, Prof. Dr. Osmar, que sempre estava disposto a me ajudar e fez seu papel com excelência.

Aos membros da banca Prof^a. Dr^a. Aline e Prof^a. Dr^a. Liane pelas excelentes contribuições e comentários desta defesa de dissertação.

À todos os meus colegas de laboratório, que tornaram a jornada mais leve e divertida, sou grata pela amizade de todos vocês. Agradeço, especialmente, a Luana que me ajudou nos testes e que sempre me socorre quando preciso; ao Gabriel, que me ajudou no equipamento e nos testes; e a Franciele que, também, me auxiliou nos testes.

Às minhas colegas de graduação Adriane, Caroline, Graziela, Juliana e Larissa, que estão sempre comigo, fazendo parte da minha jornada acadêmica.

Às minhas colegas de mestrado Caroline, Cristina e Letícia, que divertiram os turnos de aula e me acalmaram sempre que precisei.

Às minhas amigas de infância Dyuly, Lauren, Kathleen, Alice e Aridieli que estão sempre presentes, mesmo que longe, e torcem pelo meu sucesso!

Aos meus tios e padrinhos e aos amigos do “Unidos das Piscinas”, pela parceria e companheirismo.

À UFSM e aos professores do Programa de Pós Graduação em Química (PPGQ) pela contribuição essencial na minha formação.

Ao Ademir, funcionário do PPGQ, pela gentileza e atenção na execução de suas tarefas.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM SUCO DE UVA INTEGRAL UTILIZANDO MÉTODO QUECHERS ACETATO E LC-MS/MS

AUTORA: Karolaine da Silva Albarnaz
ORIENTADOR: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

No último século, os agrotóxicos tiveram seu uso disseminado na agricultura devido aos muitos benefícios relacionados a qualidade e quantidade de culturas produzidas. Apesar de contribuírem no controle de pragas e no aumento da produtividade, o uso indiscriminado de agrotóxicos traz prejuízos a saúde humana e ao meio ambiente. Dessa forma, tornou-se necessário a determinação de uma quantidade máxima de produto que pode estar presente nos alimentos, chamada de Limites Máximos de Resíduos – LMRs. A viticultura é extremamente importante na agricultura brasileira pois produz cerca de 1,5 milhões de toneladas de uva por ano e, grande parte do cultivo ocorre na região sul do país. Metade das uvas produzidas são encaminhadas para o processamento onde são obtidos subprodutos como o vinho e o suco de uva. O suco de uva por ser de fácil elaboração e possuir um alto valor nutricional é uma bebida muito consumida pelos brasileiros. A qualidade do suco de uva depende diretamente da qualidade das frutas utilizadas em sua produção o que é dependente do uso de agrotóxicos. O emprego de métodos multirresíduos que sejam capazes de determinar diferentes classes e compostos em um único procedimento analítico é a melhor maneira de realizar o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em diferentes matrizes. Com base nisso, esse trabalho teve como objetivo a determinação de resíduos de agrotóxicos em suco de uva através da otimização do método QuEChERS e análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS). Os parâmetros que influenciam na eficiência de extração foram estudados e, após encontrar-se as melhores condições de extração, o método foi validado. A análise por LC-MS/MS permitiu a determinação dos analitos com alta seletividade e detectabilidade. O método QuEChERS acetato modificado foi validado para 153 compostos sendo que o limite de quantificação do método (LOQ) variou de 5 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. O método validado foi utilizado para a determinação de agrotóxicos em amostras de suco de uva. Foram encontrados, em 17 amostras, resíduos de agrotóxicos de diferentes classes e características em concentrações que variam de concentrações menores que o LOQ até 41,98 $\mu\text{g L}^{-1}$. Considerando os resultados obtidos, a utilização do método QuEChERS acetato modificado juntamente com o uso de LC-MS/MS demonstrou ser eficiente na determinação multirresíduo de agrotóxicos em suco de uva.

Palavras-chave: QuEChERS, agrotóxicos, LC-MS/MS, suco de uva.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A PESTICIDE MULTI-RESIDUE DETERMINATION METHOD IN OF IN RAW GRAPE JUICES USING QuEChERS ACETATE AND LC-MS/MS.

AUTHOR: Karolaine da Silva Albarnaz
ADVISOR: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

In the last century, pesticides have been widely used in agriculture due to the many benefits related to the quality and quantity of crops produced. Although they contribute to pest control and increased productivity, the indiscriminate use of pesticides is harmful to human health and the environment. Thus, it became necessary to determine a maximum amount of product that can be present in food, called Maximum Limits and Residues - MRLs. Viticulture is extremely important in Brazilian agriculture as it produces about 1.5 million tons of grapes per year and a large part of the cultivation takes place in the southern region of the country. Half of the grapes produced are sent to processing where by-products are obtained, such as wine and grape juice. Grape juice, because it is easy to prepare and has a high nutritional value, is a drink widely consumed by Brazilians. The quality of grape juice depends directly on the quality of the fruits used in its production, which depends on the use of pesticides. The use of multiresidue methods that are capable of determining different classes and compounds in a single analytical procedure is the best way to carry out the monitoring of pesticide residues in different matrices. Based on this, this work aimed to determine pesticide residues in grape juice through the optimization of the QuEChERS method and analysis by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The parameters that influence the extraction efficiency were studied and, after finding the best extraction conditions, the method was validated. The analysis by LC-MS/MS allowed the determination of the analytes with high selectivity and detectability. The QuEChERS modified acetate method was validated for 153 compounds and the limit of quantification of the method (LOQ) varied from 5 to 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. The validated method was used for the determination of pesticides in grape juice samples. In 17 samples, pesticide residues of different classes and characteristics were found in concentrations ranging from concentrations lower than the LOQ to 41.98 $\mu\text{g L}^{-1}$. Considering the results obtained, the use of the modified QuEChERS acetate method together with the use of LC-MS/MS proved to be efficient in multi-residue determination of pesticides in grape juice.

Keywords: QuEChERS, pesticides, LC-MS/MS, grape juice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa de substâncias químicas presentes na uva tinta identificadas pela técnica de LC-QToF.....	21
Figura 2 – Versões do método QuEChERS: original, acetato e citrato.....	37
Figura 3 – Cromatograma de íons totais obtido por LC-MS/MS a partir de uma solução padrão 20 µg L ⁻¹ (acetonitrila) e transições SRM (acetamiprido, carbendazim e cletodim), na concentração de 1 µg L ⁻¹ (extrato da matriz).....	73
Figura 4 – Aparência do extrato final obtido após realização das etapas de extração empregando os métodos QuEChERS original, citrato e acetato, com e sem etapa de limpeza por d-SPE.....	74
Figura 5 – Avaliação visual dos extratos obtidos, após a análise gravimétrica, pelas diferentes versões do método QuEChERS original, citrato e acetato com e sem etapa de limpeza por d-SPE.....	75
Figura 6 – Comparação entre as quantidades de coextrativos não-voláteis remanescentes em cada versão do método QuEChERS (original, citrato e acetato) com e sem etapa de limpeza.....	76
Figura 7 – Avaliação da eficiência de extração (% recuperação e RSD%) das diferentes versões do método QuEChERS (original T1, citrato T2, acetato T3 e original acidificado com (T7) e sem (T8) PSA na etapa de limpeza por d-SPE.....	78
Figura 8 – Avaliação do efeito matriz por LC-MS/MS para os compostos extraídos pelos métodos QuEChERS acetato e QuEChERS original acidificado.....	81
Figura 9 – Extratos obtidos após utilização de diferentes sorventes na etapa de limpeza.....	82
Figura 10 – Número de compostos recuperados, 70-120% com RSD ≤ 20%, no nível de 25 µg L ⁻¹ após etapa de d-SPE, empregando diferentes sorventes (PSA, C18, Celite® e PVP) fortificação analisados por LC-MS/MS.....	83
Figura 11 – Número de compostos recuperados, 70-120% com RSD ≤ 20%, no nível de 25 µg L ⁻¹ após adição na amostra de diferentes quantidade de Celite® (0,5; 1,0 e 1,5 g) e posterior realização do método QuEChERS acetato e análise por LC-MS/MS.....	85
Figura 12 – Comparação da aparência visual de extrato branco obtido pelo método QuEChERS acetato a) sem etapa de limpeza e b) com adição de 1,5 g Celite® antes do procedimento de extração.....	86
Figura 13 – Método QuEChERS acetato otimizado para determinação de resíduos de agrotóxicos em suco de uva integral por LC-MS/MS.....	87
Figura 14 – Avaliação da seletividade para a) amostra branco de suco de uva integral e b) solução padrão 50 µg L ⁻¹ (preparada no extrato da “amostra branco”) do fungicida carbaril.....	88
Figura 15 – Efeito matriz para os compostos extraídos pelo método QuEChERS acetato e avaliados por LC-MS/MS.....	89
Figura 16 – Avaliação da estabilidade de solução padrão 25 µg L ⁻¹ (preparada no extrato branco da matriz), avaliada por LC-MS/MS, a cada 48 horas em um período de 6 dias.....	100

Figura 17 – Reação de ciclização degradativa do tiofanato metílico em carbendazim.....	102
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de suco de uva na safra 2019, no estado do Rio Grande do Sul.....	22
Tabela 2 - Composição centesimal do suco de uva (100 g).....	25
Tabela 3 - Classificação dos agrotóxicos por espécie-alvo.....	28
Tabela 4 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos.....	29
Tabela 5 - Agrotóxicos permitidos, segundo o AGROFIT, com os Limites Máximos de Resíduos (LMR), mg kg ⁻¹ , estabelecidos para a cultura de uva de acordo com a ANVISA, União Europeia e <i>Codex alimentarius</i>	31
Tabela 6 - Limites máximos de resíduos (LMRs) estabelecidos pelo Codex Alimentarius para agrotóxicos em suco de uva.....	33
Tabela 7 – Aplicações empregando diferentes técnicas de preparo de amostra e cromatográficas para determinação de agrotóxicos em suco de uva.....	41
Tabela 8 – Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos.....	44
Tabela 9 – Agrotóxicos analisados, classe agrônômica, grupo químico, massa molecular, pureza, e suas propriedades físico-químicas (solubilidade, pKa e LogKow).....	50
Tabela 10 – Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de agrotóxicos em suco de uva no sistema LC-MS/MS.....	58
Tabela 11 – Diferentes versões do método QuEChERS (original, citrato, acetato e original acidificada) avaliadas neste trabalho.....	61
Tabela 12 - Diferentes sorventes (C18, PSA, polivinilpirrolidona (PVP) e Celite®) avaliados na etapa de limpeza por d-SPE.....	63
Tabela 13 - Parâmetros avaliados na etapa de validação do método, com respectivas formas de aplicação, equações (quando aplicável) e critérios de aceitação.....	65
Tabela 14 – Compostos determinados neste trabalho com seus respectivos tempos de retenção, íon precursor e íons produtos utilizados na quantificação e identificação.....	67
Tabela 15 – Comparação do efeito matriz%, por faixa percentual e calculado para todos os agrotóxicos avaliados, nos métodos QuEChERS acetato e original acidificado.....	79
Tabela 16 - Resultados obtidos na etapa de validação do método QuEChERS para os parâmetros de validação LOQ, LOD, exatidão, precisão, precisão intermediária e efeito matriz.....	91
Tabela 17 – Resultados em µg L ⁻¹ das 17 amostras de suco de uva analisadas utilizando o método QuEChERS acetato e LC/MS-MS.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGROFIT	Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação Oficial de Químicos Analíticos (do inglês, <i>Association of Official Analytical Chemists</i>)
APCI	Ionização química à pressão atmosférica (do inglês, <i>atmospheric-pressure chemical ionization</i>)
APPI	Fotoionização à pressão atmosférica (do inglês, <i>atmospheric pressure photoionization</i>)
CID	Dissociação induzida por colisão (do inglês, <i>collision-induced dissociation</i>)
CTM	Curva analítica na matriz
CTS	Curva analítica no solvente
DC	Corrente contínua (do inglês, <i>direct current</i>)
d-SPE	Extração dispersiva em fase sólida (do inglês, <i>dispersive solid phase extraction</i>)
EA-DLLME-CFO	Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por efervescência baseado em gota orgânica flutuante coesa (do inglês, <i>effervescence assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on the cohesive floating organic drop</i>)
EC	Energia de colisão
EM	Efeito matriz
ESI	Ionização por eletrospray (do inglês, <i>electrospray ionization</i>)
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
GC	Cromatografia gasosa (do inglês, <i>gas chromatography</i>)
GC-FID	Cromatografia gasosa com ionização de chama (do inglês, <i>gas chromatography with flame ionization detector</i>)
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (do inglês, <i>gas chromatography–mass spectrometry</i>)
GC-MS/SIM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa no modo de monitoramento seletivo de íons (do inglês, <i>Gas chromatography–selected ion monitoring mass spectrometry</i>)
GC-NPD	Cromatografia gasosa com detector de nitrogênio-fósforo (do inglês <i>gas chromatography – nitrogen phosphorous detector</i>)
HF-DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva suportada com membrana oca (do inglês, <i>hollow-fiber dispersive liquid-liquid microextraction</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i>)
IMS	Espectrometria de mobilidade iônica (do inglês, <i>ion-mobility spectrometry</i>)
LARP	Laboratório de Análises de Resíduo de Pesticidas
LC	Cromatografia líquida (do inglês, <i>liquid chromatography</i>)

LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série (do inglês, <i>liquid chromatography with tandem mass spectrometry</i>)
LLE	Extração líquido-líquido (do inglês, <i>liquid-liquid extraction</i>)
LMR	Limite máximo de resíduo
LOD	Limite de detecção (do inglês, <i>limit of detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês, <i>limit of quantification</i>)
m/z	Razão massa/carga
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEPS	Microextração em sorvente empacotado (do inglês, <i>micro extraction by packed sorbent</i>)
MRM	Múltiplas reações monitoradas (do inglês, <i>multiple reaction monitoring</i>)
MWCNT	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês, <i>multi-walled carbon nanotubes</i>)
n.d.	Não detectado
NPC	Princípios ativos não permitidos para a cultura
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PC	Padrão de controle
PI	Padrão interno
r ²	Coefficiente de correlação
Rf	Radiofrequência
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês, <i>relative standard deviation</i>)
S/N	Sinal/ruído
SEAPDR	Secretaria De Agricultura, Pecuária E Desenvolvimento Rural
SD	Desvio padrão (do inglês, <i>standard deviation</i>)
SDME	Microextração em gota única (do inglês, <i>single drop microextraction</i>)
SFE	Extração por fluido supercrítico (do inglês, <i>supercritical fluid extraction</i>)
SIM	Monitoramento de íon selecionado (do inglês, <i>selection ion monitoring</i>)
SPE	Extração em Fase Sólida (do inglês, <i>solid-phase extraction</i>)
SRM	Monitoramento de reações selecionadas (do inglês, <i>selected reactions monitoring</i>)
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TIC	Cromatograma total de íons (do inglês, <i>total ions chromatogram</i>)
tr	Tempo de retenção
UHPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (do inglês, <i>ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>)

ANEXOS

ANEXO A – FLUXOGRAMA DOS TESTES REALIZADOS PARA OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRAS.....	117
ANEXO B - ILUSTRAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS ACETATO OTIMIZADO NESTE ESTUDO.....	119

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 UVA.....	18
2.1.1 Histórico da produção da uva	18
2.1.2 Produção de uva no Brasil	18
2.1.3 Composição centesimal da uva	20
2.2 SUCO DE UVA INTEGRAL.....	21
2.2.1 Processo de produção do suco de uva integral	22
2.2.2 Composição do suco de uva	24
2.3 AGROTÓXICOS.....	26
2.3.1 Definição	26
2.3.2 Classificação dos agrotóxicos	27
2.3.3 Monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos	29
2.4 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS.....	33
2.4.1 Método QuEChERS	34
<i>2.4.1.1 Modificações no método QuEChERS</i>	35
2.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS.....	37
2.5.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série para determinação de resíduos de agrotóxicos	38
2.6 APLICAÇÕES UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM SUCO DE UVA.....	41
2.7 VALIDAÇÃO.....	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	45
3.2 REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS UTILIZADOS.....	46
3.3 AMOSTRAS DE SUCO DE UVA.....	47
3.4 COMPOSTOS SELECIONADOS E PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS.....	47
3.4.1 Utilização do Padrão Interno (PI) e Padrão de Controle (PC)	48
3.5 CONDIÇÕES DO SISTEMA LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM SUCO DE UVA INTEGRAL.....	58
3.5.1 Escolha da fase móvel	58
3.5.2 Condições utilizadas no sistema LC-MS/MS para determinação multirresíduo de agrotóxicos	58
3.6 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM SUCO DE UVA INTEGRAL.....	59
3.6.1 Avaliação gravimétrica dos coextrativos obtidos após realização da etapa de extração	60

3.6.2 Avaliação da eficiência de extração de cada uma das versões do método QuEChERS avaliada	62
3.6.3 Avaliação de diferentes sorventes nas etapas de limpeza por d-SPE e quando realizada antes do procedimento de extração	62
3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM SUCO DE UVA INTEGRAL POR LC-MS/MS	63
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA LC-MS/MS EMPREGADO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM SUCO DE UVA	67
4.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM SUCO DE UVA INTEGRAL	74
4.2.1 Avaliação gravimétrica dos coextrativos obtidos após realização da etapa de extração	74
4.2.2 Avaliação da eficiência de extração das versões do método QuEChERS original, acetato, citrato e original acidificada	77
4.2.3 Avaliação de diferentes sorventes nas etapas de limpeza por d-SPE e quando realizada antes do procedimento de extração	82
4.2.4 Método QuEChERS acetato otimizado	86
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE SUCO DE UVA INTEGRAL	87
4.3.1 Seletividade e Linearidade	88
4.3.2 Efeito Matriz	88
4.3.3 Exatidão, Precisão e Precisão Intermediária	98
4.3.4 Limites de detecção e quantificação	99
4.3.5 Avaliação da estabilidade dos extratos	99
5 AVALIAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO UTILIZADO	100
6 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS	102
6.1 APLICAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS ACETATO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE SUCO DE UVA	102
7 CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
ANEXOS	117

1 INTRODUÇÃO

Devido ao seu alto valor nutricional e suas características sensoriais, o suco é um dos subprodutos da uva mais consumidos diariamente pelos brasileiros (RIZZON; MENEGUZZO, 2007, p. 9). Durante o processo de produção as videiras podem ser suscetíveis a pragas e doenças. Assim, os produtores utilizam agrotóxicos com o objetivo de combater e evitar as pragas durante a produção das uvas, garantindo desta forma melhores índices de produtividade (GRIMALT; DEHOUCK, 2016). De acordo com Wołejko e colaboradores (2014) o suco de uva integral, por não precisar de etapa de fermentação – onde pode ocorrer uma diminuição da concentração dos agrotóxicos - durante o processo de fabricação, é passível à presença de resíduos de agrotóxicos. Portanto, é extremamente importante o monitoramento desses compostos.

A fim de garantir a segurança do consumidor são estabelecidos níveis seguros para a presença de agrotóxicos nos alimentos, estes são denominados de Limites Máximos de Resíduos (LMRs). No Brasil, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, [s.d.]), o suco de uva não possui LMRs estabelecidos para agrotóxicos, entretanto, por ser um subproduto da uva, considera-se a legislação da própria fruta para fins de monitoramento (OFFICIAL JOURNAL UE, 2005). Atualmente, diversas classes de agrotóxicos possuem uso permitido durante o cultivo da uva, como por exemplo, inseticidas, herbicidas e fungicidas. (ANVISA, [s.d.]). O suco de uva integral é composto majoritariamente por água, açúcares, ácidos orgânicos e compostos fenólicos. Entre os ácidos orgânicos destacam-se tartárico, málico e cítrico. Além disso, as antocianinas são os principais compostos fenólicos presentes nesta bebida. Assim, estes são os principais interferentes quando se trata de determinação de resíduos de agrotóxicos em suco de uva (RIZZON; MENEGUZZO, 2007, p. 10-11). A complexidade das amostras associada as baixas concentrações dos agrotóxicos presentes, vêm sendo um grande desafio no monitoramento destas substâncias em alimentos. Assim, previamente a determinação destes compostos se faz necessário realizar uma etapa adequada do preparo da amostra, para que se tenha a obtenção de resultados confiáveis (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007). O método QuEChERS (acrônimo do inglês para *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*), proposto por Anastassiades et al. (2003), tem sido muito

empregado para determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos. Entre as várias vantagens deste método, destacam-se a utilização de uma menor quantidade de solvente orgânico, facilidade de execução simplicidade da etapa de limpeza do extrato, entre outras características. Além disso, esse método possibilita que os extratos obtidos possam ser analisados tanto pela técnica de cromatografia líquida como por cromatografia gasosa (SANTANA-MAYOR et al., 2019; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Nos últimos anos, o avanço nas técnicas de preparo de amostra tem acompanhado a evolução das técnicas cromatográficas. Entre estas, a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série têm se destacado. Esta técnica possibilita a determinação simultânea de um grande número de compostos com excelente detectabilidade e tempo de análise reduzido quando comparada a técnicas convencionais (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

1.1 OBJETIVO GERAL

Considerando a importância da etapa do preparo de amostra, este trabalho teve como objetivo geral avaliar o método QuEChERS para determinação de resíduos de agrotóxicos em suco de uva integral. Para a obtenção das melhores condições de preparo de amostra, determinação cromatográfica e validação do método, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar as condições cromatográficas do sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série (LC-MS/MS) visando proporcionar a separação e determinação multirresíduo de agrotóxicos.
- Avaliar diferentes versões do método QuEChERS: original, original acidificado, acetato e citrato visando encontrar as melhores condições de extração dos analitos selecionados;
- Avaliar diferentes sorventes na etapa de limpeza por d-SPE visando minimizar a presença de coextrativos;
- Validar o método desenvolvido, avaliando: curva analítica, linearidade, efeito matriz, precisão, exatidão e limites de quantificação e detecção;

- Aplicar o método desenvolvido na determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras comerciais de suco de uva integral.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 UVA

2.1.1 Histórico da produção de uva

As primeiras sementes de videiras, datadas de cerca de 8000 anos, foram localizadas na Geórgia e Turquia. Após essas regiões, houve a expansão para localidades próximas ao Egito e a Mesopotâmia. Alguns registros arqueológicos indicam que as atividades de viticultura e elaboração de vinhos tiveram início há cerca de 5000 a 6000 anos no Egito (LEÃO, 2010). Por volta dos anos 1500, os colonizadores e missionários espanhóis e portugueses inseriram, no novo mundo, a espécie *Vitis vinifera* L. através de sementes trazidas de seus locais de origem (LEÃO, 2010).

No Brasil, o cultivo de videiras foi iniciado por Martin Afonso de Souza em 1532. Esta produção começou na capitania de São Vicente, atual Estado de São Paulo (LEÃO, 2010). No Rio Grande do Sul (RS), os padres jesuítas introduziram as plantações de videiras em 1626. Posteriormente, a espécie *Vitis vinifera* L. foi trazida ao estado por imigrantes alemães. Em 1875, os imigrantes italianos trouxeram consigo castas europeias, assim como a cultura da produção e consumo de vinhos. As variedades de uvas européias não eram favorecidas pelas condições climáticas do Estado, por esse motivo, houve a introdução da *Vitis labrusca* L. (conhecida como Isabel), de origem americana. As videiras de origem americana foram o eixo para o desenvolvimento da vitivinicultura no Brasil (LEÃO, 2010; PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2006, p. 7). Segundo Protas, Camargo e Mello (2006, p. 7), no século XX as uvas finas (*Vitis vinifera* L.) voltaram a ser produzidas no Brasil, para a produção de vinhos.

2.1.2 Produção de uvas no Brasil

No Brasil a viticultura abrange, aproximadamente, 78 mil hectares, sendo a maior parte dos vinhedos localizados na região Sul do país e também em áreas próximas a linha do equador (EMBRAPA, 2018). A produção nacional de uvas é de cerca de 1,5 milhões de toneladas de uvas por ano. Desse total, 50% é destinado para processamento (elaboração de vinhos, sucos e outros derivados) e os outros 50% são comercializados como uvas de mesa (EMBRAPA, 2018). Dos produtos industrializados, 42% são destinados a produção de vinhos de mesa e 49% de suco de uva (EMBRAPA, 2018).

A espécie de uva mais cultivada no mundo é a *Vitis vinífera* e esta também é conhecida como uva europeia ou uva fina. A segunda espécie é a *Vitis labrusca*, que é utilizada principalmente para consumo *in natura* e para elaboração do suco de uva. Além destas, há as espécies *Vitis bourquina* e *Vitis rotundifolia* (conhecida no Brasil como uva comum), porém, estas possuem poucos cultivares (CAMARGO, [20-?]).

As uvas comuns são responsáveis por mais de 80% da produção brasileira destinada para processamento e são muito utilizadas como uvas de mesa (CAMARGO, [20-?]). Existe uma grande variedade de uvas de mesa, chamadas assim por serem ideais para consumo *in natura*. (LEÃO, 2001, p. 1). Por outro lado, as variedades comuns do tipo Isabel, Bordô e Concord, que pertencem à espécie *Vitis labrusca*, são ideais para produção de suco e podem ser utilizadas na elaboração de vinhos. As uvas do tipo Jacquez, Herbemont e Cynthiana, da espécie *Vitis bourquina*, e as uvas híbridas do tipo Couderc Tinto e Seyve Villard Tinto são utilizadas na produção de vinho e suco. Entre os principais cultivares de uvas comuns brancas, destacam-se a Niágara Branca e Rosada, Couderc 13, Moscato Embrapa, BRS Lorena e Seyval (CAMARGO, [20-?]).

Os principais cultivares de uvas finas tintas da região Sul do Brasil são Cabernet Sauvignon, Merlot, Cabernet Franc, Tannat, Acellota, Pinot Noir e Egiodola. Os cultivares predominantes de uvas finas brancas são o Moscato Branco, Riesling Itálico, Chardonnay, Prosecco, Trebbiano e Moscato Giallo. Na região Nordeste do Brasil, os cultivares de uvas finas tintas mais importantes são de Syrah e Alicante Bouschet. Entre as uvas finas brancas destacam-se Chenin Blanc, Moscato Canelli e Itália, sendo esta última muito utilizada como uva de mesa (CAMARGO, [20-?]).

Segundo a Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural (SEAPDR, [2020?]), a safra de 2019 no RS gerou uma produção total de 614.279.205 kg de uvas, sendo 70.580.841 kg de uvas viníferas e 543.698.390 kg de uvas americanas ou híbridas. Isso indica que, quando comparado à safra de 2018 (664.205.024 kg) houve uma queda de 7,5% na produção de uvas.

2.1.3 Composição centesimal da uva

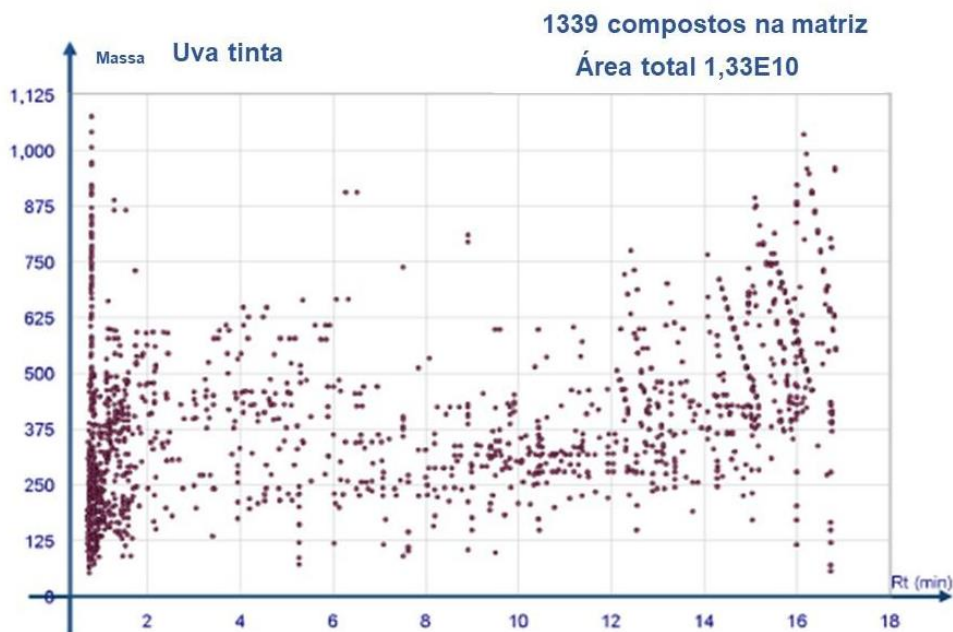
A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO (UNICAMP, 2011, p. 42) apresenta a composição centesimal das uvas de mesa do tipo Rubi e Itália, que são as mais vendidas no Brasil. Em média, a cada 100 g desta fruta temos 85,5 % (m/m) de umidade. Os principais carboidratos presentes na uva são a glicose e a frutose, que representam em torno de 13% (m/m) de sua composição. A presença desses açúcares é essencial para que ocorra a fermentação alcoólica da uva para a formação do vinho (CORRÊA *et al.*, 2013). O cálcio e o magnésio são minerais essenciais ao nosso organismo e estão presentes em quantidades consideráveis (em média 7 mg/100 g) na uva. Esses minerais são indispensáveis na manutenção de processos biológicos, auxiliando o nosso organismo na assimilação de vitaminas e minerais (FRANK, [20-?]).

Além dos componentes anteriormente citados, a uva é uma das frutas com maior concentração de compostos fenólicos. Entre estes, destacam-se os flavonoides, em especial as antocianinas, que são responsáveis pela coloração roxa da fruta. A quantidade e a composição das antocianinas variam de acordo com a espécie e variedade de uva, entre outros parâmetros (MALACRIDA; MOTTA, 2005; FRANK, [20-?]). A presença de pigmentos pode tornar-se um desafio na determinação de resíduos de agrotóxicos, tanto na etapa de preparo de amostra como na determinação cromatográfica (KEMMERICH *et al.*, 2014). Devido a sua estrutura química complexa, as antocianinas podem promover o efeito matriz e competir com os agrotóxicos na etapa de extração (AHUMADA; ZAMUDIO; ESPAÑA, 2012).

A uva tinta possui mais de 1339 compostos, que estão presentes naturalmente na sua composição. A Figura 1 apresenta um mapa desta diversidade de substâncias,

que possuem ampla faixa de massa molecular e diferentes características físico-químicas (EURL, 2013, p. 13).

Figura 1 – Mapa de substâncias químicas presentes na uva tinta identificadas pela técnica de LC-QToF.



Fonte: Adaptada de EURL, 2013, p. 13.

2.2 SUCO DE UVA INTEGRAL

Conforme o Artigo 5º da Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988 (BRASIL, 1988), “Suco de uva é a bebida não fermentada, obtida do mosto simples, sulfitado ou concentrado, de uva sã, fresca e madura”. Ainda, segundo o Artigo 5º da Lei nº 8,918, de 14 de julho de 1994 (BRASIL, 1994), o suco é obtido “através da parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo”. De acordo com o Artigo 15º, § 5, da Instrução Normativa nº 14, de 8 de fevereiro de 2018, o suco de uva integral é aquele que não recebe adição de açúcares, corantes ou aromas e está na sua concentração natural (BRASIL, 2018).

O suco de uva pode ser classificado quanto a cor: tinto, rosado e branco. E também pode ser classificado quanto ao processamento: (RIZZON; MENEGUZZO, 2007, p. 15-16)

Suco de uva integral: Encontra-se na sua concentração e composição natural, sem adição de outro tipo de açúcar;

Suco de uva concentrado: É parcialmente desidratado com no mínimo 65 °Brix em sólidos solúveis totais;

Suco de uva desidratado: Este é oferecido ao consumidor na forma sólida devido ao processo de desidratação. Possui teor de umidade máximo de 3%;

Suco de uva adoçado: Este produto recebe adição de açúcar;

Suco de uva reprocessado ou reconstituído: É o suco obtido através da diluição do produto concentrado ou desidratado, até sua concentração natural.

Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), no Brasil no ano de 2017, o consumo anual per capita de uvas de mesa e de suco de uvas foi de 4,11 kg e de 1,23 litros, respectivamente (EMBRAPA, 2018). No ano de 2019, de acordo com dados da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural (SEAPDR), ocorreu no RS um aumento de 48% na produção de suco de uva quando comparado à safra de 2018. A produção total de suco de uva foi de aproximadamente 51 milhões de litros. A Tabela 1 mostra a quantidade (em litros) de cada tipo de suco de uva produzido. Destaca-se que neste período a produção de sucos de uva orgânicos foi de 628.747 litros (SEAPDR, [2020?]).

Tabela 1 - Produção de suco de uva na safra 2019, no estado do Rio Grande do Sul.

Produtos	Quantidade (litros)
Suco de uva adoçado	120.320
Suco de uva integral branco	1.664.175
Suco de uva integral rosado	70.795
Suco de uva integral tinto	48.504.797
Suco de uva reconstituído	584.256
<i>Total de suco de uva</i>	<i>50.944.343</i>
Suco concentrado	26.861.009

Fonte: (SEAPDR, [2020?]).

2.2.1 Processo de produção do suco de uva integral

A primeira etapa do processo de produção do suco de uva é o recebimento da fruta, esta deve estar madura, inteira, ter sido colhida recentemente, mantida ao abrigo do sol, e sem resíduos de produtos fitossanitários e poeira (RIZZON; MENEGUZZO, 2007, p. 18). É necessário realizar o controle do cultivar para garantir a procedência da uva. São avaliadas as características da fruta, estado sanitário e peso da uva, ainda determina-se o teor de açúcar do mosto (através do mostímetro e do refratômetro) pois, este é responsável pelo rendimento da produção do suco (RIZZON; MENEGUZZO, 2007, p. 18).

Após pesagem da matéria-prima, os cachos de uva são encaminhados para uma máquina desengaçadeira-esmagadeira onde ocorre a separação da ráquis e o esmagamento da fruta. A ráquis interfere na composição do mosto pois deixa um gosto amargo e o dilui. Já o esmagamento da uva contribui para a extração da cor (RIZZON; MENEGUZZO, 2007, p. 19).

Como o suco de uva é uma bebida não fermentada e não alcoólica a presença de leveduras no mesmo é inconveniente e pode interferir na qualidade do produto. Para isso, o ideal é ter boas condições de higiene e de limpeza e realizar o aquecimento da uva para inviabilizar as leveduras (RIZZON; MENEGUZZO, 2007, p. 20). Portanto, na sequência, é realizado o aquecimento da uva à aproximadamente 65 °C, em um termo-macerador tubular. Nesta etapa são extraídos principalmente os compostos fenólicos. Se a uva estiver deteriorada é preciso utilizar uma maior temperatura (no máximo 90 °C) a fim de evitar que enzimas oxidativas afetem a qualidade do produto (RIZZON; MENEGUZZO, 2007, p. 20). A próxima etapa é a adição de enzimas. Essas são responsáveis pela transformação de substâncias orgânicas. As enzimas mais utilizadas nesse processo são as pectinolíticas ou pectinases, pois são capazes de hidrolisar as pectinas da uva o que facilita a extração e a clarificação do suco no restante do processo. A uva contém, naturalmente essas enzimas, entretanto, não em quantidade suficiente, por isso é necessário a adição das mesmas para complementar (RIZZON; MENEGUZZO, 2007, p. 21). Aplica-se normalmente em torno de 2 a 4 g de enzimas a cada 100 L de mosto e estas ficam em contato com a uva esmagada por um período de 1 a 2 horas. Ainda, a temperatura ideal para a atuação da enzima adicionada varia de 55 a 60 °C (RIZZON; MENEGUZZO, 2007, p. 22).

Após estas etapas o suco irá adquirir a intensidade de cor e o equilíbrio gustativo desejado. Nesse ponto é feita a separação da parte sólida da uva - película e semente - através do esgotador dinâmico e da prensa contínua (RIZZON; MENEGUZZO, 2007, p. 23). Se o produto final apresentar turbidez e/ou precipitação do fundo do recipiente é necessário realizar a clarificação (RIZZON; MENEGUZZO, 2007, p. 24-25). A legislação brasileira, permite, no máximo, 5% v/v de sólidos insolúveis na bebida (BRASIL, 2019).

O processo de clarificação do suco de uva pode ser feito por despectinização, filtração e estabilização tartárica. No primeiro tipo recomenda-se adicionar uma nova quantidade de enzima a fim de separar o sedimento formado. Se o que está causando a turbidez forem partículas maiores o recomendado é realizar a filtração (RIZZON; MENEGUZZO, 2007, p. 25-26).

A estabilização tartárica é utilizada quando a turbidez for causada pela precipitação do bitartarato de potássio e do tartarato de cálcio. Este procedimento é baseado na refrigeração a uma temperatura de 0 a 2 °C por um período de 8 a 10 dias (RIZZON; MENEGUZZO, 2007, p. 26).

Visando a conservação por maior tempo do produto final, ainda realiza-se a técnica de pasteurização, que consiste em aquecer o suco de uva a uma temperatura inferior à sua temperatura de ebulição e resfriá-lo, em seguida, com o intuito de inativar a maior parte dos microorganismos (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998, p.19). Por fim, é verificada a qualidade do suco de uva produzido e se o mesmo atende aos critérios e limites estabelecidos pela legislação. Geralmente, também é feita uma análise sensorial do produto. Após, a bebida é engarrafada e armazenada em local seco, com umidade relativa de aproximadamente 70%, com temperatura controlada na faixa de 12 a 15 °C (RIZZON; MENEGUZZO, 2007, p. 31-32).

2.2.2 Composição do suco de uva

De acordo com Rizzon e Meneguzzo (2007, p. 9) o suco de uva possui alto valor nutricional, podendo contribuir na dieta alimentar. Ele é uma bebida com baixos teores de lipídios, proteínas e fibra alimentar, sendo composto majoritariamente por água, açúcares, ácidos orgânicos e alguns sais minerais. A Tabela 2 apresenta a

composição do suco de uva concentrado e envasado segundo a TACO (UNICAMP, 2011, p. 42).

A água presente no suco de uva é proveniente das células da fruta. Já os açúcares (glicose e frutose) são responsáveis pela composição energética do produto processado e, por serem glicídios simples, são de fácil assimilação ao organismo humano (RIZZON; MENEGUZZO, 2007, p. 9). De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2019), o mínimo de sólidos solúveis permitido é 14 °Brix.

Os ácidos orgânicos (tartárico, málico, cítrico etc) são responsáveis pelo sabor ácido do suco de uva. Além disso, os principais minerais presentes no suco são o potássio, o cálcio, o magnésio, o manganês, o sódio, o ferro, os fosfatos, os sulfatos e os cloretos (RIZZON; MENEGUZZO, 2007, p. 10). O suco de uva também é uma fonte importante de aminoácidos e vitaminas essenciais ao organismo humano.

Tabela 2 - Composição centesimal do suco de uva (100 g).

Parâmetro/Alimento	Suco de uva (concentrado e envasado)
Umidade (%)	85,1
Energia (kcal)	58
Proteína (g)	Tr
Lipídeos (g)	Tr
Colesterol (g)	NA
Carboidratos (g)	14,7
Fibra alimentar (g)	0,2
Cinzas (g)	0,2
Cálcio (mg)	9
Magnésio (mg)	7

Fonte: (UNICAMP, 2011).*Tr: traço; NA: não aplicável.

Os compostos fenólicos presentes no suco de uva são os responsáveis pela cor e adstringência. Um desses compostos é o tanino, que possui efeito antibiótico. A pectina auxilia no aumento da viscosidade do suco graças ao seu poder geleificante (RIZZON; MENEGUZZO, 2007, p. 11). Assim como as uvas frescas, o suco de uva também é importante fonte de antocianinas. Entretanto, os processos aos quais a uva

passa para ser transformada em suco fazem com que a quantidade desses flavonóides variem no produto processado (MALACRIDA; MOTTA, 2005). A uva é uma das frutas que mais sofre exposição a agrotóxicos os quais podem deixar resíduos nas frutas e em seus produtos processados, como o suco e vinho (ALVES, et al., 2014; BERNARDI, 2017). Segundo Picó e Kozmutza (2007), muitos agrotóxicos utilizados na cultura da fruta podem ser degradados por meio de mecanismos oxidativos, entretanto, devido a presença de antioxidantes no suco de uva, como as antocianinas, a persistência dessas substâncias químicas pode ser reforçada. O suco de uva integral é uma matriz complexa que possui muitos compostos naturais, como as antocianinas, que podem interferir na determinação de agrotóxicos através do efeito matriz, ocasionando a competição com os analitos na etapa de extração (AHUMADA; ZAMUDIO; ESPAÑA, 2012).

2.3 AGROTÓXICOS

Visando a proteção dos cultivos de videiras e garantia dos índices de produtividade, os agrotóxicos são aplicados com o intuito de controlar pragas e doenças. As doenças fúngicas oídio (*Uncinula necator*), míldio (*Plasmopora vitícola*) e bolor cinza (*Botrytis cinérea*) são as mais comuns nestas plantações. Além destas, insetos como a traça europeia (*Lobesia botrana*), cochonilha (*Planococcus ficus*) e choconilha branca (*Planococcus citri*) são nocivos para esta cultura. Dessa forma, para evitar perdas de produção, uma grande variedade de agrotóxicos, principalmente fungicidas e inseticidas tem uso permitido no cultivo de videiras (GRIMALT; DEHOUCK, 2016).

2.3.1 Definição

De acordo com a Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989 (BRASIL, 1989), os agrotóxicos e afins são definidos como:

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

Ainda, segundo o Codex Alimentarius (FAO, 2005), agrotóxicos são quaisquer substâncias que previnem, destroem, atraem, repelem ou controlam qualquer praga ou espécie indesejada de plantas ou animais durante os processos envolvidos na produção de alimentos em geral. Além disso, o termo agrotóxico não inclui fertilizantes, nutrientes vegetais e animais, aditivos alimentares e medicamentos para animais. O Codex Alimentarius realiza a definição do termo resíduo de agrotóxico, sendo esse, qualquer substância presente em alimentos, commodities agrícolas ou ração animal que seja proveniente do uso de um agrotóxico, incluindo resíduos de fontes desconhecidas ou inevitáveis. O termo inclui quaisquer derivados de um agrotóxico como, produtos de conversão, metabólitos, produtos reacionais e impurezas (FAO, 2005).

2.3.2 Classificação dos agrotóxicos

Existem várias formas de classificação dos agrotóxicos, uma delas é com base no modo de interação com o alvo, podendo este ser sistêmico, contato, venenos estomacais, fumegantes e repelentes (YADAV; DEVI, 2017, p. 141).

Os agrotóxicos sistêmicos, como o 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e glifosato, são aqueles absorvidos por plantas ou animais e transferidos para os tecidos não tratados. Além disso, podem alcançar folhas, caules ou raízes onde não foram aplicados pois se locomovem através do sistema vascular da planta. Os agrotóxicos não sistêmicos atuam diretamente por contato físico com as pragas ou espécies-alvo. Eles não penetram nos tecidos das plantas. O dibrometo de paraquat e o diquat são exemplos desta classe. Por outro lado, os agrotóxicos classificados como venenos

estomacais são aqueles que agem diretamente no sistema digestivo da espécie-alvo causando a morte por envenenamento. Como exemplo deste tipo de agrotóxico cita-se a malationa. Os agrotóxicos com ação fumigante causam a morte das espécies-alvo através do sistema respiratório, o vapor produzido por eles causa envenenamento. Por fim, os agrotóxicos classificados como repelentes não matam, apenas afastam as pragas da área desejada (YADAV; DEVI, 2017, p. 142).

Outro método de classificação de agrotóxicos é baseado na função e no organismo da espécie que eles atacam (YADAV; DEVI, 2017, p. 143). A Tabela 3 exemplifica os principais tipos de agrotóxicos de acordo com essa classificação.

Tabela 3 - Classificação dos agrotóxicos por espécie-alvo.

Tipo de agrotóxico	Espécies-alvo/função	Exemplos
Inseticidas	Causa a morte de insetos e artrópodes	Aldicarb
Fungicidas	Causa a morte de fungos (incluindo bolores e ferrugem)	Azoxistrobina
Bactericidas	Causa a morte e age contra bactérias	Complexos de cobre
Herbicidas	Causa a morte de plantas daninhas	Atrazina
Acaricidas	Causa a morte de ácaros	Bifenazato
Repelentes	Repelem pragas através do seu sabor ou cheiro	Metiocarb
Desseccantes	Age nas plantas secando seus tecidos	Ácido bórico
Nematicidas	Causa a morte de nematódeos que atuam como parasitas em plantas	Aldicarb
Termiticidas	Causa a morte de cupins	Fipronil

Fonte: Adaptação de YADAV; DEVI, 2017, p. 143.

Ainda, pode-se classificar os agrotóxicos de acordo com sua composição química. Podemos ressaltar que os dois grandes grupos seriam agrotóxicos naturais (a base de plantas ou de óleos minerais) e agrotóxicos sintéticos (subdivididos em orgânicos e inorgânicos) (YADAV; DEVI, 2017, p. 144).

Os agrotóxicos sintéticos orgânicos são classificados, na sua maioria, em quatro grupos: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides etc (YADAV; DEVI, 2017, p. 144). Os organoclorados possuem como principal elemento

o cloro e possuem propriedades notáveis como estabilidade e baixíssima solubilidade em água. Exemplos desse tipo de agrotóxico são o hexaclorobenzeno, diclorobenzeno e o DDT (*para-diclorodifeniltricloroetano*). Em 1985, o uso dos organoclorados, citados acima, foi proibido no Brasil para fins agropecuários (CETESB, 2018). Os agrotóxicos organofosforados são derivados do ácido fosfórico e são considerados menos persistentes e bioacumuladores. O diclorvós e a parationa são exemplos desta classe (BAIRD; CANN, 2011, p. 463). Os carbamatos são agrotóxicos que compartilham de um mesmo grupo funcional cuja estrutura é $-NH(CO)O-$. Exemplos de carbamatos são o carbofurano, carbaril e aldicarbe (BAIRD; CANN, 2011, p. 468). Os inseticidas piretróides são agrotóxicos sintéticos derivados da piretrina. A cipermetrina é um exemplo desta classe (BAIRD; CANN, 2011, p. 469-470).

Os agrotóxicos também são classificados quanto a sua toxicidade, considerando a dose letal oral, cutânea e inalatória estabelecida. A RDC nº 294, de 29 de julho de 2019 (ANVISA, 2019), apresenta no art. 39 a classificação por categorias como mostra a Tabela 4.

Tabela 4 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos.

Categoria	Classificação	Faixa do rótulo
1	Produto Extremamente tóxico	vermelha
2	Produto Altamente Tóxico	vermelha
3	Produto Moderadamente Tóxico	amarela
4	Produto Pouco Tóxico	azul
5	Produto Improvável de Causar Dano Agudo	azul
Não classificado	Produto Não Classificado	verde

Fonte: (ANVISA, 2019).

2.3.3 Monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos

Devido ao uso indiscriminado e aos possíveis efeitos tóxicos dos agrotóxicos à saúde humana e ao meio ambiente há uma concentração máxima em que estas substâncias podem estar presentes nos alimentos. Estas são denominadas de Limites Máximos de Resíduos (LMRs) e são expressas em $mg\ kg^{-1}$. Os LMRs são estabelecidos por instituições internacionais como *European Commission*, *Codex*

Alimentarius e, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (ANVISA, [s.d.]; EUROPEAN COMMISSION, [s.d.]; FAO, [s.d.]). Esses limites são definidos para alimentos *in natura*, entretanto, segundo o Art. 39 da RDC nº 4, de 18 de janeiro de 2012 (ANVISA, 2012), os alimentos processados deverão adotar os mesmos LMRs.

De acordo com o Reg. Nº 396/2005 (OFFICIAL JOURNAL UE, 2005), art. 20 da legislação da União Europeia, quando os LMRs para produtos processados, como o suco de uva, não forem estabelecidos, leva-se em consideração o LMR do produto relevante abrangido. Dessa forma, no presente trabalho, para os princípios ativos que não possuem LMRs definidos serão considerados os LMRs estabelecidos para a uva *in natura*. Em 2011 foi criado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), com o intuito de monitorar os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos de origem vegetal que chegam à mesa do consumidor (ANVISA - PARA, 2019, p. 17).

No ano de 2019 foi divulgado o relatório das amostras analisadas entre 2017 e 2018. No total foram analisadas 4.616 amostras de 14 diferentes tipos de alimentos de origem vegetal e consumidos diariamente pela população. Das 4.616 amostras analisadas, 77% obtiveram resultados satisfatórios, sendo que 49% das amostras satisfatórias não foram encontrados resíduos de agrotóxicos e nos outros 28% a concentração dos resíduos foi igual ou inferior ao LMR estabelecido para a cultura. Os outros 23%, 1.072 amostras do total, apresentaram resultados insatisfatórios, sendo amostras contendo ingrediente ativo em concentração acima do LMR, ingrediente ativo não permitido para a cultura (NPC) e/ou ingrediente ativo proibido para a cultura (ANVISA - PARA, 2019, p. 33-34).

No Relatório do PARA do período de 2017-2018, foram analisadas 319 amostras de uva. Sendo que, 233 amostras apresentaram resultados satisfatórios. Destas, 84 não apresentaram resíduos para os agrotóxicos pesquisados e 149 apresentaram concentrações iguais ou inferiores ao LMR. Os princípios ativos mais detectados nesta matriz foram etefom (122 amostras) – que atua como regulador de crescimento, difenoconazol (70 amostras) –fungicida, e imidacloprido (60 amostras) – inseticida (ANVISA - PARA, 2019, p. 54; ANVISA, [s.d.]).

Os agrotóxicos etefom, clotianidina e bifentrina foram os mais detectados em concentrações acima do LMR. Além disso, do total de amostras analisadas, 48 obtiveram resultados positivos para princípios ativos não permitidos para a cultura (NPC), dentre eles, propargito, hexitiazóxi, fempiroximato e acefato (ANVISA - PARA, 2019, p. 54).

A Tabela 5 apresenta a lista de agrotóxicos permitidos, segundo o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com os LMRs estabelecidos pela ANVISA, União Europeia e *Codex alimentarius* para a cultura da uva. No Brasil, são liberados para uso no cultivo de uva cerca de 80 princípios ativos. Na Tabela 5 estão descritos 68 destes compostos pois, foram retirados compostos inorgânicos e sais. A maioria dos agrotóxicos permitidos para este cultivo são fungicidas e inseticidas visto que as principais doenças acometidas a cultura são causadas por fungos e insetos (GRIMALT; DEHOUCK, 2016). Os LMRs estabelecidos pela legislação brasileira encontram-se em uma faixa de 0,01 a 20 mg kg⁻¹.

Tabela 5 - Agrotóxicos permitidos, segundo o AGROFIT, com os Limites Máximos de Resíduos (LMR), mg kg⁻¹, estabelecidos para a cultura de uva de acordo com a ANVISA, União Europeia e *Codex alimentarius*.

(continua)

Agrotóxicos	LMR (mg kg ⁻¹)		
	ANVISA	EU	CODEX
Abamectina	0,03	0,01	0,03
Acetamiprido	0,30	0,5	0,5
Ametrina	0,02	-	-
Azadiractina	s/ restrições	1,00	-
Azoxistrobina	1,00	3,00	2,00
Benalaxil	0,10	0,30	0,30
Bentiavalicarbe isopropílico	0,10	0,30	-
Bifentrina	0,10	0,30	0,30
Boscalida	3,00	5,00	5,00
Brometo de metila	20,00	-	-
Captana	2,00	-	25,00
Cianamida	*	0,01	-
Ciazofamida	0,50	2,00	1,50
Cimoxanil	0,20	0,30	-
Cinetina	**	-	-
Cipermetrina (zeta)	0,50	0,50	0,20
Ciproconazol	0,10	0,20	-
Cletodim	0,05	-	-

(continuação)

Agrotóxicos	LMR (mg kg ⁻¹)		
	ANVISA	EU	CODEX
Clorantraniliprole	0,10	1,00	-
Clorotalonil	5,00	3,00	3,00
Clotianidina	0,01	0,70	0,70
Cresoxim-metílico	0,50	1,50	1,50
Difenoconazol	0,50	3,00	3,00
Dimetomorfe	2,00	3,00	3,00
Ditianona	2,00	3,00	-
Diurum	0,10	0,01	-
Espinetoram	0,30	0,50	0,30
Espinosade	0,02	-	0,50
Etefom	2,00	-	0,80
Etofenproxi	1,50	4,00	4,00
Famoxadona	2,00	2,00	2,00
Fenamidona	0,20	0,60	0,60
Fluopicolida	0,50	2,00	2,00
Flupiradifurone	2,00	0,80	3,00
Folpete	5,00	-	10,00
Formetanato	1,00	0,10	-
Fosetil	6,00	100,00	60,00
Glifosato	0,20	0,50	-
Glufosinato – Sal de amônio	0,05	-	0,15
Imibenconazol	2,00	-	-
Imidacloprido	1,00	1,00	1,00
Indaziflam	0,01	-	-
Indoxacarbe	0,07	2,00	2,00
Iprodiona	1,00	0,01	10,00
Lambda-cialotrina	0,30	-	-
Mancozebe (ditiocarbamato)	3,00	5,00	-
Metaflumizone	3,00	0,05	-
Metalaxil-M	1,00	-	1,00
Metconazol	1,00	0,02	-
Metiram (ditiocarbamato)	3,00	5,00	-
S-metolacloro	0,01	0,05	-
Miclobutanil	0,50	1,00	0,90
Óleo mineral	s/ restrições	-	-
Piraclostrobina	2,00	-	2,00
Pirimetanil	5,00	5,00	4,00
Piriproxifem	5,00	0,05	-
Procimidona	5,00	0,01	-
Propinebe (ditiocarbamato)	3,00	1,00	-
Simazina	0,02	-	-
Tebuconazol	2,00	-	6,00
Teflubenzurom	1,00	0,70	0,70
Tetraconazol	0,30	0,50	-
Tiametoxam	0,50	-	-
Tiofanato-metílico	0,70	-	-

Agrotóxicos	(conclusão)		
	ANVISA	LMR (mg kg ⁻¹) EU	CODEX
Triadimenol	0,10	0,30	0,30
Trifloxistrobina	0,30	3,00	3,00
Triflumizol	0,10	0,02	3,00
Zoxamida	0,50	5,00	5,00

*Não determinado devido à modalidade de emprego. **Não determinado devido à sua ocorrência natural em culturas alimentares. Fontes: (ANVISA, [s.d.]; EUROPEAN COMMISSION, [s.d.]; FAO, [s.d.]).

O *Codex alimentarius* ainda estabelece os LMRs para alguns princípios ativos no suco de uva, como mostra a Tabela 6. A legislação brasileira não possui LMRs definidos para o suco de uva.

Tabela 6 – Limites máximos de resíduos (LMRs) estabelecidos pelo Codex Alimentarius para agrotóxicos em suco de uva.

Agrotóxicos	LMR (mg kg ⁻¹)
Abamectina	0,05
Clotianidina	0,20
Diclobenil	0,07
Propargito	1,00

Fonte: (FAO, [s.d.])

Comparando-se os LMRs estabelecidos pelo *Codex alimentarius* para uva in natura e para o suco de uva é possível observar que a abamectina e o diclobenil possuem LMR maior no suco de uva do que na fruta in natura. Por outro lado, para a clotianidina e propargito o LMR do suco é menor que o da uva in natura. Considerando que as práticas agrícolas podem ser inadequadas, se faz necessário observar se os níveis de resíduos de agrotóxicos estão de acordo com os LMRs estabelecidos pela legislação. A presença destas substâncias pode comprometer a qualidade dos alimentos, de seus produtos processados e causar riscos à saúde do consumidor (GRIMALT; DEHOUCK, 2016).

2.4 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

A determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos tornou-se um grande desafio devido à alta complexidade da matriz e a baixa concentração dos compostos comumente presentes nessas amostras. Nos últimos anos, as técnicas cromatográficas tiveram grandes avanços, que possibilitam a determinação rápida e simultânea de diversos analitos associada a baixos limites de detecção. Apesar destas características, a etapa de preparo de amostra continua bastante importante para a obtenção de resultados adequados (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007).

O principal objetivo do preparo das amostras é homogeneizar as amostras, isolar os analitos de interesse dos interferentes e adequar a concentração a um nível adequado para sua determinação (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015, p. 9).

Os primeiros métodos multirresíduos para extração de agrotóxicos foram desenvolvidos entre os anos de 1960 e 1980, sendo os mais utilizados na época: o método de Mills, o método de Storherr, o método de Luke e a sua miniaturização – método Mini-Luke. Entretanto, todos esses métodos utilizavam um grande volume de solvente e amostra - não sendo sustentáveis, possuíam um alto custo de execução e várias etapas – o que aumentava a probabilidade de erros (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015, p. 230-231).

Nas últimas décadas, novos métodos de preparo de amostra foram desenvolvidos com o intuito de aumentar o número de agrotóxicos analisados, diminuir o volume de solvente e amostra, utilizar solventes menos tóxicos e diminuir o tempo de extração (REJCZAK; TUZIMSKI, 2015). Dentre esses, estão extração por fluído supercrítico (SFE), microextração em sorvente empacotado (MEPS), extração e microextração líquido-líquido dispersiva, extração em fase sólida (SPE) e QuEChERS (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007).

2.4.1 Método QuEChERS

Anastassiades *et al.* (2003) desenvolveram o método QuEChERS – “*quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*”, que significa rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro. Este método utiliza acetonitrila como solvente de extração e em menor quantidade (10 mL) quando comparado com outros procedimentos. Além de

utilizar um solvente menos tóxico, possui um menor número de etapas e apresenta a extração em fase sólida dispersiva como um novo método para limpeza dos extratos (SANTANA-MAYOR, A. *et al.*, 2019). O método QuEChERS é baseado em uma extração sólido-líquido, seguida por uma etapa de particionamento promovida pela adição de sais (efeito *salting-out*) e limpeza por d-SPE (SANTANA-MAYOR, A. *et al.*, 2019). Os extratos obtidos a partir do método QuEChERS podem ser avaliados por diferentes técnicas cromatográficas (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

No método QuEChERS original utilizam-se 10 gramas de amostra e 10 mL de acetonitrila na etapa de extração. A acetonitrila foi o solvente que melhor se adequou a esta etapa do método devido a sua capacidade de extrair uma menor quantidade de co-extrativos provenientes da amostra. Após adicionam-se 4 gramas de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e 1 grama de cloreto de sódio (NaCl). Estes sais são responsáveis por promover o “efeito *salting-out*”, que consiste em diminuir a solubilidade dos compostos polares na fase aquosa e a quantidade de água na fase orgânica, melhorando, assim, a recuperação dos analitos (PRESTES *et al.*, 2009; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Na etapa de limpeza ou *clean-up*, 1 mL do sobrenadante do extrato resultante das etapas anteriores é transferido para um outro tubo contendo 150 mg de $MgSO_4$ e 25 mg de amina primária-secundária (PSA). Esta etapa é essencial para garantir a robustez e confiabilidade dos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico (PRESTES *et al.*, 2009). O PSA é responsável por reter ácidos graxos e compostos polares, presentes na matriz, devido ao seu efeito quelante. Enquanto o $MgSO_4$ remove a água presente no extrato e auxilia na partição da matriz (BRUZZONITI *et al.*, 2014). Após, o extrato final é filtrado com filtro de membrana, para assegurar que qualquer material particulado presente não irá para o cromatógrafo e na sequência o mesmo é injetado no equipamento.

2.4.1.1 Modificações no método QuEChERS

O método QuEChERS original é aplicado a uma ampla gama de compostos e a diferentes tipos de amostras, entretanto, em estudos, alguns compostos como o tiabendazol, imazalil e carbendazina, apresentavam problemas com a estabilidade

e/ou recuperação devido ao pH da matriz. A maioria dos agrotóxicos são estáveis em uma ampla faixa de pH, porém alguns compostos, como os citados, necessitam de pH maiores para apresentarem boa recuperação, isso por quê estão em sua forma protonada e solubilizados na fase aquosa. Portanto, foram necessárias algumas modificações no método original para melhorar a recuperação desses compostos (PRESTES *et al.*, 2009; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

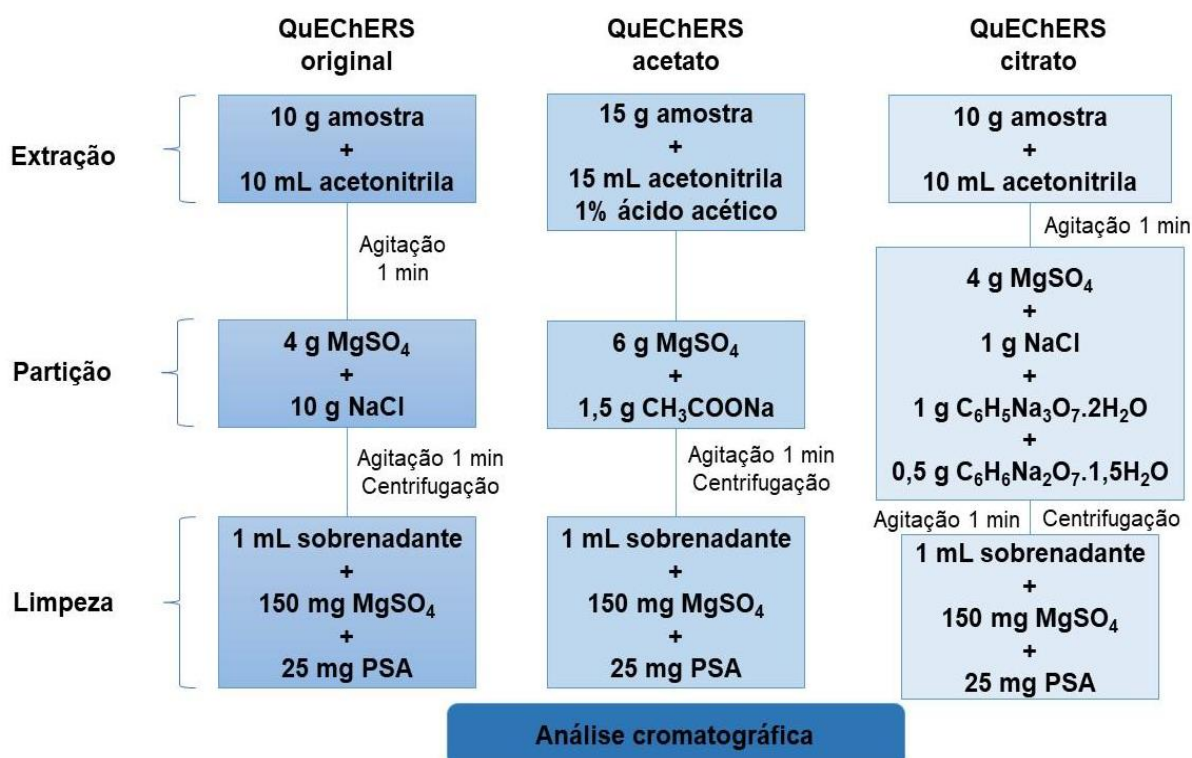
Lehotay e colaboradores (2005) adicionaram ao método original uma etapa de tamponamento e desenvolveram o método QuEChERS acetato, que utiliza acetonitrila acidificada com 1% de ácido acético e acetato de sódio (CH_3COONa) como sal de partição, formando um tampão em pH 4,8. Este foi reconhecido como o método oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (PRESTES *et al.*, 2009; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Anastassiades e colaboradores (2007) desenvolveram o método QuEChERS citrato que utiliza uma mistura de citrato de sódio diidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e hidrogenocitrato sesquihidratado ($\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$) que formam um tampão em pH 5,0-5,5 (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

A Figura 2 exemplifica as três versões do método QuEChERS e ainda detalha as massas e volumes de amostra, solventes, sais e sorventes utilizados.

A versatilidade deste método permite que diversas alterações (solvente, sais de partição, formas de agitação, etc) sejam realizadas para proporcionar os resultados mais adequados. Entre estas adequações, destacam-se os sorventes de limpeza empregados na etapa de d-SPE. Estes materiais podem ser utilizados de acordo com a composição da matriz em estudo. Por exemplo, para remover lipídios recomenda-se a utilização de C18. Por outro lado, o carbono grafitizado (GCB) é indicado na remoção eficaz de pigmentos (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Figura 2 – Versões do método QuEChERS: original, acetato e citrato.



Fonte: Adaptada de PRESTES *et al.*, 2009 e PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011.

2.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

A escolha do método analítico adequado para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos deve levar em consideração que estas amostras podem ter teores variáveis de lipídeos, carboidratos, proteínas, pigmentos, entre outros, e são consideradas matrizes complexas. Além disso, essas determinações exigem alta detectabilidade para quantificar os agrotóxicos em baixas concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$ ou $\mu\text{g L}^{-1}$). As técnicas cromatográficas apresentam as características adequadas de sensibilidade e especificidade e, por este motivo, são as mais utilizadas para este tipo de determinação (MEIRA; 2015).

As principais técnicas de separação utilizadas para análises de resíduos de agrotóxicos são a cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*) e a cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*). A GC possui um poder de resolução excelente, sendo possível analisar diversos analitos em uma mesma amostra. Além da resolução, a alta sensibilidade desta técnica permite a utilização de

pequenas quantidades de amostra e ainda, fornece resultados quantitativos em concentrações na faixa de picograma à miligrama (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Nos últimos anos, devido ao desenvolvimento e utilização de agrotóxicos de características mais polares e iônicos houve um aumento significativo na utilização da LC para estas determinações. Esta técnica possui alta sensibilidade além de possibilitar a separação de espécies não-voláteis ou termicamente instáveis (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002, p. 641).

Na LC emprega-se pequenas colunas e a fase móvel é eluída sob altas pressões o que proporciona a separação de um grande número de compostos em uma mesma amostra, com alta resolução, eficiência, detectabilidade e em menor tempo (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Nas últimas décadas, esta técnica tem sido aprimorada com o intuito de melhorar ainda mais os parâmetros como detectabilidade, resolução, tempo de análise, rendimento e custo. Entre estes aprimoramentos cita-se a produção de partículas de fase estacionária com diâmetros $\leq 2 \mu\text{m}$ e o desenvolvimento de sistemas de bombeamento de fase móvel que suportam pressões de trabalho da ordem de 15.000 psi. Estas novas tecnologias, permitiram o desenvolvimento da cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC, do inglês *ultra-high pressure liquid chromatography*) de tornando as análises mais rápidas, eficientes e possibilitando um significativo aumento da detectabilidade. A diminuição do diâmetro das partículas da FE juntamente com a velocidade linear da FM aumenta a resolução e a detectabilidade, entretanto faz-se necessário maiores pressões cromatográficas (MALDANER; JARDIM, 2012).

2.5.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série para determinação de resíduos de agrotóxicos

De acordo com Skoog e colaboradores (2002, p. 445) a espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) é utilizada para “identificação e determinação quantitativa de um ou mais elementos em uma amostra”. Esta técnica baseia-se na determinação dos compostos a partir de sua razão massa/carga (m/z). O espectrômetro de massas é composto por uma interface (onde é introduzido o

vácuo), uma fonte de íons (que não necessariamente estará sob vácuo), um analisador de massas e um detector (LANÇAS, 2013).

A combinação das vantagens das técnicas cromatográficas, como por exemplo a LC, como alta seletividade e eficiência de separação, somadas as vantagens da MS, como a obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento de seletividade, garantem o sucesso do acoplamento destas técnicas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Nos sistemas LC-MS as fontes de ionização mais utilizadas são a eletronebulização (*electrospray ionization* - ESI), ionização química à pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization* – APCI) e fotoionização à pressão atmosférica (*atmospheric pressure photoionization* – APPI) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

A ESI geralmente se encontra à pressão atmosférica. A fase móvel contendo o analito sai da coluna por um capilar onde é aplicado uma alta voltagem, geralmente entre 3000 e 5000 V. Isso acarreta a formação de pequenas gotas carregadas. Um fluxo de nitrogênio aquecido na região do spray faz com que ocorra a evaporação do solvente e as gotas reduzem o tamanho até que ocorra a explosão coulombica, que resulta nos íons do analito. Estes íons são transportados para o interior do espectrômetro de massas através de focalizadores (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002, p. 454-455; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Na ESI não ocorre degradação dos compostos podendo ser empregada para determinação de analitos sensíveis a temperatura (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Existem inúmeros tipos de analisadores de massas disponíveis no mercado, por exemplo: quadrupolo (e triplo quadrupolo), aprisionamento de íons (do inglês *ion trap*) e tempo de voo. O sistema a ser utilizado depende da aplicação, ou seja, a faixa de razão m/z que se deseja trabalhar, a resolução e o custo.

O quadrupolo consiste em quatro hastes metálicas, duas atuam sob correntes contínuas (DC) e duas sob correntes alternadas ou radiofrequência (Rf), combinadas entre si. Um par de barras age como um filtro de massas mais elevadas enquanto o outro age como um filtro para massas menores (LANÇAS, 2013). Apenas os íons de razão m/z selecionada passam pelas barras, descrevendo trajetórias anelares, sem se chocarem com as mesmas e chegam até o detector. Os demais íons possuem trajetórias instáveis, atingindo as barras e sendo eliminados através do sistema de

vácuo (LANÇAS, 2013; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). O sistema triplo quadrupolo é constituído por três quadrupolos em série. O primeiro quadrupolo filtra os íons precursores. Após estes íons são acelerados para uma região de alto vácuo localizada no segundo quadrupolo (cela de colisão) onde há adição de um gás inerte (geralmente Ar, He ou N₂) que colide com íons aumentando sua energia cinética e, conseqüentemente, motiva a fragmentação e formação de íons produtos. O processo que ocorre na cela de colisão é chamado de “dissociação induzida por colisão” (*collision-induced dissociation* – CID). O terceiro quadrupolo filtra os íons produtos provenientes da fragmentação do íon precursor (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Este sistema é um dos mais utilizados para determinação de resíduos de agrotóxicos.

Existem diversas técnicas de varreduras para obtenção do espectro de massas, sendo essas a varredura completa (do inglês *full scan*), o monitoramento de íons selecionado (do inglês *selected ion monitoring* – SIM), varredura do íon produto, varredura do íon precursor e monitoramento de reações selecionadas (do inglês *selected ion monitoring* – SRM). O modo *full scan* é utilizado, principalmente, quando não se sabe quais são os componentes presentes na amostra. O cromatograma obtido, é resultado do monitoramento de uma faixa de m/z, sendo chamado de cromatograma de íon total (do inglês *total ion chromatogram* – TIC). Por outro lado, o modo SIM é geralmente empregado quando se tem apenas um quadrupolo. Neste modo é escolhido apenas um íon a ser monitorado ou vários íons de analitos alvo, presentes em uma mistura complexa, aumentando a sensibilidade (STACHNIUK; FORNAL, 2016).

Na técnica de varredura do íon produto, o íon do analito é isolado no primeiro quadrupolo (Q1), é fragmentado na cela de colisão e por fim, no terceiro quadrupolo (Q3) é feita a varredura dos íons produtos formados a partir da fragmentação do íon precursor (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

No modo SRM é realizado o monitoramento do íon precursor e do resultado de sua fragmentação (íon produto). Para cada analito de interesse, seleciona-se uma fragmentação característica. Atualmente, a utilização da técnica de LC-MS/MS empregando analisadores de massa do tipo triplo quadrupolo operando no modo SRM

é considerado o estado da arte na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

2.6 APLICAÇÕES UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM SUCO DE UVA

Existem diversas possibilidades quanto ao preparo de amostras e aos instrumentos que podem ser utilizados para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de suco de uva. A Tabela 7 apresenta algumas aplicações empregando diferentes técnicas de preparo de amostra e determinação cromatográfica de resíduos de agrotóxicos em suco de uva.

Tabela 7—Aplicações empregando diferentes técnicas de preparo de amostra e cromatográficas para determinação de agrotóxicos em suco de uva.

(continua)

Extração	Clean-up	Nº de analitos	Instrumentação	Limite de quantificação (LOQ)	Referência
QuEChERS acetato	d-SPE (1 mL de extrato) 150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA	25 agrotóxicos	LC-MS/MS	0,0025-0,01 mg L ⁻¹	Souza <i>et al.</i> , 2016
QuEChERS citrato	Sem clean-up Solvente evaporado e redissolvido em F.M.	14 agrotóxicos	LC-MS/MS	-	Miele <i>et al.</i> , 2015
QuEChERS acetato	d-SPE com 150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA SPE – (cartucho de C18)	1 regulador de crescimento	LC-MS/MS	8 µg L ⁻¹	Orellana-Silla <i>et al.</i> , 2018
QuEChERS acetato	d-SPE (1 mL de extrato) 100 mg MgSO ₄ + 20 mg PSA	79 agrotóxicos	LC-MS/MS	5-10 µg L ⁻¹	Chiarello, M., 2018.
Microextração em gota única (SDME)	-	5 agrotóxicos	GC-FID	8-340 µg L ⁻¹	Farajzadeh <i>et al.</i> , 2011
Microextração líquido-líquido dispersiva suportada	Dessorção com acetonitrila	3 agrotóxicos	HPLC-DAD	58-107 µg L ⁻¹	Silva <i>et al.</i> , 2015

(conclusão)					
Extração	Clean-up	Nº de analitos	Instrumentação	Limite de quantificação (LOQ)	Referência
com membrana oca (HF-DLLME)					
Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por efervescência baseado e gota orgânica flutuante coesa (EA-DLLME-CFO)	Dissolvido em solução 1:1 (v/v) de 1-undecanol e metanol	13 agrotóxicos	UHPLC-MS/MS	2,7-9,7 ng L ⁻¹	Liu <i>et al.</i> , 2018
Extração líquido-líquido (LLE)	Cartucho SPE com Florisil	15 agrotóxicos	GC-MS-SIM	3,75-9,47 mg L ⁻¹	Alves, <i>et al.</i> , 2014
Extração com metanol: diclorometano (40:60 v/v)	Sem clean-up - apenas evaporação e redissolução com solução de metanol:tolueno (95:5 v/v)	41 agrotóxicos	UHPLC-HRMS	0,1-0,5 ng mL ⁻¹	Deme <i>et al.</i> , 2015
SPE - (nanotubo de carbono)	Evaporação Limpeza com ciclohexano e Na ₂ SO ₄	8 agrotóxicos	GC-NPD	6,4-23,3 µg L ⁻¹	Ravelo-Pérez <i>et al.</i> , 2008

Souza e colaboradores desenvolveram um método para determinação de resíduos de 25 agrotóxicos de diferentes classes em suco de uva. Neste trabalho, o método QuEChERS acetato foi empregado como método de extração associado a LC-MS/MS para a separação e detecção dos compostos, respectivamente. Foram encontrados resíduos dos fungicidas azoxistrobina, metalaxil e tebuconazol em concentrações que variaram entre 8,5 e 10 µg L⁻¹ (SOUZA, F.S.; SOUZA, E.L.; BORGES, 2016). Chiarello (2018) empregou o método QuEChERS acetato para determinação de 79 agrotóxicos por LC-MS/MS. Foram encontrados, em altas concentrações, os fungicidas carbendazim e azoxistrobina, em amostras de suco de uva produzidos na região sul do Brasil.

Miele e colaboradores, utilizaram o método QuEChERS citrato e LC-MS/MS para determinação de resíduos de agrotóxicos, comumente utilizados em videiras brasileiras como: azoxistrobina, cipermetrina, ciproconazol, difenoconazol, fenarimol, fenitrotiona, glifosato, mancozeb, miclobutanil, piraclostrobina, simazina, tebuconazol, tiofanato metílico e triadimefon. Após análises em 27 amostras de sucos de uva, nenhuma apresentou os agrotóxicos avaliados (MIELE *et al.*, 2015).

Picó e Kozmutza (2007) avaliaram o perfil de degradação de quatro agrotóxicos (aldicarbe, demeton-S-metil-sulfona, fenamifós e metiocarbe) em amostras de sucos de uva e em soluções aquosas acidificadas. Neste trabalho foi utilizada a SPE e determinação LC-MS/MS. A partir dos resultados obtidos foi possível observar que a degradação foi mais lenta no suco de uva quando comparada com a degradação em solução aquosa acidificada. Esses resultados indicam que os antioxidantes naturais presentes no suco de uva podem reduzir a taxa de degradação de agrotóxicos através do mecanismo oxidativo, aumentando, assim, a persistência dos compostos na amostra.

Através destes estudos é possível observar a importância da determinação de resíduos de agrotóxicos em suco de uva visto que é um produto consumido rotineiramente. Atualmente, devido à baixa concentração dos analitos e a grande concentração de outros componentes na matriz, que possam influenciar na determinação, vêm sendo necessário o desenvolvimento de metodologias rápidas, precisas, exatas e sensíveis visando garantir a qualidade dos resultados (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015, p. 2).

2.7 VALIDAÇÃO

De acordo com o Art. 4º da RDC nº 166, de 24 de junho de 2017 (ANVISA, 2017), “a validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos”. Ainda, segundo Brito e colaboradores (2003), a validação de um método analítico é um processo de avaliação que estima a eficiência do método na rotina do laboratório.

No Brasil, a ANVISA, INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industria e MAPA são alguns dos órgãos oficiais responsáveis por credenciar laboratórios de ensaios. Independente dos parâmetros de validação a serem seguidos, é essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras avaliados sejam adequados. Um método analítico desenvolvido para avaliação de um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método multirresíduo desenvolvido para análise de traços. A frequência com que o método será utilizado (muitas vezes em um dia, uma vez em um dia para um estudo rápido, uma vez em um mês, etc) também influencia o tipo de estudo de validação que é necessário.

No processo de validação alguns parâmetros são avaliados, sendo esses: seletividade; linearidade e faixa de trabalho; limite de detecção (LOD); limite de quantificação (LOQ); recuperação; precisão (repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermediária); exatidão (INMETRO, 2020); estabilidade e *ion ratio* (SANTE, 2019). Estes parâmetros estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos.

(continua)			
Parâmetro	Definição	Aplicação	Critério
Seletividade	Capacidade do método em detectar o analito de interesse mesmo na presença de outros componentes da matriz	Extração da matriz "branco"	Ausência de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos
Linearidade	Correlação entre a resposta analítica e concentração	Curva analítica ($y = ax + b$)	$r^2 \geq 0,99$
Faixa linear de trabalho	Faixa de concentração do analito onde os resultados obtidos são proporcionais à concentração do mesmo	Curva analítica ($y = ax + b$)	$r^2 \geq 0,99$
Limite de detecção	Menor concentração que pode ser detectada pelo instrumento	S/R = 3	-
Limite de quantificação	Menor concentração que pode ser quantificada com exatidão e precisão	S/R = 10	$\leq \text{LMR}$
Precisão	Proximidade dos resultados obtidos	Repetibilidade, reprodutibilidade e	RSD $\leq 20\%$

(conclusão)			
Parâmetro	Definição	Aplicação	Critério
		precisão intermediária	
Estabilidade	Capacidade da solução padrão, preparada na matriz, de conservar os analitos sem que se degradem	Comparação do número de compostos recuperados em uma solução padrão, preparada na matriz, injetada em diferentes dias	-
Exatidão	Grau de concordância entre os resultados obtidos e o valor aceito como verdadeiro	Ensaio de fortificação	70-120%
Efeito Matriz	Supressão ou aumento do sinal analítico devido a influência dos componentes da matriz	Comparação das respostas das curvas de calibração no solvente e na matriz	± 20%
<i>Ion Ratio</i>	Razão dos íons de identificação e quantificação	Calculado pela razão das áreas do íon de identificação pelo íon de quantificação em cada injeção	± 30%

Fonte: INMETRO, 2020; ANVISA, 2017; BRITO, 2003; SANTE, 2019.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

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

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados a seguir:

- ✓ Sistema de purificação de água, Milli-Q Direct UV3 (Millipore, Molsheim, França);
- ✓ Estufa de secagem TE-393/1-MP (Tecnal, Brasil);
- ✓ Lavadora ultrassônica, linha Sonorex RK510 (Bandelin, Alemanha);
- ✓ Centrífuga refrigerada NT 825 (Nova Técnica, Brasil);
- ✓ Centrífuga 80-2B (Centribio, Brasil);

- ✓ Agitador Vórtex VX-38 (IonLab, Brasil);
- ✓ Balança analítica de precisão AUX220 (Shimadzu, Japão);
- ✓ Balança analítica de precisão UX420H (Shimadzu, Japão);
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- ✓ Para as análises cromatográficas foi utilizado o sistema LC-MS/MS, modelo 6470 LC/TQ (Agilent Technologies, EUA) compostos por:
 - Cromatógrafo a líquido, modelo Agilent 1290, contendo sistema controlador de solventes, bomba binária Infinity II Agilent G7120A;
 - Amostrador automático modelo Agilent G7167B com controle de temperatura;
 - Interface/fonte de ionização por eletronebulização (ESI) Agilent Jet Stream;
 - Detector: analisador de massas triplo quadrupolo (QqQ) modelo Agilent G6470A.
 - Software de aquisição dos dados MassHunter Workstation 10.0 (Agilent Technologies, EUA);

3.2 REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS UTILIZADOS

Os reagentes, solventes e demais materiais utilizados no desenvolvimento deste estudo estão citados abaixo:

- ✓ Acetonitrila grau HPLC (Merck, Alemanha);
- ✓ Ácido acético glacial, grau HPLC (Scharlau, Espanha);
- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3;
- ✓ Metanol, grau HPLC (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Formiato de amônio, pureza $\geq 99\%$ (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Acetona grau HPLC (Merck, Alemanha);
- ✓ Hexano, grau HPLC (Merck, Alemanha);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas de rosca com capacidade de 15 e 50 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro em pó, pureza $\geq 99,5\%$ (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Cloreto de sódio, pureza $\geq 90\%$ (Merck, Alemanha);
- ✓ Acetato de sódio anidro em pó, pureza $\geq 99\%$ (J.T. Baker, EUA);

- ✓ Citrato de sódio diidratado, pureza $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Hidrogenocitrato de sódio sesquidratado, pureza $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ DSC-18 SPE, tamanho de partícula de 50 μm (Supelco, Alemanha);
- ✓ PSA sílica, tamanho de partícula de 50 μm (Supelco, Alemanha);
- ✓ Celite, tamanho de partícula de 16,4 μm (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Polivinilpirrolidona, tamanho de partícula de $\sim 110 \mu\text{m}$ (Synth, Brasil);
- ✓ Filtros de nylon de 13 mm e porosidade de 0,22 μm (Allcrom, Brasil);
- ✓ Frascos de vidro (vial), capacidade de 2 e 4 mL (Agilent, EUA);
- ✓ Demais vidrarias comuns de laboratório.

3.3 AMOSTRAS DE SUCO DE UVA

A amostra de suco de uva integral (2 L) utilizada como “branco analítico” foi adquirida em um mercado local. Esta amostra apresentava certificação de produto orgânico, após avaliação pela técnica de LC-MS/MS não foram encontrados resíduos dos agrotóxicos em estudo. Outras 23 amostras de suco de uva integral, adquiridas em supermercados da cidade de Santa Maria, foram utilizadas na etapa de aplicação do método desenvolvido neste estudo. A maioria destas amostras foi produzida no Rio Grande do Sul, nas cidades Bento Gonçalves, Farroupilha, Flores da Cunha, São José do Hortêncio, Caxias do Sul, São Marcos e Vespesiano Côrrea, exceto duas amostras que são de Aracati (Ceará) e Araguari (Minas Gerais). As amostras foram mantidas em sua embalagem original, à temperatura ambiente, até sua utilização na análise. Como já estavam na forma líquida, a homogeneização foi realizada, com a agitação manual do frasco original, antes de utilizá-las no procedimento de extração. Após, foram armazenadas em frascos de polipropileno sob refrigeração, em temperatura abaixo de -4°C .

3.4 COMPOSTOS SELECIONADOS E PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Foram selecionados 168 agrotóxicos de diferentes classes para este estudo. Esta escolha foi baseada nos compostos de uso permitido para a cultura da uva no Brasil. Além destes, vários agrotóxicos que foram detectados no relatório do PARA

2017-2019 (ANVISA, 2020) e que tem uso proibido no cultivo de uva também foram incluídos neste trabalho. Além disso, foram analisados compostos que são encontrados com maior frequência nas análises de rotina realizadas no LARP a fim de complementar o método.

Os padrões sólidos dos agrotóxicos selecionados foram adquiridos das empresas Dr. Ehrenstofer (Alemanha), Sigma-Aldrich (EUA) e ChemService (EUA) e estão listados na Tabela 9, além de algumas características físico-químicas, massa molecular, classe agrônômica e grupo químico. Todos os padrões utilizados possuem pureza maior que 90%.

Inicialmente, foram preparadas soluções estoque individuais (10 mL) de cada analito, na concentração de 1000 mg L^{-1} . O cálculo para o preparo de cada uma das soluções estoque foi realizado através da massa a ser pesada, considerando a pureza de cada padrão. Após pesados, os padrões sólidos foram dissolvidos em solventes como acetonitrila ou metanol. As soluções estoque foram armazenadas em frascos âmbar e mantidas em freezer a temperatura abaixo de $-4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir das soluções estoque preparou-se duas soluções (em acetonitrila), contendo todos os analitos de interesse, nas concentrações de 10 e 5 mg L^{-1} .

A partir das soluções citadas anteriormente preparou-se uma solução padrão em acetonitrila na concentração de 1 mg L^{-1} . Esta solução foi utilizada para a fortificação das amostras “branco” e também para a construção das curvas analíticas preparadas no extrato da matriz e no solvente. Para injeção no sistema LC-MS/MS as concentrações finais das soluções foram 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 e $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

3.4.1 Utilização do Padrão Interno (PI) e Padrão de Controle (PC)

De acordo com a SANTE (2019), o padrão interno (PI) e o padrão de controle (PC) são substâncias químicas adicionadas nas amostras e no extrato final, em concentrações conhecidas. A presença destas substâncias tem a finalidade de verificar a execução correta do método analítico e a estabilidade da análise cromatográfica, auxiliando na localização de fontes de erros. Neste trabalho, empregou-se uma solução de atrazina-d5 (10 mg L^{-1} , preparada em acetonitrila) como PC. Esta solução foi adicionada para a avaliação do procedimento de extração na

forma de resultados de recuperação (70-120%). A solução de PC é adicionada às amostras anteriormente à extração dos analitos, nas mesmas concentrações empregadas para avaliação dos ensaios de recuperação (1, 2, 4 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$). Além disso, utilizou-se trifenílfosfato (TPP) como PI na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (adição de 2 μL de uma solução 5 mg L^{-1} , preparada em acetonitrila). Este foi adicionado nos vials de injeção, antes da análise cromatográfica. O PI foi utilizado para verificar a execução correta da análise cromatográfica, sendo aceito valores de variação de área de até 20% (SANTE, 2019).

Tabela 9 – Agrotóxicos analisados, classe agronômica, grupo químico, massa molecular, pureza, e suas propriedades físico-químicas (solubilidade, pKa e LogKow).

(continua)

nº	Compostos	Classe Agronômica	Grupo químico	Massa molecular	Pureza(%)	Solubilidade em H2O á 20° C (mg/L)	pKa	log Kow
1	2,4-D	H	Ácido ariloxialcanóico	221	99,0	24300	3,40	-0,82
2	3-OH-carbofurano	I	Carbamato	237	99,0	4670	3,60	0,70
3	Abamectina	I, A, N, ME e MV	Avermectina	867	97,0	0,02	*	4,40
4	Acefato	I e A	Organofosforado	183	99,0	790000	8,35	-0,85
5	Acetamiprido	I	Neonicotinóide	222	99,0	2950	0,70	0,80
6	Alacloro	H	Cloroacetanilida	270	97,5	240	0,62	3,09
7	Aldicarbe	A, I e N	Carbamato	190	99,0	4930	*	1,15
8	Ametrina	H	Triazina	227	98,2	200	10,07	2,63
9	Atrazina	H	Triazina	216	99,0	35	1,70	2,70
10	Atrazina-d5 (PC)	-	Triazina	221	99,8	-	-	-
11	Azaconazol	F	Triazol	300	97,6	300	3,00	2,36
12	Azametifós	I	Organofosforado	325	97,0	1100	-	1,05
13	Azinfós etílico	I	Organofosforado	345	99,0	4,5	-	3,18
14	Azinfós metílico	I	Organofosforado	317	99,0	28	5,00	2,96
15	Benalaxil	F	Acilalaninato	325	99,5	28,6	*	3,54
16	Benomil	F e M	Benzimidazol	290	97,5	2	4,48	1,40
17	Bentazona	H	Benzotiadiazinona	240	99,0	7112	3,51	-0,46
18	Bifentrina	I e A	Piretróide	423	99,7	0,001	*	6,60
19	Bitertanol	F	Triazol	337	99,0	3,8	*	4,10
20	Buprofezina	I e A	Tiadiazinona	305	99,0	0,46	*	4,93
21	Butóxido de piperonila	I	Benzodioxol	338	92,5	14,3	-	4,75
22	Carbaril	I e RC	Carbamato	201	100,0	9,1	10,40	2,36
23	Carbendazim	F e ME	Benzimidazol	191	98,5	8	4,20	1,48
24	Carbofurano	I, N, A e ME	Carbamato	221	99,0	322	*	1,80
25	Carboxina	F	Oxatina	235	99,0	134	0,50	2,30

nº	Compostos	Classe Agronômica	Grupo químico	Massa molecular	Pureza(%)	Solubilidade em H ₂ O á 20° C (mg/L)	pKa	log Kow
26	Cialofope Butílico	H	Ácido ariloxifenoxipropiônico	357	99,0	0,44	-	3,32
27	Cianazina	H	Triazina	241	99,0	171	12,90	2,10
28	Cimoxanil	F	Oxima de cianoacetamida	198	99,5	780	9,30	0,67
29	Ciproconazol	F	Triazol	292	98,6	93	*	3,09
30	Ciprodinil	F	Anilino pirimidina	225	100,0	13	4,44	4,00
31	Cletodim	H	Oxima ciclohexanodiona	360	90,0	5450	4,47	4,14
32	Clofentezina	A	Tetrazina	303	99,0	0,0342	-	4,09
33	Clorantranilipole	I	Antranilamida	483	97,8	0,88	10,88	2,86
34	Clorimurom etílico	H	Sulfoniluréia	415	99,5	1200	4,20	0,11
35	Clorotalonil	F	Cloronitrila	266	98,5	0,81	*	2,94
36	Clorpirifós metílico	I e A	Organofosforado	323	98,0	2,74	-	4,00
37	Clotianidina	I e ME	Neonicotinóide	250	99,3	340	11,10	0,91
38	Cresoxim metílico	F e B	Estrobilurina	313	97,4	2	*	3,40
39	Dazomete	I, F, H e FU	Ditiocarbamato	162	98,0	3500	*	0,63
40	Deltametrina	I, ME, MV	Piretróide	505	99,5	0,0002	*	4,60
41	Demeton-S-metil-sulfona	I, A, ME	Organofosforado	263	97,0	-	-	-0,47
42	Diazinona	I, A, R, MV	Organofosforado	304	99,0	60	2,60	3,69
43	Diclofluanida	F	Sulfamida	333	99,0	1,3	-	3,70
44	Diclorvós	I, A, ME	Organofosforado	221	99,0	18000	*	1,90
45	Diclosulam	H	Sulfonilamida	406	98,5	6,32	4,00	0,85
46	Dicrotofós	I e A	Organofosforado	237	97,5	1000000	-	-0,50
47	Dimetoate	I, A e ME	Organofosforado	229	98,5	25900	-	0,75
48	Dimoxistrobina	F	Estrobilurina	326	99,0	4,3	*	3,59
49	Diniconazole	F	Triazol	326	99,0	4	-	4,30

nº	Compostos	Classe Agronômica	Grupo químico	Massa molecular	Pureza(%)	Solubilidade em H ₂ O á 20° C (mg/L)	pKa	log Kow
50	Disulfoton-Sulfona	I, A e F	Organofosforado	306	97,0	25	-	1,87
51	Diurum	H	Fenilamida	233	98,8	35,6	*	2,87
52	Epoxiconazole	F	Triazol	330	99,0	7,1	*	3,30
53	Espinetoram	I	Espinosinas	754	97,9	29	7,70	4,20
54	Espinosade A	I	Espinosinas	732	94,0	89,4	8,00	4,10
55	Espinosade D	I	Espinosinas	746	94,8	0,495	8,00	4,10
56	Etiofencarbe	I	Carbamato	225	99,0	1900	-	2,04
57	Etiofencarbe sulfona	I e ME	Metil-carbamato	257	98,0	-	-	0,17
58	Etiofencarbe sulfóxido	I e ME	Metil-carbamato	241	98,5	-	-	-
59	Etoprofós	I e N	Organofosforado	242	93,0	1300	*	2,99
60	Etóxissulfurom	H	Sulfoniluréia	398	99,0	5000	5,28	1,01
61	Famoxadon	F	Oxazol	374	99,5	0,059	*	4,65
62	Fembuconazol	F	Triazol	337	99,2	2,47	*	3,79
63	Fempropatrina	I e A	Piretróide	349	99,0	0,33	-	6,04
64	Fempropimorfe	F	Morfolina	303	95,0	4,32	6,98	4,50
65	Fenamidona	F	Imidazol	311	99,6	7,8	*	2,80
66	Fenarimol	F	Pirimidina	331	99,0	13,7	-	3,69
67	Fenhexamida	F	Hidroxianilida	302	99,9	24	7,30	3,51
68	Fenitrotiona	I	Organofosforado	277	98,7	19	*	3,32
69	Fenoxicarbe	I	Carbamato	301	99,5	7,9	*	4,07
70	Fluroxipir	H	Composto de piridina	255	99,0	6500	2,94	0,04
71	Flusilazol	F	Triazol	315	99,5	41,9	2,50	3,87
72	Flutolanil	F	Oxatina	323	99,5	8,01	*	3,17
73	Flutriafol	F	Triazol	301	99,5	95	2,30	2,30

nº	Compostos	Classe Agronômica	Grupo químico	Massa molecular	Pureza(%)	Solubilidade em H2O á 20° C (mg/L)	pKa	log Kow
74	Forato	I, A e N	Organofosforado	260	99,0	50	-	3,86
75	Fosalona	I e A	Organofosforado	368	99,2	1,4	-	4,01
76	Fosmete	I, A e MV	Organofosforado	317	98,5	15,2	*	2,80
77	Furatiocarbe	I	Carbamato	382	99,0	11	-	4,60
78	Hexitiazóxi	A	Carboxamida	353	98,6	0,1	*	2,67
79	Imazalil	F e MV	Imidazol	297	99,0	184	6,49	2,56
80	Imazamóxi	H	Imidazolinona	305	98,5	626000	2,30	5,36
81	Imazapique	H	Imidazolinona	275	98,5	2230	2,00	2,47
82	Imazapir	H	Imidazolinona	261	99,5	9740	1,90	0,11
83	Imazaquin	H e RC	Imidazolinona	311	98,5	102000	3,45	-1,09
84	Imazetapir	H	Imidazolinona	289	99,0	1400	2,10	1,49
85	Imibenconazole	F	Triazol	412	99,0	1,7	-	4,94
86	Imidacloprido	I e MV	Neonicotinóide	256	99,8	610	*	0,57
87	Indoxacarbe	I	Oxadiazina	528	97,8	0,2	*	4,65
88	Iprodiona	F	Dicarboximida	330	99,8	6,8	*	3,00
89	Iprovalicarbe	F	Carbamato	320	98,0	17,8	*	3,20
90	Linuron	H	Uréia	249	98,6	63,8	*	3,00
91	Malationa	I, A e MV	Organofosforado	330	99,0	148	*	2,75
92	Mecarbam	I e A	Organofosforado	329	98,0	1000	*	2,29
93	Mefosfolan	I e A	Organofosforado	269	99,0	57	-	1,04
94	Mepanipirim	F	Anilinoimidina	223	99,4	2,08	2,70	3,28
95	Metalaxil	F	Fenilamida	279	99,0	8400	0,00	1,75
96	Metamidofós	I, A e ME	Organofosforado	141	98,5	200000	-	-0,79
97	Metconazol	F	Triazol	320	99,5	30,4	11,38	3,85

nº	Compostos	Classe Agronômica	Grupo químico	Massa molecular	Pureza(%)	Solubilidade em H ₂ O á 20° C (mg/L)	pKa	log Kow
98	Metidationa	I e A	Organofosforado	302	98,3	240	-	2,57
99	Metiocarbe	I, MO e R	Carbamato	225	99,0	27	*	3,18
100	Metiocarbe sulfona	I e ME	Metil-carbamato	257	98,5	-	-	1,51
101	Metiocarbe sulfóxido	I e ME	Metil-carbamato	241	95,0	-	-	0,70
102	Metolacloro	H	Cloroacetamida	284	99,0	530	*	3,40
103	Metomil	I, A e ME	Carbamato	162	99,5	55000	*	0,09
104	Metóxifenoazida	I	Diacilhidrazina	368	98,0	3,3	12,20	3,72
105	Metribuzim	H	Triazinona	214	99,5	10700	1,30	1,75
106	Metsulfurom metílico	H	Sulfoniluréia	381	99,5	2790	3,75	-1,87
107	Mevinfós	I e A	Organofosforado	224	97,0	600000	-	0,13
108	Miclobutanil	F	Triazol	289	99,0	132	2,30	2,89
109	Monocrotofós	I e A	Organofosforado	223	98,5	818000	-	-0,22
110	Monolinuron	H	Uréia	215	99,0	735	*	2,20
111	Nicossulfuron	H	Sulfoniluréia	410	97,0	7500	4,78	0,61
112	Nuarimol	F	Pirimidina	315	99,0	26	-	3,18
113	Ometoato	I, A e ME	Organofosforado	213	98,0	500000	-	-0,90
114	Oxadixil	F	Fenilamida	278	97,7	3400	-	0,65
115	Oxamil	I, A e N	Carbamato	219	99,0	148100	-2,11	-0,44
116	Paraoxona etílico	I	Organofosforado	275	99,0	3,64	7,10	4,50
117	Parationa metílica	I	Organofosforado	263	98,3	55	-	3,00
118	Pencicurom	F	Feniluréia	329	99,5	0,3	*	4,68
119	Penconazol	F	Triazol	284	99,0	73	1,51	3,72
120	Pendimetalina	H	Dinitroanilina	281	98,5	0,33	2,80	5,40
121	Penoxsulam	H	Triazopirimidina	483	99,0	408	5,10	-0,60

nº	Compostos	Classe Agronômica	Grupo químico	Massa molecular	Pureza(%)	Solubilidade em H ₂ O á 20° C (mg/L)	pKa	log Kow
122	Piraclostrobina	F	Estrobilurina	388	99,5	1,9	*	3,99
123	Pirazofós	F	Fosforotioato	373	98,5	4,2	-	3,80
124	Pirazossulfurom etílico	H	Sulfoniluréia	414	98,5	14,5	3,70	3,16
125	Piridafentiona	I	Organofosforado	340	99,2	100	-	3,20
126	Pirifenóxi	F	Piridina	295	96,5	300	4,61	3,40
127	Pirimetanil	F	Anilinopirimidina	199	98,3	110	3,52	2,84
128	Pirimicarbe	I	Carbamato	238	99,6	3100	4,40	1,70
129	Pirimifós etílico	I e A	Organofosforado	305	98,5	93	-	4,85
130	Pirimifós metílico	I e A	Organofosforado	305	99,0	11	4,30	4,20
131	Piriproxifeno	I e MV	Piridina	321	99,0	0,37	6,87	5,37
132	Prometrina	H	Triazina	241	99,0	33	4,10	3,34
133	Propanil	H	Anilida	218	99,0	95	19,10	2,29
134	Propiconazole	F	Triazol	342	99,0	150	1,09	3,72
135	Propoxur	I, A e MV	Carbamato	209	99,9	1800	-	0,14
136	Protioconazol	F	Triazolintiona	344	98,5	22,5	6,90	2,00
137	Protiofós	I	Organofosforado	345	95,5	0,07	-	5,67
138	Quinalfós	I e A	Organofosforado	298	99,0	17,8	-	4,44
139	Quincloraque	H	Ácido quinolinocarboxílico	242	98,1	0,065	4,34	-1,15
140	Quinoxifeno	F	Quinolina	308	99,0	0,047	*	5,10
141	Rotenona	I, A e MV	Benzopirano	394	99,0	15	-	4,16
142	Saflufenacil	H	Uracila	501	97,8	2100	4,41	2,60
143	Simazina	H	Triazina	202	98,0	5	1,62	2,30
144	Sulfometurom metílico	H	Sulfonilureia	364	98,2	244	5,20	-0,51
145	Tebuconazol	F e RC	Triazol	308	98,5	36	5,00	3,70

nº	Compostos	Classe Agronômica	Grupo químico	Massa molecular	Pureza(%)	Solubilidade em H2O á 20° C (mg/L)	pKa	log Kow
146	Tebufempirade	A	Pirazolium	334	100,0	2,39	*	4,93
147	Tebufenozida	I	Diacilhidrazina	352	99,6	0,83	*	4,25
148	Terbufós	I e N	Organofosforado	288	99,0	4,5	-	4,51
149	Terbutilazina	H, MI e AG	Triazina	230	99,5	6,6	1,90	3,40
150	Tetradifona	A e I	Clorodifenilsulfona	356	99,4	0,078	-	4,61
151	Tiabendazol	F e MV	Benzimidazol	201	98,9	30	4,73	2,39
152	Tiacloprido	I e MO	Neonicotinóide	253	98,0	184	*	1,26
153	Tiametoxam	I	Neonicotinóide	292	98,0	4100	*	-0,13
154	Tiobencarbe	H	Tiocarbamato	258	98,2	16,7	*	4,23
155	Tiofanato metílico	F	Benzimidazol	342	98,9	18,5	7,28	1,40
156	Tolclofós metílico	F	Clorofenil	301	99,0	0,708	*	3,80
157	Tolifluanida	F	Sulfamida	347	98,0	0,9	*	3,90
158	Triadimefon	F e ME	Triazol	294	99,0	70	-	3,18
159	Triadimenol	F e ME	Triazol	296	98,5	72	*	3,18
160	Triazofós	I, A e N	Organofosforado	313	98,0	35	-	3,55
161	Triciclazol	F	Triazolobenzotiazol	189	97,0	596	*	1,40
162	Triclorfon	I e MV	Organofosforado	257	97,0	120000	*	0,43
163	Trifenilfosfato (PI)	I	Organofosforado	326	99,9	1,9 (25° C)	-	4,59
164	Trifloxissulfurom	H	Sulfonilureia	437	96,0	-	-	2,41
165	Trifloxistrobina	F	Estrobilurina	408	99,8	0,61	*	4,50
166	Triflumizol	F	Imidazol	346	98,5	10,5	3,70	4,77
167	Triflumuron	I e MV	Benzolureia	359	99,0	0,04	-	4,90
168	Trimetoprim	B	Trimetoxibenzil-pirimidina	290	98,7	400 (25° C)	7,12	0,91
169	Vamidationa	I e A	Organofosforado	287	99,0	4000	-	-4,21
170	Zoxamida	F	Benzamida	337	98,5	0,681	*	3,76

Leia-se: A como acaricida, H como herbicida, I como inseticida, N como nematicida, F como fungicida, M como miticida, FO como formicida, RC como regulador de crescimento, ME como metabólito, MV como medicamento veterinário, FU como fumegante, R como repelente, MO como moluscicida, MI como microbiocida e AG como algicida. bpKa – logaritmo negativo da constante de acidez do composto (Ka); clog Kow – coeficiente de partição octanol/água; PI: Padrão Interno; PC: Padrão de Controle. Fontes: UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE, [s.d.]; NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, [s.d.].

3.5 CONDIÇÕES DO SISTEMA LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM SUCO DE UVA INTEGRAL

3.5.1 Escolha da fase móvel

A escolha da fase móvel é essencial em sistemas LC-MS/MS pois esta influencia significativamente no sinal analítico e na separação adequada dos analitos. Considerando os compostos selecionados para este estudo, foram empregadas, como fase móvel, as seguintes soluções: A) água e B) metanol ambas com ácido fórmico 0,1% (v/v) e formiato de amônio 5 mmol L⁻¹. O tempo total da análise cromatográfica foi de 17 minutos e o gradiente empregado está descrito na Tabela 10.

Tabela 10 – Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de agrotóxicos em suco de uva no sistema LC-MS/MS.

Tempo (min)	%A	%B
0,50	98	2
2,00	50	50
3,50	30	70
13,00	0	100
15,00	0	100
15,01	98	2
17,00	98	2

Vazão constante de 0,300 mL min⁻¹

3.5.2 Condições utilizadas no sistema LC-MS/MS para determinação multirresíduo de agrotóxicos

Os parâmetros utilizados no sistema LC-MS/MS foram selecionados a partir de avaliação de solução padrão 0,1 mg L⁻¹ (acetonitrila) de cada agrotóxico estudado. Além disso, baseou-se em estudos prévios (KEMMERICH et al., 2014) e nos dados da biblioteca do software MassHunter Workstation 10.0. Por ser uma análise multirresíduo, onde estão presentes substâncias com diferentes classes químicas, é

necessário definir uma condição instrumental, baseada na resposta em área, que seja favorável à maioria desses analitos.

Neste trabalho utilizou-se a coluna cromatográfica Poroshell 120 EC C18 da Agilent, com dimensões de 2,1 x 100 mm e 1,9 μm . As demais condições foram otimizadas e baseadas em estudos prévios:

- ✓ Temperatura da coluna: 40 °C;
- ✓ Voltagem do capilar: 4000 V (modo positivo) e 3000 V (modo negativo);
- ✓ Temperatura de dessolvatação: 140 °C;
- ✓ Vazão do gás de dessolvatação (N_2): 5 L min^{-1} ;
- ✓ Pressão do gás nebulizador: 30 psi;
- ✓ Temperatura da fonte: 140 °C;
- ✓ Volume de injeção: 3,00 μL ;
- ✓ Modo de aquisição: dinâmico;
- ✓ Tempo de ciclo: 625 ms;
- ✓ Tempo mínimo de ciclo: 323,10 ms;
- ✓ Tempo de residência (Dwell time) mínimo: 3,82 ms;
- ✓ Tempo de residência (Dwell time) máximo: 310,48 ms;

A maioria dos agrotóxicos avaliados apresentou os melhores resultados em relação a intensidade do sinal analítico quando empregou-se ionização por eletronebulização no modo positivo, exceto para o herbicida 2,4-D. Foram avaliadas e otimizadas as condições como voltagem do capilar (V) e energias de colisão (eV) para fragmentar o íon precursor e gerar os íons produto. Após, avaliou-se as transições, no modo SRM utilizadas nas etapas de quantificação (transição de maior intensidade) e identificação (transição de segunda maior intensidade) dos analitos.

3.6 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM SUCO DE UVA INTEGRAL

Os métodos de preparo de amostra para determinação de agrotóxicos em suco de uva propostos neste trabalho foram desenvolvidos considerando trabalhos da literatura para determinação multirresíduo de agrotóxicos em suco de uva, uva e sucos de frutas. Foram realizados testes utilizando as três versões do método QuEChERS: original (ANASTASSIADES, *et al.*, 2003); original acidificado (VIERA, *et al.*, 2017);

acetato (LEHOTAY; MASTOVSKA; LIGHTFIELD; 2005) e citrato (ANASTASSIADES, *et al.*, 2007). Além disso, para cada método QuEChERS avaliado foram realizados testes com e sem a realização da etapa de limpeza. Estes testes foram baseados nos trabalhos desenvolvidos por Miele e colaboradores (2015) e Romero-González e colaboradores (2008). A Tabela 11 apresenta um resumo de cada procedimento avaliado.

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

Os extratos obtidos após a realização de cada um dos métodos de extração T1 a T6 descritos na Tabela 11, foram submetidos a testes gravimétricos para verificar a quantidade de coextrativos provenientes de cada método de extração (SAPOZHNIKOVA; LEHOTAY, 2013). Esses testes foram realizados em triplicata utilizando a amostra “branco” de suco de uva. Inicialmente, 6 tubos de vidro foram lavados e secos em estufa à 105 °C por 1 hora. Após, estes foram colocados em dessecador até atingirem a temperatura ambiente (± 25 °C), cada tubo foi pesado 6 vezes e as massas foram anotadas. Após, transferiram-se 5 mL dos extratos obtidos nos testes T1, T2, T3, T4, T5 e T6 para cada tubo, respectivamente. Os tubos foram colocados em estufa e o solvente foi evaporado, aumentando a temperatura gradativamente (para que não ocorresse projeções) de 60 até 110 °C, até secar completamente. Na sequência, o tubo foi colocado no dessecador até atingir a temperatura ambiente e foi novamente pesado 6 vezes para obter-se a massa de coextrativos restantes.

Tabela 11 – Diferentes versões do método QuEChERS (original, citrato, acetato e original acidificada) avaliadas neste trabalho.

Etapas	Testes Realizados							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Método	QuEChERS original	QuEChERS original	QuEChERS citrato	QuEChERS citrato	QuEChERS acetato	QuEChERS acetato	QuEChERS Original (H ⁺)	QuEChERS Original (H ⁺)
Extração	10 mL suco + 10 mL ACN	10 mL suco + 10 mL ACN	10 mL suco + 10 mL ACN	10 mL suco + 10 mL ACN	10 mL suco + 10 mL ACN 1% ác. acético	10 mL suco + 10 mL ACN 1% ác. acético	10 mL suco + 10 mL ACN + 5% ác. fórmico	10 mL suco + 10 mL ACN + 5% ác. fórmico
Partição	4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl + 1 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O + 0,5 g C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ ·1,5H ₂ O	4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl + 1 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O + 0,5 g C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ ·1,5H ₂ O	6 g MgSO ₄ + 1,5 g CH ₃ COONa	6 g MgSO ₄ + 1,5 g CH ₃ COONa	4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl
Limpeza	4 mL sobrenadante + 600 mg MgSO ₄ + 100 mg PSA	-	4 mL sobrenadante + 600 mg MgSO ₄ + 100 mg PSA	-	4 mL sobrenadante + 600 mg MgSO ₄ + 100 mg PSA	-	4 mL sobrenadante + 600 mg MgSO ₄ + 100 mg PSA	4 mL sobrenadante + 600 mg MgSO ₄

3.6.2 Avaliação da eficiência de extração de cada uma das versões do método QuEChERS avaliada

Os testes (T1, T3, T5, T7 e T8) descritos na Tabela 11 foram avaliados em relação as melhores condições de extração para os agrotóxicos em estudo. Realizaram-se ensaios de fortificação (n=6) em “amostra branco” de suco de uva integral, na concentração de 25 µg L⁻¹. Após a adição da solução padrão contendo todos analitos, aguardou-se um tempo de contato de 30 minutos para a realização dos experimentos. Os testes de extração foram avaliados em relação ao número de compostos que apresentaram resultados aceitáveis (recuperação 70-120% e RSD≤20%). Após a realização da etapa de limpeza, transferiu-se 200 µL de extrato e diluiu-se com 800 µL de água ultrapura. Antes da injeção no equipamento, a solução diluída foi filtrada empregando filtro de nylon de 13 mm e porosidade de 0,2 µm.

Para as versões do método QuEChERS que apresentaram maior número de compostos recuperados calculou-se o efeito matriz através da Equação 1.

Equação 1 – Efeito matriz calculado a partir das áreas das fortificações.

$$EM (\%) = \frac{(Am - As)}{Am} \times 100$$

Onde: Am = área da solução analítica preparada extrato da matriz (suco de uva) ; As = área da solução analítica preparada no solvente (acetoneitrila).

3.6.3 Avaliação de diferentes sorventes nas etapas de limpeza por d-SPE e quando realizada antes do procedimento de extração

Após a definição do melhor procedimento de extração, avaliou-se a utilização de diferentes sorventes (C18, PSA, polivinilpirrolidona (PVP) e Celite®) na etapa de limpeza por d-SPE. Os testes foram realizados em sextuplicata e estão detalhados na Tabela 12. As fortificações, em “amostra branco” de suco de uva integral, foram realizadas no nível 25 µg L⁻¹ e seguiram os procedimentos descritos no item 3.6.2.

Tabela 12 - Diferentes sorventes (C18, PSA, polivinilpirrolidona (PVP) e Celite®) avaliados na etapa de limpeza por d-SPE.

Etapa de limpeza
1 mL de extrato + 150 mg de MgSO ₄ + 25 mg de PSA
1 mL de extrato + 150 mg de MgSO ₄ + 125 mg de C18
1 mL de extrato + 150 mg de MgSO ₄ + 25 mg de PSA + 125 mg de C18
1 mL de extrato + 100 mg de PVP
1 mL de extrato + 100 mg de Celite

Além dos testes descritos na Tabela 12, avaliou-se a adição de diferentes quantidades (0,5; 1,0 e 1,5 g) do sorvente Celite® em etapa anterior ao procedimento de extração. Este ensaio foi baseado nos estudos desenvolvidos por Chu e colaboradores (2005), e tem por objetivo a remoção de pigmentos e ácidos orgânicos. Assim, 10 mL de “amostra branco” de suco de uva integral foram fortificadas no nível de 25 µg L⁻¹ de acordo com o descrito no item 3.6.2. Decorrido o tempo de contato da solução padrão, adicionou-se a quantidade do sorvente avaliado e agitou-se o tubo manualmente por 1 minuto. Após, efetuou-se o procedimento de extração conforme o método melhor avaliado no item 3.6.2. Salienta-se que a etapa de limpeza por d-SPE não deve ser realizada.

3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM SUCO DE UVA INTEGRAL POR LC-MS/MS

O método melhor avaliado neste estudo foi validado conforme os parâmetros e critérios descritos na Tabela 13, entre eles: seletividade, curva analítica, faixa linear, efeito matriz, limites de detecção e quantificação, exatidão através de ensaios de recuperação, precisão (repetibilidade) e precisão intermediária. Ainda, como critério da análise por LC-MS/MS, foram selecionados 2 íons produto por analito, com sinal/ruído (S/N) ≤ 3 e variação do ion ratio ≤ 30% (SANTE, 2019).

Considerando que, segundo a SANTE (2019) a estabilidade dos analitos nos extratos deve ser avaliada durante a validação do método, após a determinação dos

parâmetros de validação, avaliou-se durante seis dias consecutivos o comportamento dos agrotóxicos presentes em uma solução padrão ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) preparada no extrato da matriz. Esta avaliação tem por objetivo verificar a estabilidade da solução padrão (na presença do extrato da matriz) durante etapa de armazenamento. No primeiro teste, denominado hora 0, realizou-se extração da “amostra branco” de suco de uva integral seguindo o método melhor avaliado no item 3.6.3. Após, realizou uma etapa de fortificação deste extrato ($n=3$) na concentração de $25 \mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados foram relacionados com curva analítica ($0,5 - 50 \mu\text{g L}^{-1}$) preparada no extrato branco da matriz. Após esta avaliação, armazenou-se a solução do extrato branco fortificado em freezer (temperatura $\leq -10 \text{ }^\circ\text{C}$). Esta solução foi avaliada, a cada 48 horas, em função do número de compostos com resultados adequados (recuperação 60-140%, RSD $\leq 40\%$) (SANTE, 2019). A cada avaliação do extrato branco fortificado na hora 0, eram avaliadas uma nova amostra branco fortificada, assim como uma nova curva analítica, com a finalidade de acompanharmos flutuações na resposta do sistema LC-MS/MS. Quando compara-se uma solução padrão preparada, no extrato da matriz, a um certo tempo e armazenada em local apropriado (freezer ou geladeira), com uma nova solução padrão e ocorre diferença no número de compostos recuperados entre essas soluções, isso indica que provavelmente esteja ocorrendo a degradação de alguns analitos (causada principalmente pela precipitação dos compostos e/ou evaporação do solvente)(SANTE, 2019).

Tabela 13 – Parâmetros avaliados na etapa de validação do método, com respectivas formas de aplicação, equações (quando aplicável) e critérios de aceitação.

(continua)

Parâmetro	Aplicação	Equações	Critério	Referência
Seletividade	Comparação dos cromatogramas obtidos para extratos de amostras “branco” e da amostra “branco” fortificada com estes compostos.	-	Ausência de picos de interferentes nos tempos de retenção dos analitos de interesse.	SANTE, 2019
Faixa linear	Injeção em triplicata das soluções analíticas preparadas de acordo com o item 3.6.3. Avaliação do coeficiente de determinação (r^2).	Equação 2: $y = ax + b$ Onde: y = resposta medida (área do pico); x = concentração; a = coeficiente angular - inclinação da curva analítica = sensibilidade; b = coeficiente linear - interseção com o eixo y, quando x = 0.	$r^2 \geq 0,99$	INMETRO, 2018
Efeito Matriz	Comparação entre as inclinações das curvas analíticas dos padrões no solvente (acetonitrila) e aquelas obtidas com soluções analíticas preparadas no extrato da matriz.	Equação 3: $EM(\%) = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100$ Onde: X1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em extrato da matriz. X2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em solvente.	$EM \geq 20\%$	SANTE, 2019
Limite de quantificação	Menor concentração que, fortificada na matriz (n=6), apresente resultados aceitáveis de exatidão e precisão.	-	Recuperações 70 - 120% e RSD \leq 20%.	INMETRO, 2018; SANTE, 2019
Limite de detecção	Calculado a partir do limite de quantificação.	Equação 4: $LOD = LOQ / 3,33$ Onde: LOQ = limite de quantificação	-	INMETRO, 2018
Exatidão	Ensaio de recuperação, fortificando as amostras “branco” em 4 níveis de concentração (5, 10, 20 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) (n=6). Avaliada em termos de recuperação (%).	Equação 5: $REC(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$ Onde: C1= Concentração determinada na amostra fortificada; C2= Concentração determinada na amostra não fortificada; C3 = Concentração usada para fortificação.	70 – 120%	INMETRO, 2018; SANTE, 2019

Precisão	Ensaio de recuperação, fortificando as amostras “branco” em 4 níveis de concentração (5, 10, 20 e 50 µg L ⁻¹) (n=6). Avaliada em termos de RSD.	<p>Equação 6: $RSD (\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100$</p> <p>Onde: s = estimativa de desvio padrão absoluto = $\{\sum(x_i - \bar{x})^2/n-1\}^{1/2}$; x_i = valores individuais; \bar{x} = média das medidas em replicatas; n = número de medidas.</p>	RSD ≤ 20%	INMETRO, 2018; SANTE, 2019
Estabilidade	Comparação do número de compostos recuperados quando uma solução padrão, preparada na matriz e armazenada em freezer, é injetada em diferentes dias	-	± 10%	SANTE, 2019
<i>Ion ratio</i>	Calculado pela razão das áreas do íon de identificação pelo íon de quantificação em cada injeção	<p>Equação 7: $Ion\ ratio = \frac{A1}{A2} \times 100$</p> <p>Onde: A1 = área do íon de identificação; A2 = área do íon de quantificação.</p>	± 30%	SANTE, 2019

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA LC-MS/MS EMPREGADO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM SUCO DE UVA

Os parâmetros utilizados no sistema LC-MS/MS para a determinação de todos os 168 agrotóxicos, PC e PI estão apresentados na Tabela 14. Estas condições (tempo de retenção (t_R), transições (íon precursor \rightarrow íon produto) utilizadas nas etapas de quantificação e identificação de cada analito em estudo, etc) foram obtidas conforme descrito no item 3.5.2.

Tabela 14 – Compostos determinados neste trabalho com seus respectivos tempos de retenção, íon precursor e íons produtos utilizados na quantificação e identificação.

(continua)

n°	Compostos	tr (min)	Íon precursor (m/z)	Fragmentor (V)	1º Transição Quantificação		2ª transição Identificação	
					Íon produto (m/z)	EC (eV)	Íon produto (m/z)	EC (eV)
1	2,4-D	4,6	219,0	90	161,0	15	124,9	35
2	3-OH-carbofurano	3,4	238,1	124	181,1	10	163,1	16
3	Abamectina	10,8	890,5	155	567,4	0	305,1	8
4	Acefato	2,4	184,0	70	143,0	0	125,0	5
5	Acetamiprido	3,4	223,1	80	126,0	27	90,0	45
6	Alacloro	5,9	270,1	120	238,1	10	162,1	20
7	Aldicarbe	3,2	208,1	70	116,2	0	89,1	12
8	Ametrina	4,8	228,1	130	186,1	16	91,1	24
9	Atrazina	4,6	216,1	124	174,1	20	68,1	50
10	Atrazina-d5 (PC)	4,6	221,0	120	179,0	15	101,0	15
11	Azaconazol	4,8	300,0	130	231,1	16	159,0	28
12	Azametifós	4,0	325,0	120	183,0	10	112,0	40
13	Azinfós etílico	7,4	346,1	92	278,0	8	73,1	16
14	Azinfós metílico	4,9	318,0	60	261,0	0	125,0	15
15	Benalaxil	6,5	326,2	90	148,1	27	91,1	48
16	Benomil	4,0	291,2	145	192,0	20	160,0	30
17	Bentazona	3,1	241,1	92	224,0	4	127,0	20
18	Bifentrina	11,4	442,0	100	181,0	16	166,0	20
19	Bitertanol	6,8	338,2	70	99,1	10	70,0	4
20	Buprofezina	8,0	306,2	105	201,1	5	116,1	10
21	Butóxido de piperonila	8,3	356,2	80	177,1	4	119,1	40
22	Carbaril	4,3	202,1	65	145,1	4	127,1	28

(continuação)

n°	Compostos	tr (min)	Íon precursor (m/z)	Fragmentor (V)	1º Transição Quantificação		2ª transição Identificação	
					Íon produto (m/z)	EC (eV)	Íon produto (m/z)	EC (eV)
23	Carbendazim	3,1	192,1	110	160,0	21	132,1	37
24	Carbofurano	4,2	222,1	92	165,1	12	123,1	24
25	Carboxina	4,3	236,1	92	143,0	16	93,1	40
26	Cialofope Butílico	5,8	375,2	76	358,2	4	108,0	36
27	Cianazina	3,1	241,1	60	224,0	4	127,0	2
28	Cimoxanil	5,9	199,1	50	128,0	4	110,9	12
29	Ciproconazol	5,6	292,1	100	125,0	32	70,0	16
30	Ciprodinil	4,4	226,1	76	76,9	50	65,1	50
31	Cletodim	7,6	360,1	110	166,1	33	164,1	21
32	Clofentezina	6,9	303,0	110	138,0	12	102,0	40
33	Clorantranilipole	4,8	483,9	105	452,9	16	285,9	8
34	Clorimurum etílico	5,3	415,0	110	186,0	16	83,0	48
35	Clortalonil	5,7	295,9	148	94,1	24	93,1	36
36	Clorpirifós metílico	5,6	321,9	92	120,1	32	119,1	24
37	Clotianidina	3,3	250,0	95	169,0	8	131,9	8
38	Cresoxim metílico	6,2	314,1	85	267,0	0	222,1	10
39	Dazomete	6,7	163,0	184	120,0	16	77,0	40
40	Deltametrina	9,9	523,0	70	506,0	2	281,0	15
41	Demeton-S-metil-sulfona	3,0	76,0	263	169,0	16	121,0	16
42	Diazinona	6,5	305,1	124	169,1	24	97,0	36
43	Diclofluanida	5,6	332,9	85	223,9	4	123,1	24
44	Diclorvós	4,6	221,0	100	127,0	25	109,0	12
45	Diclosulam	4,4	406,0	112	378,0	15	161,0	20
46	Dicrotofós	3,1	238,1	75	112,1	8	72,1	28
47	Dimetoate	3,4	230,0	70	198,8	0	125,0	16
48	Dimoxistrobina	6,2	327,2	115	205,1	12	116,0	20
49	Diniconazole	7,0	326,1	110	159,0	28	70,0	28
50	Disulfoton-Sulfona	12,5	307,0	100	125,0	10	97,0	30
51	Diurum	4,8	235,0	110	233,0	20	72,0	20
52	Epoxiconazole	5,7	330,1	92	227,0	4	97,0	50
53	Espinetoram	7,4	748,5	184	142,1	32	98,1	50
54	Espinosade A	6,7	732,5	184	142,1	32	98,1	50
55	Espinosade D	7,2	746,5	184	142,1	32	98,1	50
56	Etiofencarbe	4,4	226,1	70	107,0	12	77,0	48
57	Etiofencarbe sulfona	6,9	258,1	76	125,1	20	107,0	15
58	Etiofencarbe sulfóxido	3,2	242,1	80	185,0	5	107,0	10
59	Etoprofós	5,8	243,1	90	130,9	15	97,0	30
60	Etóxissulfurom	5,4	399,1	120	261,0	10	218,0	25

(continuação)

n°	Compostos	tr (min)	Íon precursor (m/z)	Fragmentor (V)	1º Transição Quantificação		2ª transição Identificação	
					Íon produto (m/z)	EC (eV)	Íon produto (m/z)	EC (eV)
61	Famoxadona	6,6	392,1	85	330,9	4	238,0	12
62	Fenamidona	5,2	312,0	100	92,2	28	65,1	56
63	Fenarimol	5,3	331,0	124	127,0	8	99,0	24
64	Fenbuconazol	5,9	337,1	145	125,1	145	70,0	33
65	Fenhexamida	5,7	302,1	130	97,1	20	55,1	40
66	Fenitrotiona	3,2	278,0	100	108,9	16	79,0	34
67	Fenoxicarbe	6,1	302,1	90	116,0	17	88,0	29
68	Fenpropatrina	5,4	350,2	76	125,1	12	97,2	50
69	Fenpropimorfe	5,0	304,3	188	147,1	32	57,2	36
70	Fluroxipir	3,4	255,0	92	220,1	8	163,1	16
71	Flusilazol	6,0	316,1	120	247,1	12	165,0	24
72	Flutolanil	5,3	324,1	124	262,1	16	242,0	28
73	Flutriafol	4,6	302,1	90	95,0	56	70,1	16
74	Forato	6,8	261,0	60	199,0	0	75,1	50
75	Fosalona	6,8	368,0	70	182,0	8	110,9	44
76	Fosmete	4,9	318,0	70	160,0	8	133,0	36
77	Furatiocarbe	7,9	383,2	110	195,0	16	167,0	24
78	Hexitiazóxi	8,6	353,1	90	227,9	8	168,1	24
79	Imazalil	4,5	297,1	124	159,0	24	69,1	20
80	Imazamóxi	6,8	306,2	148	108,0	36	67,1	50
81	Imazapique	3,6	276,1	120	231,0	20	163,2	20
82	Imazapir	3,3	262,1	120	217,1	20	69,1	40
83	Imazaquin	4,2	312,1	160	267,0	20	199,1	25
84	Imazetapir	3,9	290,2	120	245,1	20	177,1	25
85	Imibenconazole	8,3	411,0	120	171,0	20	125,0	40
86	Imidacloprido	3,5	254,0	124	127,1	20	126,0	24
87	Indoxacarbe	7,3	528,1	110	203,0	45	150,0	20
88	Iprodiona	6,5	361,1	112	155,1	8	99,0	32
89	Iprovalicarbe	5,6	321,2	92	203,1	4	119,1	24
90	Linuron	5,1	249,0	92	182,0	16	160,0	20
91	Malationa	5,3	331,1	124	127,0	12	99,0	28
92	Mecarbam	5,7	330,1	92	227,0	4	97,0	50
93	Mefosfolan	4,1	270,0	100	168,0	15	140,0	25
94	Mepanipirim	5,7	224,1	140	106,1	24	77,0	40
95	Metalaxil	4,7	280,2	124	220,1	12	192,1	20
96	Metamidofós	2,2	142,0	92	125,0	12	94,0	16
97	Metconazol	6,8	320,1	130	125,0	48	70,1	24
98	Metidationa	4,8	302,9	55	145,0	0	85,1	15
99	Metiocarbe	4,4	226,1	70	169,0	4	121,1	12

(continuação)

n°	Compostos	tr (min)	Íon precursor (m/z)	Fragmentor (V)	1º Transição Quantificação		2ª transição Identificação	
					Íon produto (m/z)	EC (eV)	Íon produto (m/z)	EC (eV)
100	Metiocarbe sulfona	5,1	258,1	92	206,9	24	161,0	50
101	Metiocarbe sulfóxido	3,3	242,1	127	153,0	36	145,1	32
102	Metolacloro	5,9	284,1	100	176,1	24	91,1	56
103	Metomil	3,0	163,1	50	106,0	4	88,0	0
104	Metóxifenoazida	5,3	369,2	85	313,1	0	149,0	10
105	Metribuzim	4,2	215,1	120	187,2	25	187,1	15
106	Metsulfurom metílico	4,1	382,1	90	199,0	20	167,0	12
107	Mevinfós	3,4	225,0	65	193,1	0	127,0	12
108	Miclobutanil	5,4	289,1	110	125,1	32	70,1	16
109	Monocrotófos	3,1	224,1	65	193,0	0	127,0	10
110	Monolinuron	4,4	215,1	100	126,0	16	99,0	36
111	Nicossulfuron	4,0	411,1	105	182,1	16	83,0	56
112	Nuarimol	5,1	315,1	120	252,1	10	81,1	40
113	Ometoato	2,6	214,0	80	125,0	16	109,0	24
114	Oxadixil	3,8	279,1	70	219,2	5	132,3	32
115	Oxadixil	2,8	237,1	60	90,0	0	72,0	12
116	Paraoxon etílico	4,6	276,1	124	220,0	16	94,1	44
117	Parationa metílica	3,0	264,0	148	109,0	28	79,0	28
118	Pencicuroom	7,0	329,1	120	125,1	24	89,1	60
119	Penconazol	6,3	284,1	70	159,0	15	70,1	15
120	Pendimetalina	4,7	282,2	85	212,2	10	194,1	17
121	Penoxsulam	4,3	484,1	135	195,1	40	164,1	40
122	Piraclostrobina	6,7	388,1	124	193,9	12	163,0	25
123	Pirazofós	6,8	374,1	188	222,1	24	194,1	36
124	Pirazossulfurom etílico	5,6	415,1	120	369,0	10	182,0	15
125	Piridafentiona	5,4	341,1	156	189,0	24	92,1	28
126	Pirifenóxi	5,7	295,0	100	93,0	20	66,1	60
127	Pirimetamil	5,0	200,1	120	106,9	20	82,0	25
128	Pirimicarbe	4,1	239,2	100	182,1	12	72,1	20
129	Pirimifós etílico	8,1	334,1	118	198,1	22	182,1	24
130	Pirimifós metílico	6,8	306,2	130	164,1	20	108,1	30
131	Piriproxifeno	8,4	322,2	110	185,0	20	96,0	12
132	Prometrina	5,4	242,1	120	200,1	20	158,0	28
133	Propanil	5,2	218,0	120	162,0	15	127,0	15
134	Propiconazole	6,5	342,1	115	159,0	32	69,1	16
135	Propoxur	4,1	210,1	55	168,1	0	111,1	8
136	Protioconazol	2,8	344,0	90	154,0	40	125,0	40
137	Protiofós	6,5	345,0	184	274,9	40	161,0	28

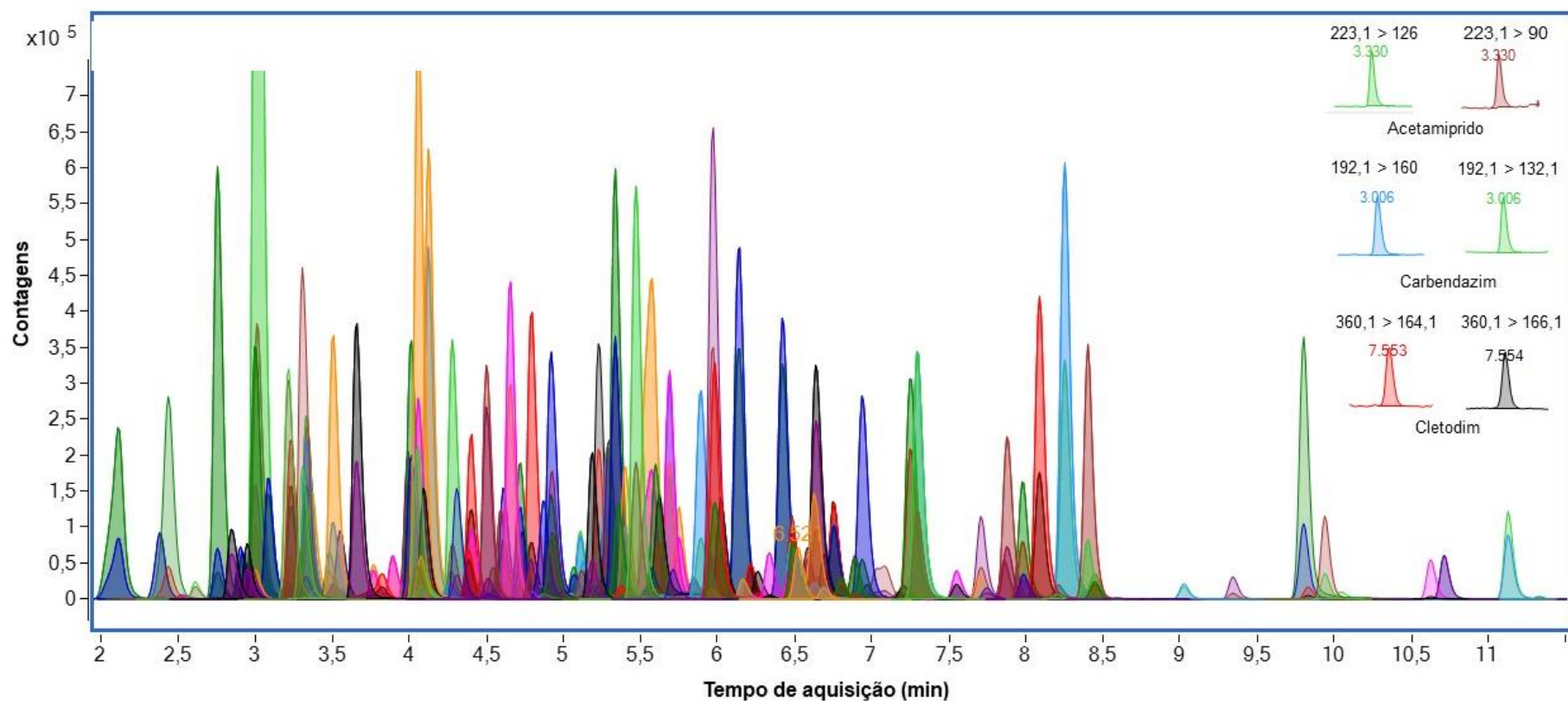
		(conclusão)						
n°	Compostos	tr (min)	Íon precursor (m/z)	Fragmentor (V)	1º Transição Quantificação		2ª transição Identificação	
					Íon produto (m/z)	EC (eV)	Íon produto (m/z)	EC (eV)
138	Quinalfós	6,2	299,0	90	163,0	20	147,0	20
139	Quincloraque	3,7	242,0	90	195,9	33	161,0	37
140	Quinoxifeno	8,5	308,0	188	197,0	40	162,0	50
141	Rotenona	6,0	395,0	145	213,1	20	192,1	20
142	Saflufenacil	5,0	501,0	100	349,0	30	198,0	49
143	Simazina	4,2	202,1	120	132,0	22	68,0	40
144	Sulfometurom metílico	10,0	365,0	80	150,0	18	107,0	43
145	Tebuconazol	6,4	308,1	100	124,9	47	70,0	40
146	Tebufempirade	8,0	334,2	145	145,0	37	117,0	47
147	Tebufenozida	6,0	353,2	95	297,1	0	133,0	16
148	Terbufós	5,7	289,1	110	233,0	2	97,0	40
149	Terbutilazina	5,2	230,1	70	174,1	15	68,0	40
150	Tetradifona	8,7	354,9	76	230,1	16	170,0	32
151	Tiabendazol	3,3	202,0	130	175,0	24	131,0	36
152	Tiacloprido	3,5	253,0	124	126,0	24	90,1	48
153	Tiametoxam	3,0	292,0	92	211,1	8	181,1	24
154	Tiobencarbe	6,9	258,2	80	125,1	17	100,1	12
155	Tiofanato metílico	4,1	343,0	90	151,0	20	93,0	56
156	Tolclofós metílico	6,9	301,1	120	174,9	20	125,0	20
157	Tolifluanida	6,3	346,9	70	238,1	0	137,0	25
158	Triadimefon	3,5	294,1	90	197,2	8	69,1	16
159	Triadimenol	5,6	296,1	70	99,1	8	70,0	8
160	Triazofós	5,5	314,1	124	162,1	20	119,1	44
161	Triciclazol	3,7	190,0	130	163,1	24	136,2	28
162	Triclorfon	3,5	256,9	80	221,0	4	109,0	12
163	Trifenilfosfato (PI)	6,6	327,0	160	215,0	30	152,1	35
164	Trifloxissulfurom	4,5	438,1	112	182,0	20	83,1	50
165	Trifloxistrobina	7,3	409,1	124	186,0	20	145,0	50
166	Triflumizol	7,3	346,1	92	278,0	8	73,1	16
167	Triflumuron	6,8	359,0	90	156,0	8	139,0	32
168	Trimetoprim	2,9	291,0	60	230,0	25	123,0	27
169	Vamidationa	3,4	288,0	95	118,0	20	58,0	44
170	Zoxamida	6,6	336,0	120	187,0	16	159,0	44

tr: tempo de retenção; EC: energia de colisão; PI: padrão interno; PC: padrão de controle.

A Figura 3 apresenta um cromatograma de íon totais (TIC) obtido para uma solução padrão (preparada em acetonitrila) na concentração de 20 µg L⁻¹, contendo todos os agrotóxicos avaliados neste estudo. Observa-se também as transições SRM

(para os agrotóxicos acetamiprido, carbendazim e cletodim) obtidas a partir de uma solução padrão (preparada no extrato da matriz) na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Devido ao grande número de analitos, utilizou-se tempos de permanência (dwell time) entre 3,82 e 310,48 ms, favorecendo a aquisição dos dados e, desta forma, apesar da sobreposição de vários analitos, a espectrometria de massas em série (MS/MS) possibilitou a avaliação dos 168 agrotóxicos em estudo em apenas 17 min de análise.

Figura 3 – Cromatograma de íons totais obtido por LC-MS/MS a partir de uma solução padrão 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (acetonitrila) e transições SRM (acetamiprido, carbendazim e cletodim), na concentração de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (extrato da matriz).

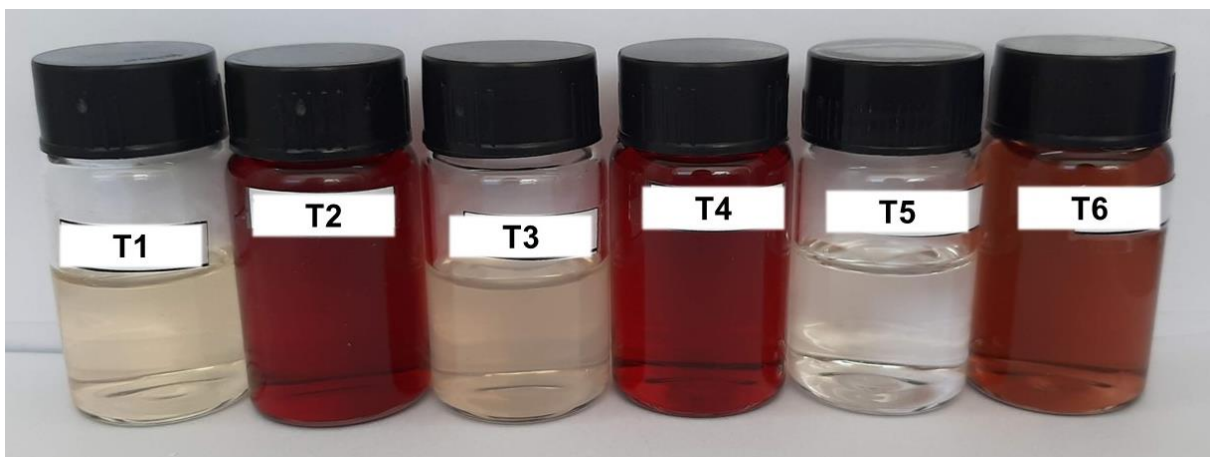


4.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM SUCO DE UVA INTEGRAL

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

A avaliação da quantidade de co-extrativos presentes no extrato final foi realizada nos métodos QuEChERS, original (T1), citrato (T3) e acetato (T5), após etapa de limpeza por d-SPE. Além disso, avaliou-se o impacto da ausência da etapa de limpeza (testes T2, T4 e T6) na quantidade de co-extrativos não-voláteis. Os procedimentos de extração foram realizados, em triplicata, na amostra “branco” de suco de uva integral. Na Figura 4 é possível visualizar a aparência dos extratos após a realização das etapas de extração com e sem etapa limpeza.

Figura 4 – Aparência do extrato final obtido após realização das etapas de extração empregando os métodos QuEChERS original, citrato e acetato, com e sem etapa de limpeza por d-SPE.

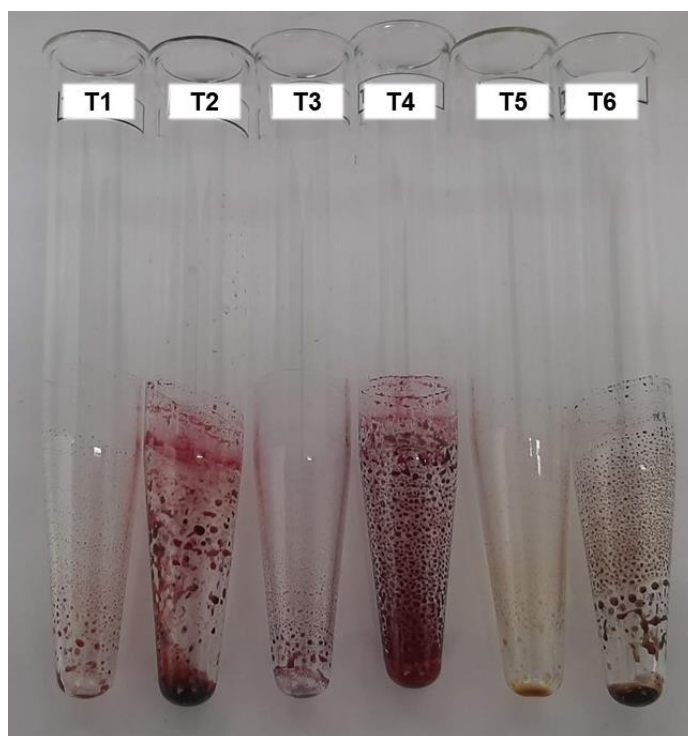


Fonte: Arquivo pessoal. T1=QuEChERS original c/ limpeza; T2= QuEChERS original s/ limpeza; T3= QuEChERS citrato c/ limpeza; T4= QuEChERS citrato s/ limpeza; T5= QuEChERS acetato c/ limpeza; T6= QuEChERS acetato s/ limpeza.

Através da Figura 4 é possível concluir, visualmente, que a realização da etapa de limpeza por d-SPE (testes T1, T3 e T5) promove uma diminuição significativa na presença de pigmentos nos extratos avaliados. A Figura 5 apresenta a aparência de cada um dos testes (T1 a T6), após a realização dos experimentos descritos no item 3.6.1. Estes resultados, corroboram com a avaliação efetuada a partir da Figura 4.

Observa-se que os extratos que possuem as maiores quantidades de co-extrativos são aqueles provenientes dos testes T2, T4 e T6, onde não foi realizada a etapa de limpeza por d-SPE. Esta avaliação teve a finalidade de verificar a quantidade (em mg) de coextrativos não voláteis remanescentes em cada extrato seco.

Figura 5 – Avaliação visual dos extratos obtidos, após a análise gravimétrica, pelas diferentes versões do método QuEChERS original, citrato e acetato com e sem etapa de limpeza por d-SPE.

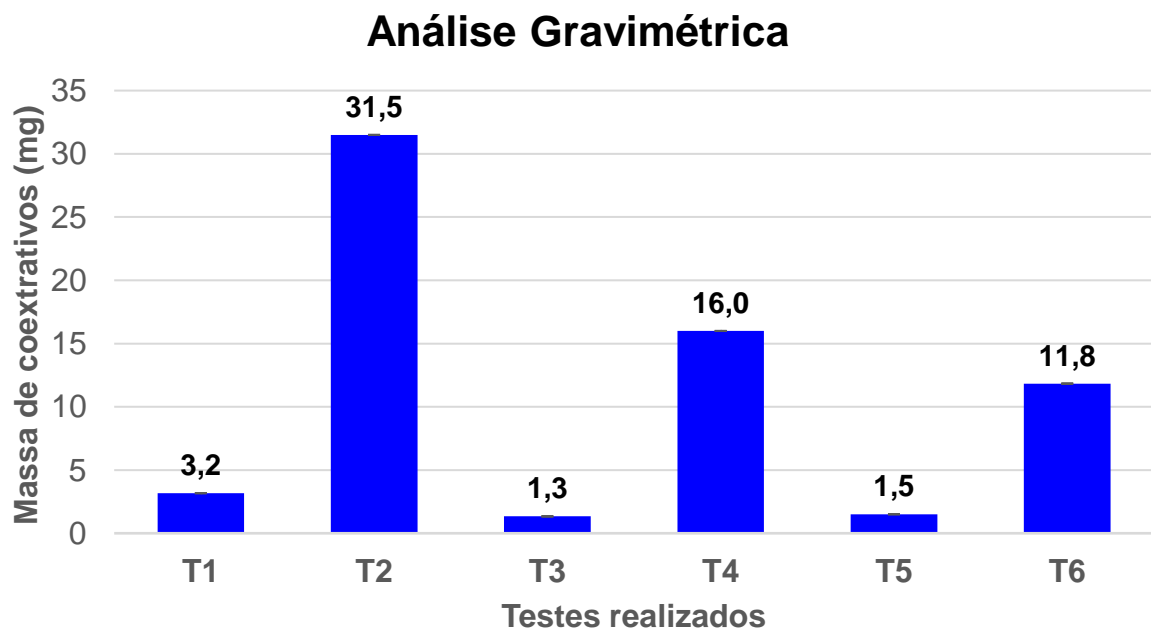


Fonte: Arquivo pessoal. T1=QuEChERS original c/ limpeza; T2= QuEChERS original s/ limpeza; T3= QuEChERS citrato c/ limpeza; T4= QuEChERS citrato s/ limpeza; T5= QuEChERS acetato c/ limpeza; T6= QuEChERS acetato s/ limpeza.

Conforme apresentado na Figura 6, as menores quantidades de co-extrativos não voláteis estão presentes nos extratos obtidos com as versões do método QuEChERS citrato (T3; 1,3 mg) < acetato (T5; 1,5 mg) < original (T1; 3,2 mg) após a realização da etapa de limpeza com d-SPE. Por outro lado, as versões do método QuEChERS original (T2; 31,5 mg), citrato (T4; 16,0 mg) e acetato (T6; 11,8 mg) sem a realização da etapa de limpeza apresentaram quantidades significativas de co-extrativos não-voláteis. Portanto, fica evidente a necessidade de realização de etapa de limpeza, a fim de que se tenha uma menor quantidade de co-extrativos não voláteis no extrato final.

A presença destes interferentes está associada a ocorrência de efeito matriz, o qual pode ser prejudicial na ionização dos compostos de interesse quando da utilização da técnica de LC-MS/MS. Nos testes T1, T3 e T5 empregou-se o sorvente etilenodiamino-N-propil (PSA) que é uma amina primária e secundária. Este material atua na remoção de pigmentos, ácidos graxos de cadeia curta, açúcares e compostos polares através do seu elevado efeito quelante, fornecido pela estrutura bidentada (CABRERA, 2012). Apesar das diversas vantagens, a utilização de PSA como sorvente na etapa de limpeza por d-SPE deve ser sempre avaliada em função dos analitos de interesse e do pH do meio de extração, uma vez que este sorvente pode atuar na retenção de agrotóxicos com características ácidas como o 2,4-D (BRUZONITTI, 2014). Outros sorventes foram avaliados na etapa de d-SPE e os resultados serão abordados no item 4.2.3.

Figura 6 - Comparação entre as quantidades de coextrativos não-voláteis remanescentes em cada versão do método QuEChERS (original, citrato e acetato) com e sem etapa de limpeza



Fonte: Arquivo pessoal. T1=QuEChERS original c/ limpeza; T2= QuEChERS original s/ limpeza; T3= QuEChERS citrato c/ limpeza; T4= QuEChERS citrato s/ limpeza; T5= QuEChERS acetato c/ limpeza; T6= QuEChERS acetato s/ limpeza.

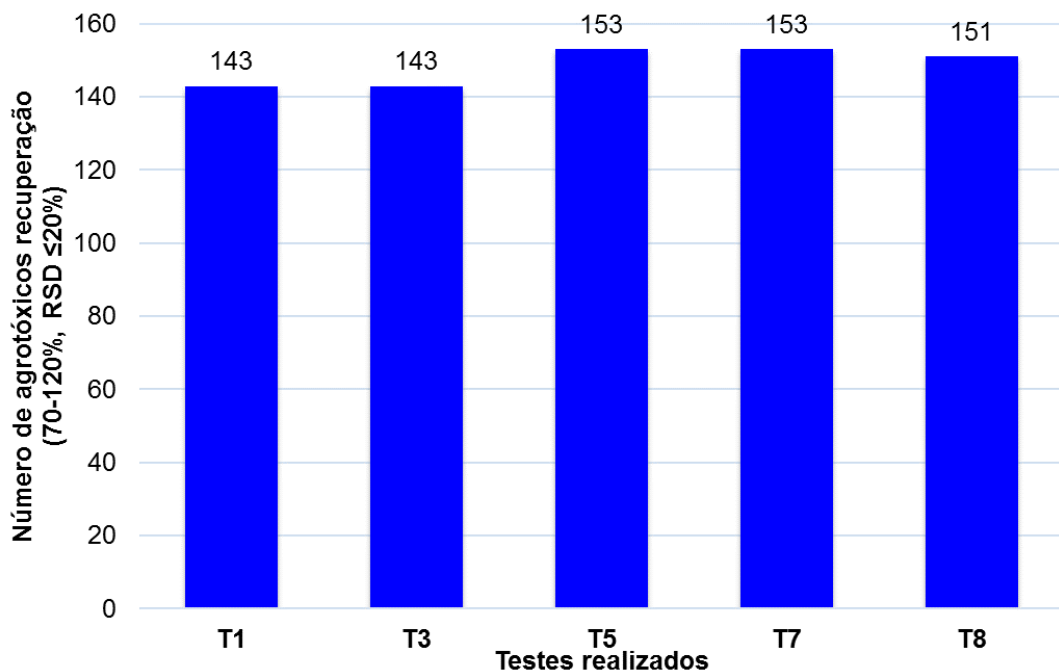
4.2.2 Avaliação da eficiência de extração das versões do método QuEChERS original, acetato, citrato e original acidificada

A partir de informações obtidas na literatura sobre determinação multirresíduo de agrotóxicos e dos melhores resultados obtidos no item 4.2.1, foram inicialmente realizados cinco testes para avaliação da extração de agrotóxicos em suco de uva integral (Tabela 11). Como pode ser observado, foram avaliadas as versões do método QuEChERS original (T1), citrato (T3) e acetato (T5) com etapa de limpeza por d-SPE. Em função da presença dos herbicidas 2,4 D, fluroxipir e quincloraque, entre os agrotóxicos de interesse, também avaliou-se a versão do método QuEChERS original acidificada (5% (v/v) de ácido fórmico) com (T7) e sem (T8) PSA na etapa de limpeza (KOESUKWIWAT; SANGUANKAEW; LEEPIPATPIBOON, 2008). Estes herbicidas apresentam alta polaridade e são bastante solúveis em água. Além disso, apresentam $pK_a \leq 4$ e são estáveis em pH ácido (KOESUKWIWAT; SANGUANKAEW; LEEPIPATPIBOON, 2008). Em cada um dos testes avaliados a “amostra branco” foi fortificada na concentração de $25 \mu\text{g L}^{-1}$. Após a etapa de fortificação, aguardou-se 30 min para executar os procedimentos de extração. Os resultados foram relacionados com curvas preparadas no extrato branco da matriz de acordo com cada teste avaliado (n=6).

A Figura 7 apresenta os resultados considerados adequados (recuperação 70-120%, RSD $\leq 20\%$), para todos os testes que avaliaram a etapa de extração. Para os 168 agrotóxicos avaliados, os testes T5 (método QuEChERS acetato + d-SPE) e T7 (método QuEChERS original acidificado + d-SPE com PSA) apresentaram resultados adequados para 153 substâncias. O teste T8 (método QuEChERS original acidificado + d-SPE sem PSA) apresentou resultado adequado para 151 agrotóxicos. Além destes, cada um dos testes T1 e T3 apresentaram resultados adequados para 143 substâncias. Os resultados obtidos são similares a outros trabalhos presentes na literatura. Lehotay e colaboradores (2010) realizaram uma comparação entre diferentes versões do método QuEChERS (original, citrato e acetato) e concluíram que a utilização de sais tamponantes como o acetato de sódio (pH 4,8) e citrato de sódio (pH 5,0-5,5) aumenta a eficiência de extração dos agrotóxicos, principalmente daqueles que são dependentes do pH do meio de extração como carbendazim e imazalil. Chiarello e colaboradores (2018), Souza e colaboradores (2016), Christia e

colaboradores (2015) e Romero-González e colaboradores (2008) avaliaram a presença de resíduos de agrotóxicos em sucos de uva e outras frutas por LC-MS/MS e também reportaram que o método QuEChERS acetato é a versão mais eficiente na extração dos analitos de interesse. O uso de ácido fórmico no QuEChERS original (T7 e T8) também proporcionou resultados adequados para as recuperações dos analitos.

Figura 7 – Avaliação da eficiência de extração (% recuperação e RSD%) das diferentes versões do método QuEChERS (original T1, citrato T2, acetato T3 e original acidificado com (T7) e sem (T8) PSA na etapa de limpeza por d-SPE.



Fonte: Arquivo pessoal. T1=QuEChERS original c/ limpeza; T3= QuEChERS citrato c/ limpeza; T5= QuEChERS acetato c/ limpeza; T7= QuEChERS original acidificado c/ PSA na etapa de limpeza e T8= QuEChERS original acidificado s/ PSA na etapa de limpeza.

Como visto anteriormente, o suco de uva integral contém, dentre seus principais componentes, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e açúcares. Estas substâncias podem interferir na determinação cromatográfica por serem co-extraídos juntamente com os analitos de interesse (AHUMADA; ZAMUDIO; ESPAÑA, 2012). A fim de escolher o método de extração mais eficiente (QuEChERS acetato – T5 - ou QuEChERS original acidificado com PSA na etapa de limpeza – T7) avaliou-se o efeito matriz destas duas versões. A Tabela 15 apresenta uma comparação do comportamento de todos os 168 agrotóxicos em relação ao efeito matriz calculado

para estas duas versões do método QuEChERS. Observa-se, que quando se utiliza o método QuEChERS acetato (T5), dos 168 agrotóxicos avaliados, 139 apresentam resultados de efeito matriz de $\pm 20\%$. Ou seja, valores que de acordo com a literatura podem ser desconsiderados como efeito matriz. Os resultados mostram que outros 19 agrotóxicos apresentam efeito matriz brando entre as faixas de 20 a 50% e de -20 a -50%. Somente 10 agrotóxicos apresentaram valores de efeito matriz de $< -50\%$ ou $> 50\%$, valores considerados altos. Por outro lado, quando se utiliza o método QuEChERS original acidificado (T7), dos 168 agrotóxicos avaliados, 128 apresentam resultados de efeito matriz de $\pm 20\%$. Além disso, outros 14 agrotóxicos apresentam efeito matriz brando entre as faixas de 20 a 50% e de -20 a -50%. Outros 26 agrotóxicos apresentam valores de efeito matriz de $< -50\%$ ou $> 50\%$.

Tabela 15 - Comparação do efeito matriz (%), por faixa percentual e calculado para todos os agrotóxicos avaliados, nos métodos QuEChERS acetato e original acidificado.

Efeito Matrix	QuEChERS	QuEChERS
	acetato	original acidificado
	(nº de agrotóxicos)	(nº de agrotóxicos)
->50%	4	21
20 a 50%	10	9
-20 a +20%	139	128
-20 a -50%	9	5
<-50%	6	5

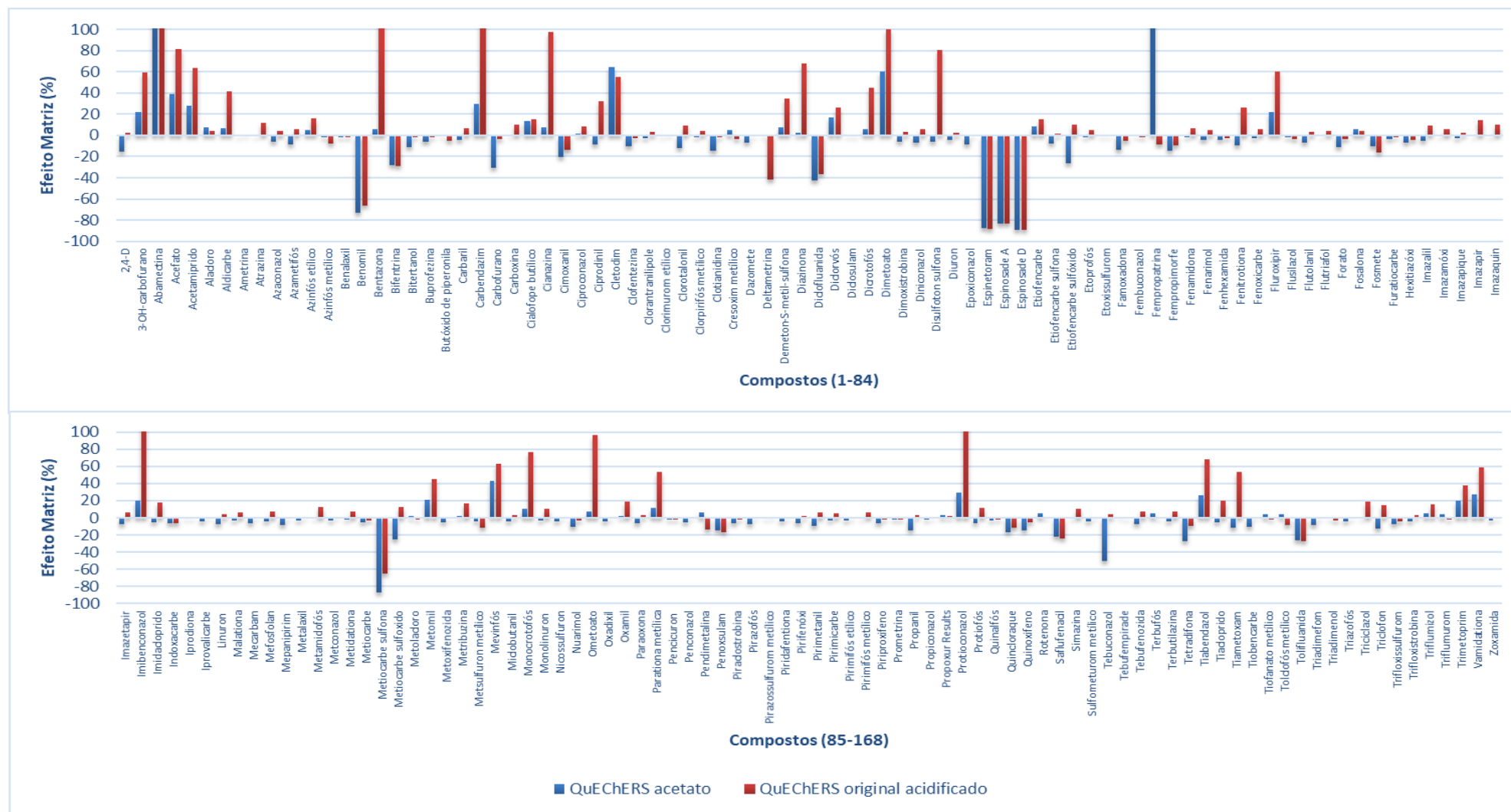
Na Figura 8, é possível observar as diferenças de comportamento de todos os compostos em relação ao efeito matriz nos dois métodos avaliados. Observa-se que vários agrotóxicos, como exemplo, aldicarbe, bentazona, cianazina, ciprodinil, deltametrina, fenitrotona, imibenconazol, monocrotofós, ometoato, parationa metílica, tiacloprido, tiametoxam e trimetoprim etc não apresentam efeito matriz adequado ($\pm 20\%$) quando utiliza-se o QuEChERS original acidificado. Alguns compostos como abamectina, benomil, cletodim, fempropatrina apresentaram efeito matriz $> 100\%$ ou $< 100\%$, extrapolando o eixo y do gráfico.

Segundo Santana-Mayor e colaboradores (2019), um pH mais ácido, como o proporcionado pela versão QuEChERS original acidificado, faz com que se tenha uma

maior quantidade de coextrativos na fase orgânica, aumentando a competição dos analitos com os coextrativos, gerando um efeito matriz mais pronunciado que o QuEChERS acetato, por exemplo.

Tendo em vista os resultados apresentados e considerando os bons resultados já demonstrados por outros trabalhos o método QuEChERS acetato mostrou-se o mais adequado para ser utilizado nas próximas etapas deste trabalho.

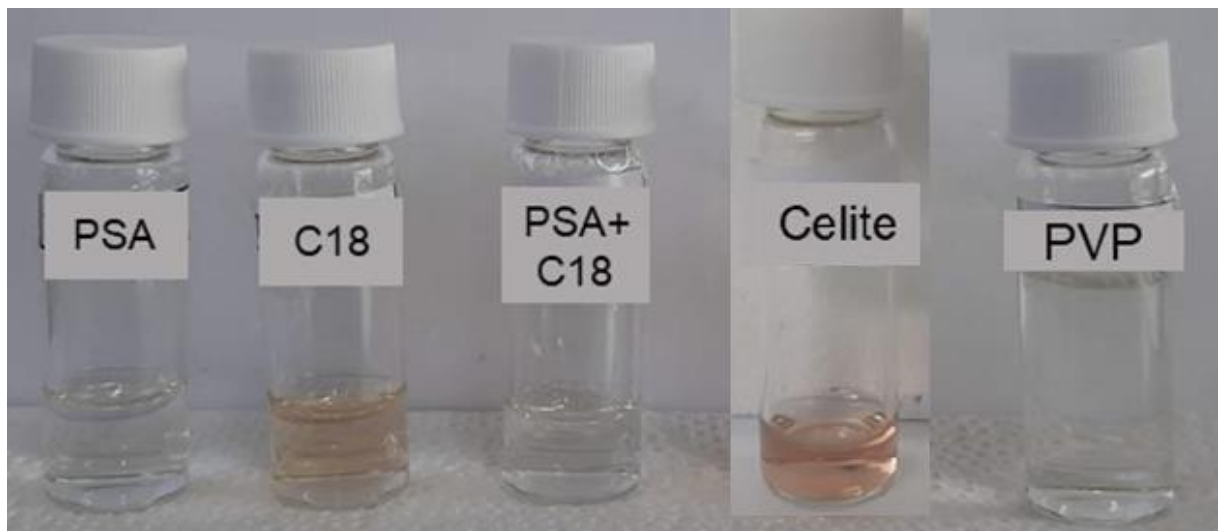
Figura 8 – Avaliação do efeito matriz por LC-MS/MS para os compostos extraídos pelos métodos QuEChERS acetato e QuEChERS original acidificado.



4.2.3 Avaliação de diferentes sorventes nas etapas de limpeza por d-SPE e quando realizada antes do procedimento de extração

A Figura 9 apresenta os extratos obtidos após a realização de cada um dos testes de limpeza descritos na Tabela 12 (item 3.6.3). Salienta-se que nesta avaliação utilizou-se o método QuEChERS acetato para a obtenção dos extratos. Visualmente, os testes que demonstraram maior eficiência de limpeza (remoção de pigmentos) na etapa de d-SPE foram aqueles que PSA, PSA + C18 e PVP como sorventes.

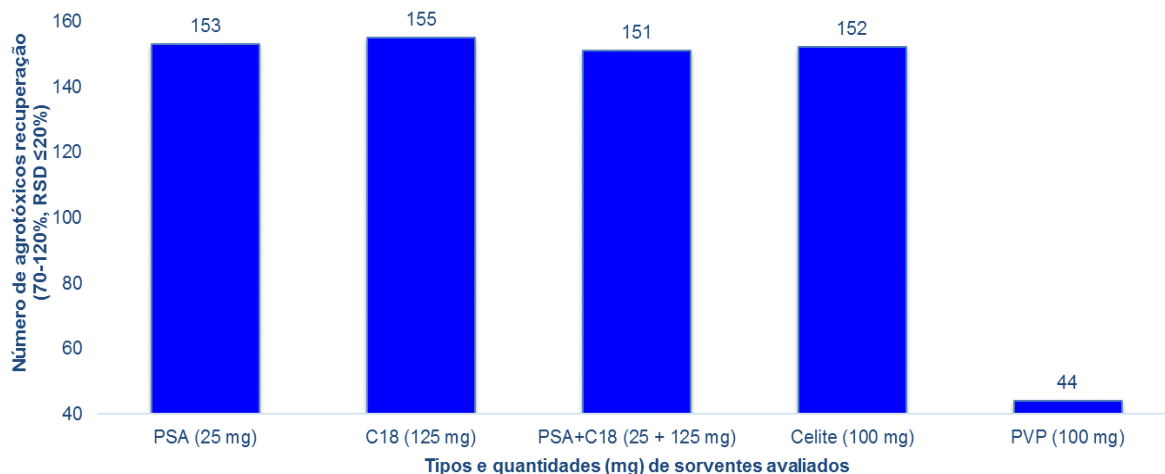
Figura 9 – Extratos obtidos após utilização de diferentes sorventes na etapa de limpeza.



Fonte: Arquivo pessoal.

A Figura 10 apresenta o número de compostos com resultados considerados adequados (recuperação 70-120%, RSD \leq 20%) para todos os testes avaliados na etapa de d-SPE. Ao comparar estes resultados com os extratos apresentados na Figura 9, observa-se que a remoção de pigmentos nem sempre está associada a percentuais de recuperação e RSD adequados. Os resultados mostram que o número de agrotóxicos com percentuais de recuperação e RSD adequados variou entre 44 e 155. Esta diferença está associada com o tipo de sorvente empregado C18>PSA>Celite®>PSA+C18>PVP.

Figura 10 – Número de compostos recuperados, 70-120% com RSD \leq 20%, no nível de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ após etapa de d-SPE, empregando diferentes sorventes (PSA, C18, Celite® e PVP) fortificação analisados por LC-MS/MS.



A utilização de 125 mg do sorvente C18 (octadecilsilano) a cada 1 mL de extrato, apresentou os melhores resultados em relação ao número de compostos recuperados (155). Este sorvente apresenta natureza hidrofóbica sendo bastante empregado para auxiliar na remoção de co-extrativos de baixa polaridade, como ceras, gorduras etc (CABRERA, 2012). Apresenta como desvantagem a possibilidade de interagir fortemente com agrotóxicos de baixa polaridade, normalmente avaliados pela técnica de GC (RUTKOWSKA; LOZOWICKA; KACZYŃSKI, 2018).

Conforme descrito no item 4.2.1, o sorvente PSA é uma amina primária e secundária que apresenta elevado efeito quelante devido sua estrutura bidentada. A utilização deste sorvente está associada a remoção de ácidos graxos de cadeia curta, açúcares e co-extrativos polares. Neste ensaio, a utilização de 25 mg deste sorvente a cada 1 mL de extrato possibilitou resultados adequados para 153 agrotóxicos.

A combinação dos sorventes PSA (25 mg) e C18 (125 mg) possibilitou percentuais adequados de recuperação e RSD para 151 agrotóxicos. De acordo com Cabrera e colaboradores (2012) a utilização em conjunto destes sorventes potencializa a limpeza do extrato e amplia o uso em diferentes tipos de amostras e analitos.

Diferentes estudos têm apresentado resultados promissores quanto ao uso de terras diatomáceas (dióxido de silício) como sorventes na etapa de limpeza (por d-SPE) de diferentes tipos de amostras como por exemplo arroz (HACKBART, *et al.*,

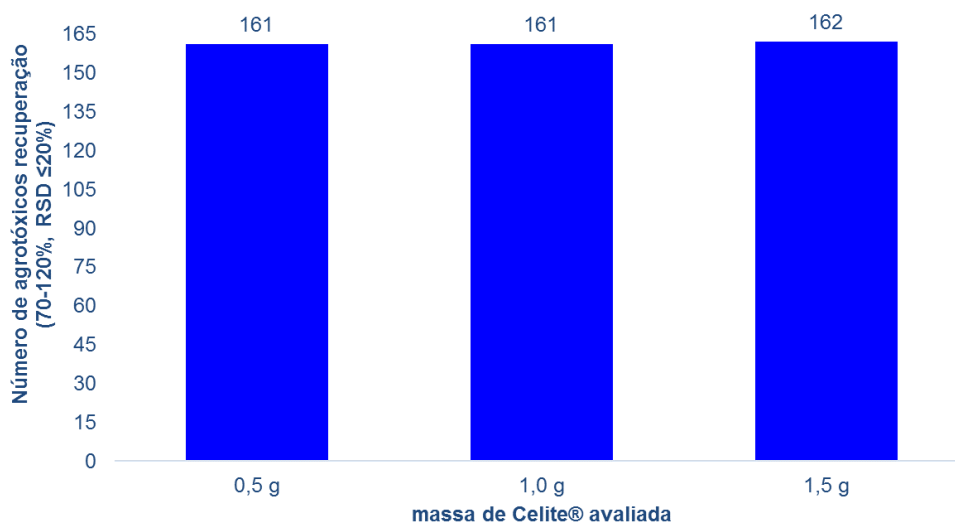
2012), solos (ARIAS, *et al.*, 2014), mostarda (NICÁCIO, *et al.*, 2020) etc. Este sorvente apresenta como características o baixo custo de aquisição e grande área superficial. A terra diatomácea é um sedimento de silicato amorfo, que possui em sua composição, além de sílica, alumínio, ferro, cálcio, magnésio, sódio e potássio e por ser constituído por pequenas partículas ocas possui capacidade absorvente (KIRCHNER, 2017). Neste trabalho utilizou-se o sorvente Celite® que é terra diatomácea calcinada a alta temperatura (SIGMA-ALDRICH, 2021). A partir do uso de 100 mg deste material, para limpeza de 1 mL de extrato na etapa de d-SPE, obteve-se resultados adequados para 152 compostos.

A polivinilpirrolidona, poli[1-(2-oxo-1-pirrolidinil) etileno], é um polímero vinílico formado por unidades repetidas da vinilpirrolidona (monômero). Dependendo do processo de polimerização, pode conter um número muito variado de monômeros, fazendo com que sua massa molar varie de 2.500 - 2.5000.000 g·mol⁻¹ (QUÍMICA NOVA INTERATIVA, 2021). A partir do uso de 100 mg deste material na limpeza de 1 mL de extrato na etapa de d-SPE, obteve-se resultados adequados somente para 44 compostos. Os baixos níveis de recuperação (<70%) obtidos, quando utilizou-se, podem estar relacionados com a natureza hidrofílico deste sorvente, uma vez que é utilizado como grupo hidrofílico em diversos polímeros empregados na técnica de SPE (WATERS CORPORATIONS, [s.d.]).

A partir dos resultados obtidos e considerando os custos em Reais (R\$) por grama de sorvente, C18 (R\$29,05/g) > PSA (R\$12,70/g) > PVP (R\$8,78/g) > Celite® (R\$0,20/g) (SIGMA-ALDRICH, [s.d.]), optou-se em seguir as otimizações utilizando o sorvente Celite®. Assim, adaptou-se a proposta de Chu e colaboradores (2005), onde autores adicionaram a terra diatomácea na amostra de suco de maçã, antes da adição do solvente de extração. Este procedimento teve por objetivo a remoção de pigmentos e ácidos orgânicos. A Figura 11 apresenta os resultados dos testes descritos no item 3.6.3 que avaliaram a adição de 0,5; 1 e 1,5 g de Celite® na amostra. Neste procedimento, o sorvente foi adicionado antes da realização do método QuEChERS acetato. Além disso, não se realiza a etapa de d-SPE. Como pode ser observado, obteve-se resultados adequados (recuperação 70-120%, RSD ≤20%) para mais de 160 diferentes agrotóxicos, independente da massa utilizada 0,5 g (161); 1,0 (161) e 1,5 g (162).

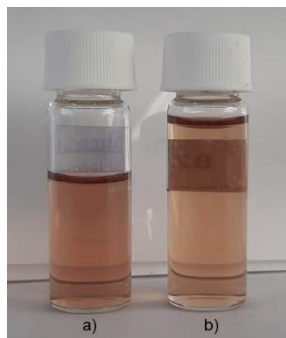
A adição de Celite® antes da etapa de extração faz com que os coextrativos do suco de uva integral tenham preferência pela retenção no sorvente, já quando foi utilizado na etapa de d-SPE, o Celite® pode ter retido também alguns compostos de interesse, visto que o extrato tinha uma menor quantidade de coextrativos pois já havia passado pelas etapas de extração e partição. Ainda, segundo Ahumada e colaboradores (2012) quanto menor a razão composto/matriz, maior será a supressão dos compostos na etapa de ionização.

Figura 11 - Número de compostos recuperados, 70-120% com $RSD \leq 20\%$, no nível de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ após adição na amostra de diferentes quantidade de Celite® (0,5; 1,0 e 1,5 g) e posterior realização do método QuEChERS acetato e análise por LC-MS/MS.



Assim como demonstrado na Figura 9, quando o sorvente Celite® foi utilizado na etapa de d-SPE, não obteve-se neste novo procedimento uma remoção completa dos pigmentos do extrato. A Figura 12 apresenta uma comparação da aparência visual de extrato branco obtido pelo método QuEChERS acetato a) sem etapa de limpeza (T6, Tabela 11) e b) com adição de Celite® antes do procedimento de extração. Observa-se uma pequena diminuição na coloração do extrato quando na presença do sorvente. Em função disso e dos resultados da recuperação dos compostos, para as próximas etapas deste estudo, optou-se pela utilização de 1,5 gramas de Celite®, com o objetivo de garantir a melhor remoção possível de co-extrativos da matriz.

Figura 12 – Comparação da aparência visual de extrato branco obtido pelo método QuEChERS acetato a) sem etapa de limpeza e b) com adição de 1,5 g Celite® antes do procedimento de extração



Fonte: Arquivo pessoal.

Considerando os resultados obtidos, o custo dos sorventes e a facilidade de execução, uma vez que a limpeza por d-SPE foi suprimida do método, as próximas etapas deste estudo levaram em consideração a adição de 1,5 g de Celite® em 10 mL de “amostra branco” de suco de uva integral e posterior realização do método QuEChERS acetato (T6, Tabela 11).

4.2.4 Método QuEChERS acetato otimizado

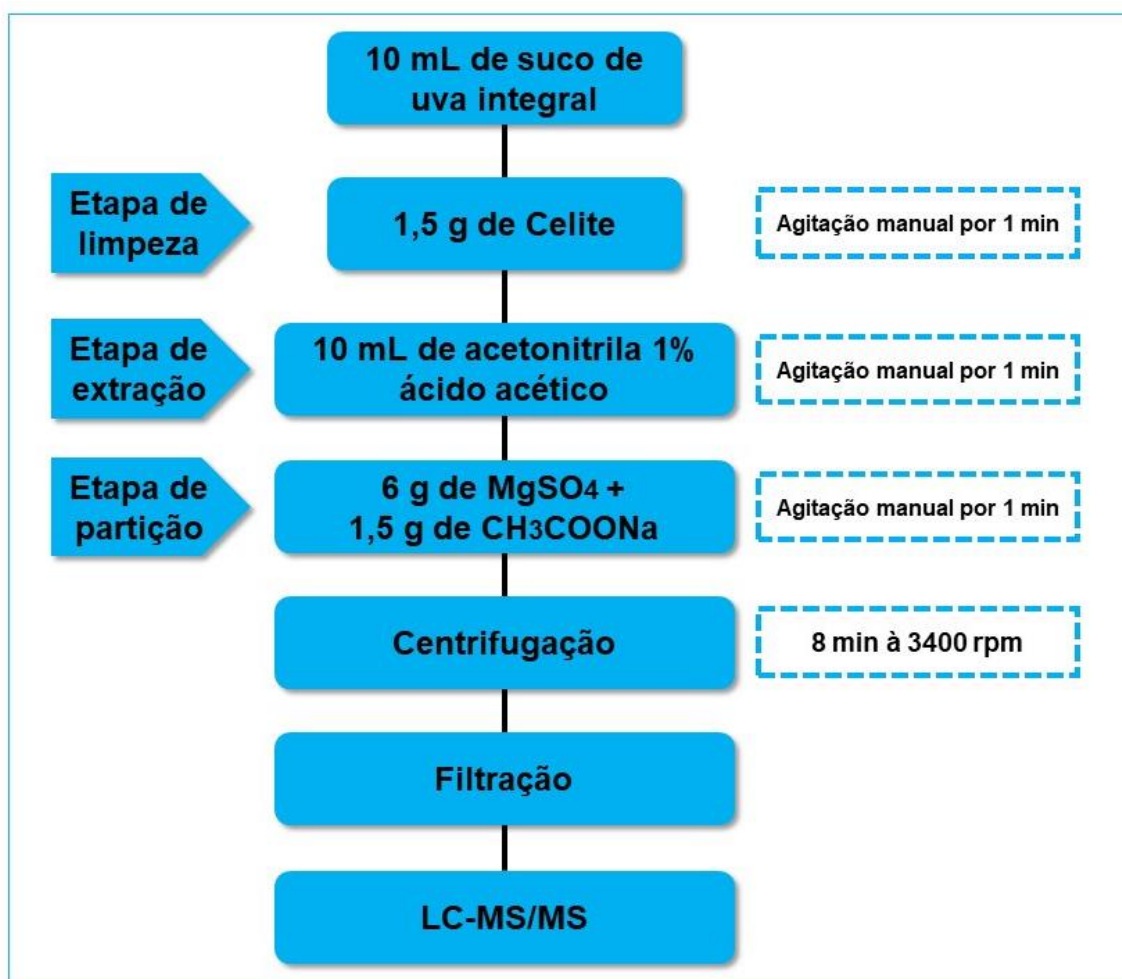
A Figura 13 mostra o método desenvolvido, validado e aplicado no preparo das amostras de suco de uva integral deste estudo. O preparo de amostras proposto foi desenvolvido com base no método MSPD proposto por Chu e colaboradores (2005) e no método QuEChERS acetato que, além de ser a versão mais utilizada – segundo a literatura – para extração de agrotóxicos em suco de uva e uva, foi a que apresentou os melhores resultados nos testes de otimização (item 4.2.2).

A adição do sorvente Celite® anterior a etapa de extração, além de recuperar o maior número de compostos quando comparada aos outros testes realizados (item 4.2.3), possibilita a redução no número de etapas e, conseqüentemente, no tempo de execução do método de preparo de amostras, pois suprime uma etapa de centrifugação de 8 minutos. Ainda, como citado no item 4.2.3, comparado com os demais sorventes de limpeza testados, o Celite é o que possui o menor custo (R\$0,20/g)(SIGMA-ALDRICH, 2021).

Além disso, segundo a Tabela 7, as técnicas de preparo de amostras de suco de uva encontradas na literatura eram baseadas em microextração líquido-líquido

dispersiva, extração líquido-líquido ou no método QuEChERS com suas etapas tradicionais (etapas de extração, partição e limpeza por d-SPE). Considerando essas informações, é possível dizer que o método desenvolvido neste estudo é promissor para extração multirresíduo de agrotóxicos em suco de uva integral e possui muitas vantagens, como as citadas acima.

Figura 13 – Método QuEChERS acetato otimizado para determinação de resíduos de agrotóxicos em suco de uva integral por LC-MS/MS.



4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE SUCO DE UVA INTEGRAL

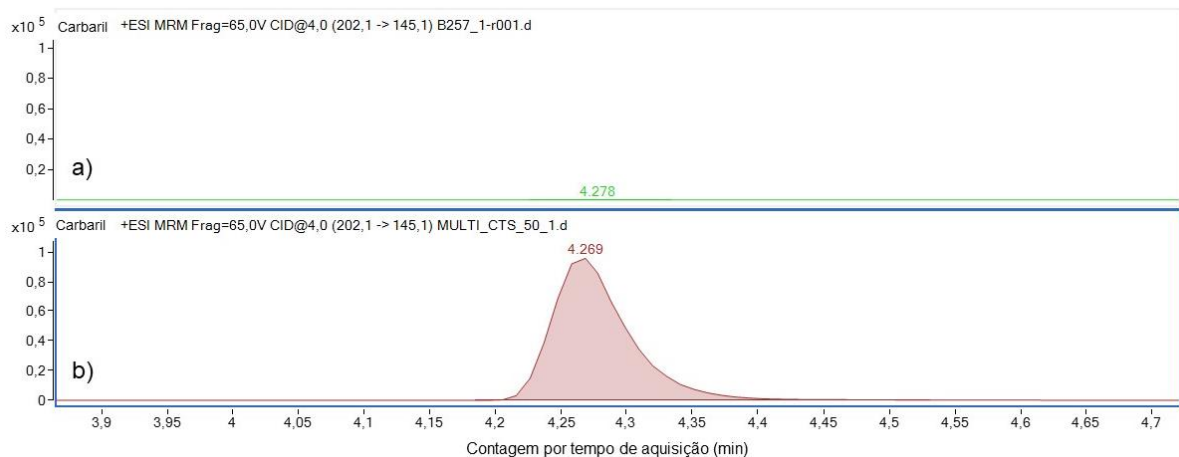
A validação do método QuEChERS acetato foi realizada utilizando o sistema LC-MS/MS nas condições descritas no item 3.7. Todas as soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato da

matriz (suco de uva integral) obtido a partir de amostras “branco”. Dos 168 compostos inicialmente planejados estudados neste trabalho, 153 atenderam todos os critérios estabelecidos na validação conforme o item 3.7.

4.3.1 Seletividade e Linearidade

A Figura 14 permite observar que o método proposto apresenta seletividade adequada, uma vez que não há interferentes nas amostras “branco” com os mesmos íons de quantificação/identificação nos mesmos tempos de retenção dos analitos de interesse. Na amostra “branco” não foi verificada a presença dos analitos em estudo acima do LOD do método, dessa forma, a amostra avaliada foi utilizada para a preparação da curva analítica e ensaios de fortificação.

Figura 14 – Avaliação da seletividade para a) amostra branco de suco de uva integral e b) solução padrão 50 µg L⁻¹ (preparada no extrato da “amostra branco”) do fungicida carbaril.

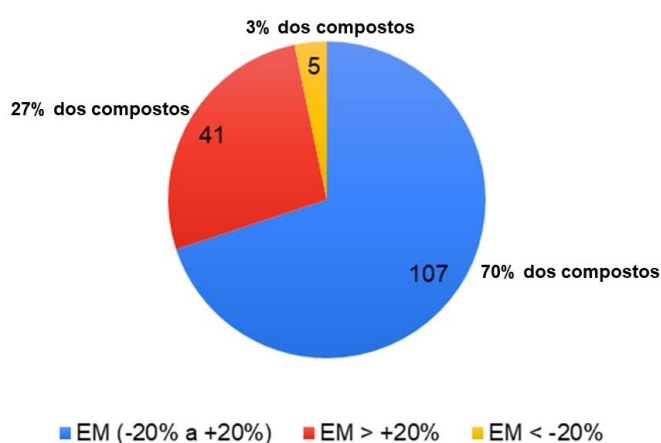


A linearidade do método proposto foi avaliada através do coeficiente de correlação (r^2) obtido através da regressão linear dos pontos da curva analítica preparada no extrato da “amostra branco”. A faixa de concentração avaliada foi de 0,5 a 50 µg L⁻¹. Conforme observado na Tabela 16, todos os agrotóxicos avaliados apresentaram $r^2 \geq 0,990$. Além desses parâmetros, o *íon ratio*, também foi avaliado e a faixa de aceitação de $\pm 30\%$ foi atendida por todos os compostos da Tabela 16.

4.3.2 Efeito Matriz

O efeito matriz (EM) foi calculado para todos os analitos através da comparação da inclinação das curvas analíticas preparadas no solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz (suco de uva integral). A faixa de concentração avaliada foi de 0,5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados da avaliação do efeito matriz são apresentados na Tabela 16. A Figura 15 apresenta um resumo dos resultados de efeito matriz para os 153 agrotóxicos validados neste método.

Figura 15 – Efeito matriz para os compostos extraídos pelo método QuEChERS acetato e avaliados por LC-MS/MS.



Observa-se que 107 (70%) agrotóxicos apresentaram efeito matriz de $\pm 20\%$. Segundo Oshita e Jardim (2015) quando o efeito matriz estiver na faixa de $\pm 20\%$ ele pode ser desconsiderado. Por outro lado, cerca de 46 (30%) compostos apresentaram valores de efeito matriz fora desta faixa. Nestes casos, o efeito matriz é significativo e deve ser considerado, uma vez que pode promover supressão ou acréscimo de sinal. A presença de coextrativos da matriz pode ocasionar competição durante a ionização dos compostos causando mudanças na eficiência, promovendo uma supressão ou aumento do sinal analítico. A supressão iônica ocorre pela presença de substâncias não-voláteis e/ou de compostos formados por superfícies ativas. Ainda, compostos polares são mais suscetíveis a sofrerem alterações na ionização devido ao efeito matriz (PRESTES, 2009). Em função de 30% dos compostos apresentarem valores significativos de efeito matriz toda a etapa de validação deste neste trabalho, será efetuada empregando curva analítica preparada no extrato da “amostra branco” (suco

de uva integral). Assim, minimiza-se os possíveis problemas causados por este desvio (DEME & UPADHYAYULA, 2015). Além disso, todas as soluções injetadas no sistema LC-MS/MS são previamente diluídas por um fator de 5 vezes (em água), para minimizar a presença de co-extrativos.

Tabela 16 – Resultados obtidos na etapa de validação do método QuEChERS para os parâmetros de validação LOQ, LOD, exatidão, precisão, precisão intermediária e efeito matriz.

(continua)

Nº	Compostos	r ²	LOQ (µg L ⁻¹)	LOD (µg L ⁻¹)	Exatidão, Recuperação % (Precisão, RSDr %)								Precisão Interm., Recuperação % (Precisão, RSDpi %)				EM (%)				
					5 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	20 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹	5 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	20 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹									
1	2,4-D*	0,9955	10,0	3,0	133	30	78	8	94	5	77	6	104	8	87	20	107	9	98	9	-17
2	3-OH-carbofurano*	0,9981	10,0	3,0	130	3	104	3	90	8	87	3	135	3	102	3	91	3	86	2	111
3	Acefato	0,9998	5,0	1,5	107	1	91	2	82	3	85	2	104	1	110	5	108	1	108	3	40
4	Acetamiprido	0,9994	5,0	1,5	104	3	94	3	91	4	89	2	109	4	111	8	112	2	112	3	118
5	Alacloro	0,9997	5,0	1,5	94	6	90	6	70	13	94	2	94	15	94	8	91	5	92	2	10
6	Aldicarbe	0,9998	5,0	1,5	93	10	91	11	84	4	95	8	120	3	94	6	82	4	77	6	42
7	Ametrina	0,9999	5,0	1,5	84	3	89	2	85	4	93	1	89	7	101	7	99	2	98	3	4
8	Atrazina	0,9995	5,0	1,5	70	4	82	3	92	6	94	1	66	4	75	11	79	3	83	3	15
9	Azaconazol	1,0000	5,0	1,5	95	5	94	4	92	3	92	2	93	5	108	4	106	2	107	2	4
10	Azametifós*	0,9995	10,0	3,0	67	2	83	3	88	3	95	1	64	3	82	4	91	1	94	1	22
11	Azinfós etílico	1,0000	5,0	1,5	92	2	90	1	95	8	88	1	82	6	73	2	75	4	74	3	23
12	Azinfós metílico	1,0000	5,0	1,5	94	6	92	5	94	2	92	3	90	18	89	10	90	4	99	14	2
13	Benalaxil	0,9999	5,0	1,5	85	3	90	1	79	6	93	2	86	2	93	9	90	2	90	3	0
14	Bentazona*	0,9975	10,0	3,0	147	4	108	5	91	6	84	3	148	4	108	2	92	4	83	2	172
15	Bitertanol*	0,9983	10,0	3,0	149	7	112	1	91	2	85	4	152	7	90	18	105	7	97	4	2
16	Buprofezina	0,9999	5,0	1,5	78	2	82	3	54	3	84	1	88	5	109	2	108	2	107	3	9
17	Butóxido de piperonila	1,0000	5,0	1,5	94	1	90	2	94	3	86	1	109	3	103	2	97	4	93	2	4
18	Carbaril	0,9999	5,0	1,5	83	5	85	4	87	2	98	5	86	5	99	5	100	5	107	4	9
19	Carbendazim*	0,9982	10,0	3,0	133	1	106	3	91	13	87	2	151	3	113	1	99	2	89	2	240
20	Carbofurano*	0,9994	10,0	3,0	55	3	74	1	87	10	88	2	88	1	94	1	101	2	105	3	-27
21	Carboxina*	0,9992	10,0	3,0	60	5	78	1	90	2	90	2	12	57	74	2	95	3	104	5	22
22	Cialofope butílico	0,9996	5,0	1,5	102	13	95	7	90	8	93	4	91	13	95	9	102	7	104	4	34
23	Cianazina	0,9992	5,0	1,5	118	2	99	4	94	3	88	2	75	4	105	2	92	3	86	3	179

(continuação)

Nº	Compostos	r ²	LOQ (µg L ⁻¹)	LOD (µg L ⁻¹)	Exatidão, Recuperação % (Precisão, RSDr %)								Precisão Interm., Recuperação % (Precisão, RSDpi %)					EM (%)			
					5 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	20 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹	5 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	20 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹									
24	Cimoxanil	0,9998	5,0	1,5	82	10	89	3	92	7	91	3	78	7	91	9	97	9	103	7	22
25	Ciproconazol*	0,9989	10,0	3,0	56	10	77	6	90	4	98	2	55	8	87	9	96	7	104	4	3
26	Ciprodinil	0,9996	5,0	1,5	93	11	100	10	96	9	93	4	78	10	86	10	101	4	110	8	15
27	Cletodin	0,9996	5,0	1,5	107	4	91	3	90	3	75	3	98	4	95	16	77	8	72	3	73
28	Clofentezina	0,9995	5,0	1,5	74	4	82	4	89	5	88	2	84	4	96	9	102	10	106	6	1
29	Cloranfenicol	1,0000	5,0	1,5	96	4	91	9	91	2	90	4	95	13	112	19	89	7	92	4	2
30	Clorimurom etílico	0,9999	5,0	1,5	109	7	99	6	91	1	85	4	100	8	103	7	99	6	97	4	8
31	Clorotalonil	0,9996	5,0	1,5	80	4	85	9	77	5	93	7	70	18	86	9	96	7	100	3	-2
32	Clorpirifós metílico	1,0000	5,0	1,5	95	6	91	6	94	2	90	3	76	5	92	5	96	3	100	3	0
33	Clotianidina	0,9999	5,0	1,5	101	12	97	15	93	2	92	3	95	10	106	10	100	5	103	7	104
34	Cresoxim metílico	0,9999	5,0	1,5	87	5	85	5	84	3	91	3	94	15	112	2	109	4	115	2	2
35	Dazomete	0,9996	5,0	1,5	76	6	85	4	92	7	91	3	76	13	84	8	89	8	94	4	4
36	Demeton-S-metil-sulfona*	0,9972	10,0	3,0	144	4	107	3	94	6	87	4	120	5	107	13	93	8	91	6	98
37	Diazinona	0,9999	5,0	1,5	97	3	89	1	92	3	86	3	76	2	84	16	80	2	82	4	12
38	Diclorvós*	0,9999	10,0	3,0	65	50	74	12	91	5	91	15	40	120	79	14	85	13	92	6	22
39	Diclosulam*	0,9984	10,0	3,0	44	26	91	6	72	16	96	8	57	31	75	10	85	11	94	8	-15
40	Dicrotofós*	0,9984	10,0	3,0	135	2	107	2	94	3	87	1	149	2	112	2	97	2	91	4	104
41	Dimetoato*	0,9985	10,0	3,0	130	2	103	3	99	16	84	1	132	3	107	3	98	2	92	2	167
42	Dimoxistrobina	0,9999	5,0	1,5	89	2	91	2	94	3	91	1	86	8	104	7	103	2	104	2	0
43	Diniconazol	0,9999	5,0	1,5	90	5	90	5	66	27	90	3	81	10	91	7	94	5	94	4	0
44	Diuron*	0,9993	10,0	3,0	63	4	84	2	91	3	96	1	58	17	84	5	92	3	97	2	5
45	Epoxiconazol*	0,9996	10,0	3,0	68	2	83	2	94	3	93	2	76	2	74	7	75	1	77	3	-1
46	Espinetoram	1,0000	5,0	1,5	97	3	92	2	95	3	90	1	87	3	91	4	89	1	89	3	-62
47	Espinosade A	1,0000	5,0	1,5	94	2	92	2	94	5	92	1	89	4	90	3	91	2	91	2	-58
48	Espinosade D	0,9997	5,0	1,5	85	5	86	6	82	3	94	4	80	3	82	8	86	3	90	3	-69

(continuação)

Nº	Compostos	r ²	LOQ (µg L ⁻¹)	LOD (µg L ⁻¹)	Exatidão, Recuperação % (Precisão, RSDr %)								Precisão Interm., Recuperação % (Precisão, RSDpi %)				EM (%)				
					5 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	20 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹	5 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	20 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹									
49	Etiofencarbe sulfona	1,0000	5,0	1,5	94	1	92	2	75	9	87	2	100	3	88	3	85	5	83	4	0
50	Etiofencarbe sulfóxido	0,9991	5,0	1,5	116	2	100	1	83	23	90	2	120	3	109	3	98	3	96	3	115
51	Etiofencarbe*	0,9996	10,0	3,0	71	2	82	3	70	80	89	3	58	9	84	3	94	2	99	4	18
52	Etoprofós	0,9999	5,0	1,5	94	3	93	7	87	5	95	2	74	6	88	5	95	2	99	4	23
53	Etoxissulfurom	0,9998	5,0	1,5	80	5	84	6	91	3	88	2	73	12	82	7	87	3	92	2	0
54	Fembuconazol*	0,9993	10,0	3,0	63	9	83	5	90	3	92	3	81	6	90	3	94	3	98	3	11
55	Fempropimorfe	1,0000	5,0	1,5	94	3	92	3	92	3	90	1	84	3	91	4	91	2	92	3	-1
56	Fenamidona	1,0000	5,0	1,5	105	2	96	3	94	3	90	3	92	5	82	4	82	2	81	4	4
57	Fenarimol*	0,9969	10,0	3,0	34	17	76	6	71	19	99	2	17	77	76	6	94	2	105	4	3
58	Fenhexamida*	0,9984	10,0	3,0	43	35	81	6	90	10	98	3	45	52	88	9	88	6	99	8	0
59	Fenoxicarbe	0,9998	5,0	1,5	76	4	87	3	93	3	91	1	70	4	86	2	90	5	94	2	5
60	Fluroxipir*	0,9988	10,0	3,0	126	4	104	3	92	3	86	3	129	2	94	4	84	1	76	2	112
61	Flusilazol*	0,9978	10,0	3,0	36	12	71	7	78	8	99	2	46	26	113	16	114	4	119	1	3
62	Flutolanil*	0,9981	10,0	3,0	41	5	73	4	91	9	97	2	47	11	74	6	82	1	89	2	2
63	Flutriafol	1,0000	5,0	1,5	95	5	92	5	89	5	88	2	85	6	92	6	92	6	93	3	6
64	Forato*	0,9999	10,0	3,0	86	18	103	18	93	1	88	10	93	49	95	17	81	17	88	11	6
65	Fosalona	0,9998	5,0	1,5	78	9	81	6	94	1	87	7	100	18	97	12	97	11	105	5	2
66	Fosmete	0,9997	5,0	1,5	75	3	82	5	86	8	95	2	73	8	103	6	114	2	116	4	-8
67	Furatiocarbe	0,9999	5,0	1,5	97	1	90	3	73	7	83	2	109	5	117	2	113	1	109	3	7
68	Hexitiazóxi	1,0000	5,0	1,5	95	10	94	9	91	3	83	7	115	1	107	5	87	2	77	9	-8
69	Imazalil	0,9999	5,0	1,5	96	4	90	5	91	6	89	1	74	10	80	6	90	3	94	4	17
70	Imazamóxi	1,0000	5,0	1,5	98	2	93	3	92	4	89	2	85	4	96	9	93	2	93	3	7
71	Imazapique	0,9997	5,0	1,5	89	5	79	2	89	5	73	2	82	8	88	7	88	3	88	3	22
72	Imazaquin*	0,9985	10,0	3,0	42	11	72	5	91	4	91	2	6	149	76	5	104	5	118	4	21
73	Imazetapir	1,0000	5,0	1,5	86	4	83	2	88	1	89	9	93	4	75	6	71	1	71	4	8

(continuação)

Nº	Compostos	r ²	LOQ (µg L ⁻¹)	LOD (µg L ⁻¹)	Exatidão, Recuperação % (Precisão, RSDr %)								Precisão Interm., Recuperação % (Precisão, RSDpi %)					EM (%)			
					5 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	20 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹	5 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	20 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹									
74	Imibenconazol	0,9996	5,0	1,5	110	5	93	4	93	9	73	6	113	19	90	17	81	11	75	10	35
75	Imidacloprido	1,0000	5,0	1,5	94	2	95	8	91	2	87	3	114	3	99	4	92	4	89	3	82
76	Indoxacarbe	0,9998	5,0	1,5	104	8	93	7	92	2	87	5	108	11	102	5	103	10	96	6	5
77	Iprodiona*	0,9996	10,0	3,0	68	4	82	2	76	2	97	2	67	11	83	5	93	4	98	3	3
78	Iprovalicarbe	0,9999	5,0	1,5	85	3	89	1	56	2	92	1	81	3	94	4	94	0	95	2	2
79	Linuron	0,9995	5,0	1,5	83	7	84	3	85	2	93	3	70	8	84	8	91	5	95	3	4
80	Malationa*	0,9963	10,0	3,0	38	19	75	5	90	4	100	2	20	73	76	9	96	4	106	4	3
81	Mecarbam*	0,9995	10,0	3,0	64	4	82	3	92	6	93	2	76	4	75	7	75	2	77	3	-3
82	Mefosfolan	0,9997	5,0	1,5	76	3	86	2	93	1	94	2	77	5	90	2	98	1	103	2	14
83	Mepanipirim*	0,9984	10,0	3,0	49	42	80	10	92	4	91	3	72	7	81	6	93	5	95	5	3
84	Metalaxil	0,9999	5,0	1,5	84	3	89	3	74	10	93	2	70	7	76	3	81	2	85	3	3
85	Metamidofós	0,9997	5,0	1,5	108	1	93	1	90	3	83	1	88	2	91	3	90	1	90	3	8
86	Metconazol	1,0000	5,0	1,5	96	4	94	3	92	2	91	2	89	4	90	5	89	4	91	3	0
87	Metidationa*	0,9980	10,0	3,0	43	5	74	5	90	2	89	5	47	21	82	8	91	6	98	4	5
88	Metiocarbe	0,9994	5,0	1,5	81	6	86	4	93	2	93	6	75	6	85	6	95	2	100	4	2
89	Metiocarbe sulfona*	0,9978	10,0	3,0	142	6	106	7	89	3	84	1	150	6	96	6	113	4	110	4	-8
90	Metiocarbe sulfóxido	0,9990	5,0	1,5	118	2	99	3	70	19	88	2	120	3	101	3	92	3	89	3	130
91	Metolacloro*	0,9990	10,0	3,0	55	7	78	7	87	1	97	1	62	9	106	3	114	2	115	4	6
92	Metomil*	0,9992	10,0	3,0	129	2	106	3	93	3	92	2	130	4	108	3	100	3	94	1	106
93	Metoxifenzida*	0,9988	10,0	3,0	47	6	75	5	94	3	98	3	47	7	82	8	92	3	100	3	3
94	Metribuzina	0,9998	5,0	1,5	108	4	95	2	89	4	91	2	109	6	104	4	98	5	96	4	18
95	Metsulfurom metílico*	0,9988	10,0	3,0	59	8	77	3	92	2	94	2	44	22	95	6	110	3	116	2	1
96	Mevinfós*	0,9989	10,0	3,0	132	3	104	4	91	3	85	3	154	4	97	3	112	3	103	2	117
97	Miclobutanil*	0,9989	10,0	3,0	55	16	77	4	93	3	97	2	60	6	81	10	92	2	96	3	4
98	Monocrotofós*	0,9991	10,0	3,0	128	4	104	5	98	2	88	2	136	5	111	3	102	2	96	4	95

(continuação)

Nº	Compostos	r ²	LOQ (µg L ⁻¹)	LOD (µg L ⁻¹)	Exatidão, Recuperação % (Precisão, RSDr %)								Precisão Interm., Recuperação % (Precisão, RSDpi %)								EM (%)
					5 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	20 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹	5 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	20 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹									
99	Monolinurom	0,9997	5,0	1,5	73	5	80	4	93	4	96	3	70	12	92	5	99	4	108	4	19
100	Nicossulfurom*	0,9989	10,0	3,0	55	8	76	6	92	2	93	2	42	17	78	6	89	5	97	2	0
101	Nuarimol	0,9996	5,0	1,5	103	10	97	11	90	4	88	6	118	13	106	9	96	8	95	7	2
102	Ometoato*	0,9988	10,0	3,0	132	11	106	7	92	2	84	2	123	9	111	4	96	3	89	3	32
103	Oxadixil	0,9995	5,0	1,5	86	15	115	4	109	8	94	1	99	12	82	10	77	3	72	1	7
104	Oxamil*	0,9991	10,0	3,0	127	1	104	2	95	10	86	2	134	2	113	3	102	2	94	2	52
105	Paraoxon	0,9999	5,0	1,5	87	3	88	1	94	4	92	2	75	4	73	2	77	1	80	3	4
106	Parationa metílico*	0,9955	10,0	3,0	130	10	109	3	89	3	85	2	154	12	110	7	107	5	92	5	130
107	Pencicuron	0,9999	5,0	1,5	99	2	94	2	94	5	87	1	95	4	90	3	90	8	85	4	0
108	Penconazol	1,0000	5,0	1,5	98	4	92	4	89	4	91	3	90	8	93	3	92	4	91	3	0
109	Penoxsulam*	0,9983	10,0	3,0	59	7	80	7	107	3	96	2	76	5	88	5	92	4	97	3	-27
110	Piraclostrobina	0,9996	5,0	1,5	73	2	85	3	78	8	91	2	79	8	99	2	104	4	104	3	5
111	Pirazofós*	0,9986	10,0	3,0	145	2	109	5	91	1	84	1	115	1	85	3	78	4	74	3	0
112	Pirazossulfurom etílico	0,9999	5,0	1,5	87	8	87	5	89	5	90	2	86	5	99	6	103	4	105	3	5
113	Piridafentiona	0,9999	5,0	1,5	87	3	89	2	91	2	90	2	83	5	87	5	89	3	91	3	0
114	Pirifenóxi*	0,9992	10,0	3,0	58	5	81	3	89	5	95	2	33	10	78	5	93	4	103	2	2
115	Pirimetanil	0,9996	5,0	1,5	109	6	99	3	77	6	88	6	94	18	106	5	100	4	98	3	3
116	Pirimicarbe	0,9999	5,0	1,5	83	2	88	2	92	2	92	1	82	2	91	2	94	2	96	2	14
117	Pirimifós etílico	1,0000	5,0	1,5	97	1	91	1	75	20	87	1	95	6	99	2	98	3	96	3	6
118	Pirimifós metílico	1,0000	5,0	1,5	98	2	93	3	94	4	89	2	85	4	96	9	93	2	93	3	7
121	Propanil*	0,9980	10,0	3,0	41	8	75	4	89	2	97	3	56	20	94	6	100	4	106	4	3
122	Propiconazol	0,9998	5,0	1,5	77	4	85	3	89	3	92	1	88	6	102	5	103	1	104	3	4
123	Propoxur*	0,9991	10,0	3,0	53	10	78	3	92	2	96	2	43	13	73	6	86	3	94	3	7
124	Protiofós	0,9999	5,0	1,5	81	13	93	14	80	4	92	4	98	8	103	11	114	4	111	4	5
125	Quinalfós	0,9998	5,0	1,5	81	7	84	9	92	2	90	3	90	9	106	4	112	2	114	5	2

(continuação)

Nº	Compostos	r ²	LOQ (µg L ⁻¹)	LOD (µg L ⁻¹)	Exatidão, Recuperação % (Precisão, RSDr %)								Precisão Interm., Recuperação % (Precisão, RSDpi %)								EM (%)
					5 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	20 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹	5 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	20 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹									
126	Quinoxifeno	1,0000	5,0	1,5	91	2	87	3	90	5	78	5	115	2	82	3	78	18	75	6	6
127	Rotenona*	0,9991	10,0	3,0	54	19	81	7	93	1	92	2	28	41	76	5	90	5	99	3	3
128	Saflufenacil	0,9992	5,0	1,5	99	6	103	10	79	7	83	9	113	8	91	10	78	8	86	7	-14
129	Simazina	0,9999	5,0	1,5	83	10	87	5	90	4	91	2	87	14	96	9	100	3	102	2	32
130	Sulfometurom metílico*	0,9987	10,0	3,0	48	5	74	3	91	4	94	2	45	20	74	4	86	4	97	2	8
131	Tebuconazol	0,9996	5,0	1,5	109	3	100	5	70	13	87	3	111	10	116	10	119	2	114	5	2
132	Tebufempirade	0,9999	5,0	1,5	78	3	88	2	85	4	87	4	88	5	85	4	85	9	81	3	5
133	Tebufenozida*	0,9995	10,0	3,0	66	7	84	2	84	4	96	4	63	10	95	11	98	1	105	4	2
134	Terbufós	0,9986	10,0	3,0	51	15	73	8	92	6	91	5	98	41	83	11	100	17	95	9	0
135	Terbutilazina*	0,9984	10,0	3,0	43	13	74	4	91	12	95	3	56	15	79	7	86	6	92	3	3
136	Tiabendazol*	0,9956	10,0	3,0	164	3	117	3	89	8	81	2	199	4	119	4	120	3	106	3	263
137	Tiacloprido	0,9999	5,0	1,5	87	2	89	2	92	3	90	2	97	5	96	2	95	3	95	3	82
138	Tiametoxam	0,9990	5,0	1,5	117	2	100	3	91	6	90	8	109	3	82	5	81	5	75	2	132
139	Tiobencarbe	1,0000	5,0	1,5	96	4	93	3	79	3	86	2	108	4	92	2	86	4	83	5	-1
140	Tiofanato metílico*	0,9979	10,0	3,0	42	3	72	3	76	3	92	3	88	5	108	3	109	3	107	3	13
141	Tolclofós metílico	0,9997	5,0	1,5	90	11	89	20	88	3	84	7	120	16	111	16	105	18	86	4	5
142	Triadimefon	0,9996	5,0	1,5	78	10	83	6	94	2	92	4	76	17	86	7	90	6	96	7	1
143	Triadimenol	1,0000	5,0	1,5	93	2	93	4	89	3	93	3	76	6	95	6	97	3	98	5	-1
144	Triazofós	0,9999	5,0	1,5	85	2	88	2	71	14	91	2	94	3	93	8	87	2	86	3	1
145	Triciclazol	0,9994	5,0	1,5	113	2	99	1	92	1	88	4	117	2	104	2	96	1	92	3	59
146	Triclorfon*	0,9976	10,0	3,0	118	4	101	11	88	5	87	4	163	10	88	18	98	9	95	5	68
147	Trifloxissulfurom	0,9999	5,0	1,5	109	1	95	2	99	9	89	2	101	10	95	3	91	3	86	4	-3
148	Trifloxistrobina	1,0000	5,0	1,5	98	1	93	2	91	6	90	1	92	4	85	2	83	5	79	3	6
149	Triflumizol	1,0000	5,0	1,5	92	2	90	1	93	2	88	1	82	6	73	2	75	4	74	3	23
150	Triflumurom	0,9998	5,0	1,5	79	11	85	2	91	2	88	3	85	16	89	9	93	7	86	7	3

(conclusão)

Nº	Compostos	r ²	LOQ (µg L ⁻¹)	LOD (µg L ⁻¹)	Exatidão, Recuperação % (Precisão, RSDr %)								Precisão Interm., Recuperação % (Precisão, RSDpi %)				EM (%)				
					5 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	20 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹	5 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	20 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹									
151	Trimetoprim*	0,9991	10,0	3,0	127	1	100	2	94	4	82	3	137	5	112	2	98	3	91	1	107
152	Vamidationa*	0,9984	10,0	3,0	139	1	108	2	87	2	84	2	163	2	102	3	107	2	95	2	134
153	Zoxamida	0,9999	5,0	1,5	90	6	93	5	91	13	93	1	80	8	93	6	98	5	100	3	1

RSDr – Desvio padrão relativo a repetibilidade; RSDpi - Desvio padrão relativo a precisão intermediária; r² – Coeficiente de correlação; LOD – Limite de detecção; LOQ – Limite de quantificação. *Agrotóxicos que não recuperaram no nível de fortificação de 1 µg L⁻¹

4.3.3 Exatidão e Precisão

A exatidão do método foi avaliada considerando a recuperação dos agrotóxicos em quatro diferentes níveis de fortificação de 5, 10, 20 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($n=6$). Os percentuais de recuperação foram calculados utilizando curva analítica preparada no extrato da “amostra branco”. Considerou-se o critério de recuperação entre 70 e 120% e $\text{RSD} \leq 20\%$ conforme o recomendado pela legislação internacional (SANTE, 2019). Cerca de 52 agrotóxicos não apresentaram valores de recuperações adequados ao critério estabelecido no nível de fortificação de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, estes estão identificados com um asterico na Tabela 16. Os resultados obtidos mostram que a precisão do método está adequada e atendem aos parâmetros estabelecidos visto que, os valores de RSD estão $\leq 20\%$ (SANTE, 2019). Além da precisão, avaliada com base nas replicatas, avaliou-se a precisão intermediária. Para isto, os testes realizados na validação foram repetidos com um intervalo de 7 dias, sendo feitos pelo mesmo analista, no mesmo local e com o mesmo equipamento.

Os agrotóxicos benomil e quincloraque apresentam pKas de 4,48 e 4,34, respectivamente. Estes valores são considerados próximos do pH do tampão formado quando utiliza-se o método QuEChERS acetato (pH 4,8). Estas substâncias apresentaram valores de recuperação $<70\%$. Suspeita-se que estavam em sua forma dissociada no pH de extração do método utilizado. O herbicida imazapir não apresentou recuperações satisfatórias no método proposto (70-120%, $\text{RSD} \leq 20\%$), entretanto, apresentou boas recuperações quando utilizou-se a versão QuEChERS original acidificado, e os compostos deltametrina, proclorazoxol e abamectina, que também não apresentaram recuperações satisfatórias no QuEChERS acetato, recuperaram quando empregou-se a versão QuEChERS original. Suspeita-se que estes compostos são mais estáveis no pH destas versões do método.

Os agrotóxicos bifentrina, diclofluanida, disulfoton sulfona, famoxadona, fempropatrina, fenitrotiona, pendimetalina, tetradifon e tolifluanida não apresentaram recuperações satisfatórias (70 a 120% e $\text{RSD} \leq 20\%$) quando avaliados na etapa de precisão intermediária. Suspeita-se que estes podem ter ficado retidos na estrutura do Celite[®]. Quando da avaliação deste sorvente na etapa de limpeza por d-SPE (item 3.6.2), estes compostos também não apresentaram resultados de recuperação adequados. Assim, dos 168 compostos inicialmente avaliados, 153 apresentaram

resultados considerados adequados, de recuperação e RSD%, durante a etapa de validação do método.

4.3.4 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram obtidos de acordo com o item 3.7 e estão apresentados na Tabela 16. Dos 153 agrotóxicos validados neste trabalho, mais de 65% apresentam LOQ de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ e LOD de $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Os outros 35% apresentam valores de LOQ $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e LOD de $3,3 \mu\text{g L}^{-1}$. Conforme descrito no item 3.7, o LOQ para cada substância foi estabelecido como o menor nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$) que apresentou resultados aceitáveis de exatidão e precisão (recuperações de 70 a 120% e $\text{RSD} \leq 20\%$). Conforme descrito anteriormente, a legislação vigente estabelece valores de LMR somente para alguns agrotóxicos em suco de uva. Dos compostos validados neste trabalho, apenas a clotianidina possui LMR ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$) estabelecido para suco de uva (FAO, [s.d.]). Para os demais agrotóxicos, os valores de LMR são aqueles estabelecidos para uva (ANVISA, [s.d.]). Os valores de LOQ obtidos durante a validação deste método, estão de acordo com a legislação, uma vez que atendem aos LMR estabelecidos.

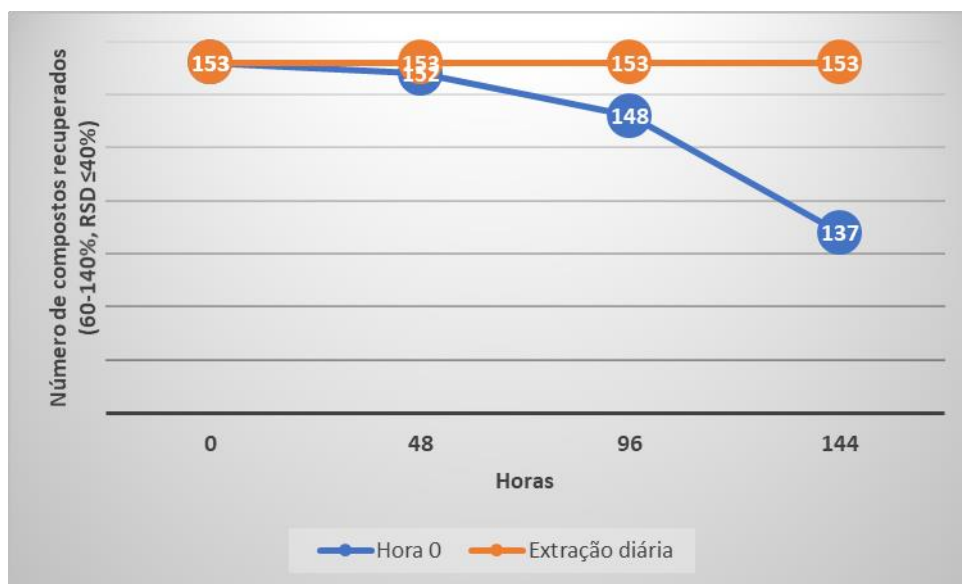
4.3.5 Avaliação da estabilidade dos extratos

A Figura 16 apresenta o perfil de estabilidade de solução padrão $25 \mu\text{g L}^{-1}$ (preparada no extrato branco da matriz), conforme descrito no item 3.7 esta solução foi avaliada por LC-MS/MS a cada 48 horas num período de 6 dias. O extrato utilizado para o preparo da solução padrão foi obtido a partir da adição de 1,5 g de Celite® em 10 mL de “amostra branco” de suco de uva integral e posterior realização do método QuEChERS acetato (T6, Tabela 11).

Como pode ser observado a partir de 48 horas de armazenamento a solução padrão $25 \mu\text{g L}^{-1}$ apresenta problemas de estabilidade para o herbicida imazetapir, mesmo que armazenada sob condições de refrigeração ($-10 \text{ }^\circ\text{C}$). Após 96 horas de armazenamento, outros compostos como o azinfós etílico, cletodim, cimoxanil, imibenconazol e triflumizol apresentam problemas de estabilidade e após 144 horas os compostos clorimuram etílico, carbofurano, cianazina, diazinona, diclosulam,

etoxissulfurom, forato, hexitiazóxi, imazapique, metsulfurom metílico e piripróxifeno também apresentaram problemas estabilidade.

Figura 16 – Avaliação da estabilidade de solução padrão $25 \mu\text{g L}^{-1}$ (preparada no extrato branco da matriz), avaliada por LC-MS/MS, a cada 48 horas em um período de 6 dias.



De acordo com o estudo realizado por Rizzetti e colaboradores (2016) os extratos de sucos possuem uma grande quantidade de coextrativos, muitos desses constituintes são antioxidantes o que pode causar a degradação lenta dos agrotóxicos.

Considerando que a SANTE (2019) estabelece que é aceitável um desvio de $\pm 10\%$ entre a solução nova e a antiga, na hora 144 de teste (6° dia) seria o limite do desvio permitido (provável degradação de aproximadamente 15 compostos), ou seja, o período máximo para que a solução padrão preparada no extrato da matriz seja analisada. Entretanto, em análises de rotina é necessário que o preparo de amostras de suco de uva integral, seguindo o método otimizado e validado neste trabalho, seja feito no máximo 24 horas antes da injeção no equipamento, visto que, dentro desse período não houve perda de nenhum analito.

5 AVALIAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO UTILIZADO

Tendo em vista os resultados de validação obtidos para o método QuEChERS acetato (Tabela 16) pode-se dizer que o procedimento é adequado para determinação de resíduos de agrotóxicos em suco de uva integral.

O método QuEChERS é o método de extração multirresíduo de agrotóxicos mais utilizado em amostras de alimentos e bebidas, principalmente por ser bastante robusto e poder ser aplicado à diversas matrizes (PRESTES, 2009). A utilização do Celite® anterior a etapa de extração tornou o método de preparo de amostras mais rápido - visto que suprime uma etapa de centrifugação, de fácil execução, além de recuperar um grande número de compostos de diferentes classes e propriedades físico-químicas. Dos 168 compostos selecionados inicialmente, 153 foram validados utilizando o método desenvolvido. Considerando a Tabela 7, o estudo com maior número de compostos, encontrado na literatura até então, foi o desenvolvido por Chiarello (2018), onde foram determinados 79 agrotóxicos. Dessa forma, o método desenvolvido nesse estudo possibilitou um maior número de compostos do que os demais.

O método QuEChERS acetato utilizando Celite® antes da etapa de extração ainda possui boa detectabilidade. Isso pode ser observado através da comparação entre os LOQs deste estudo com os trabalhos, que utilizam método QuEChERs e cromatografia, existentes na literatura (Tabela 7). Para o método desenvolvido neste estudo, o LOQ variou de 5 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 16). Já na literatura, os LOQs encontrados variam de 2,5 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (SOUZA, (2016); MIELE (2015); ORELLANA-SILLA, (2018); CHIARELLO, (2018)). Os LOQs obtidos neste estudo atenderam aos LMRs estabelecidos para uva na legislação brasileira (variam de 10 a 5000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (ANVISA, [s.d.]).

Como pode ser visto no item 4.3.2 e na Tabela 16, cerca de 70% dos compostos, determinados neste estudo, apresentaram efeito matriz dentro da faixa aceitável ($\leq \pm 20\%$), assim como no estudo desenvolvido por Deme e Upadhyayula (2015). Apesar disso, 30% dos compostos validados apresentaram EM fora da faixa aceitável e por isso trabalhou-se com curva analítica preparada na matriz (suco de uva integral) e com diluição do extrato, 5 vezes em água, para injeção no LC-MS/MS (OSHITA; JARDIM, 2015).

Em termos de aplicabilidade, o procedimento desenvolvido é de fácil execução e utiliza um sorvente de limpeza de baixo custo, o Celite® (SIGMA-ALDRICH, 2021),

que remove grande parte dos coextrativos do suco de uva integral e ainda garante a extração de uma grande diversidade de compostos.

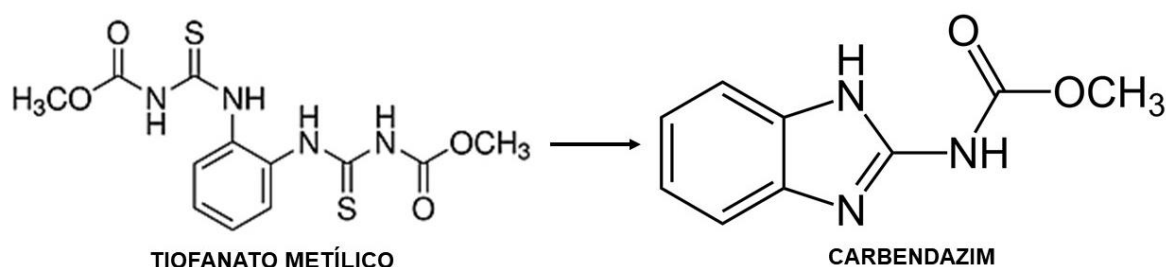
6 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

6.1 APLICAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS ACETATO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE SUCO DE UVA

O método validado neste trabalho foi aplicado à 23 amostras (A1 a A23) de suco de uva de diferentes marcas comercializadas em mercados locais (Santa Maria - RS). A maioria destas amostras foram produzidas no Estado do Rio Grande do Sul, nas cidades de Bento Gonçalves, Farroupilha, Flores da Cunha, São José do Hortêncio, Caxias do Sul, São Marcos e Vespesiano Côrrea, exceto duas amostras que são de Aracati (Ceará) e Araguari (Minas Gerais). As amostras A15, A16 e A18 são sucos de uva integral com certificação de alimento orgânico. De acordo com a Tabela 17 das 23 amostras avaliadas, 17 (cerca de 74%) apresentaram resíduos de agrotóxicos.

Dos 153 agrotóxicos avaliados neste estudo, 4 foram quantificados e/ou detectados nas amostras analisadas. O agrotóxico que apareceu com maior frequência (17 amostras) foi o fungicida carbendazim, numa faixa de concentração de <LOQ (amostra A4) à 41,98 $\mu\text{g L}^{-1}$ (amostra A12). Este é um fungicida sistêmico e não possui seu uso autorizado para o cultivo da uva no Brasil. Entretanto, é um produto da ciclização degradativa (Figura 17) do fungicida tiofanato metílico (SILVA; MELO, [s.d.]) sendo este autorizado para uso na viticultura.

Figura 17 – Reação de ciclização degradativa do tiofanato metílico em carbendazim.



Fonte: Adaptado de CAPALDO, *et al.*, 2007.

O LMR do tiofanato metílico em uva é de 700 $\mu\text{g kg}^{-1}$, expresso como a soma de carbendazim e tiofanato metílico (ANVISA, [s.d.]). O tiofanato metílico também foi encontrado na amostra A12 (12,05 $\mu\text{g kg}^{-1}$). O relatório de 2017-2018 do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA, encontrou carbendazim em 38 das 319 amostras de uva analisadas. De acordo com o trabalho realizado por Wang e colaboradores (2020), o agrotóxico carbendazim atua nas células fúngicas causando a segregação prejudicada de cromossomos durante a divisão celular e isso também pode ocorrer nas células de mamíferos, causando efeitos nocivos à saúde humana. Esse agrotóxico vem sendo associado como um provável fator de doenças cancerígenas.

Tabela 17 – Resultados em $\mu\text{g L}^{-1}$ das 17 amostras de suco de uva (que apresentaram resíduos de agrotóxicos) analisadas utilizando o método QuEChERS acetato e LC/MS-MS.

Amostras	Resíduos de agrotóxicos encontrados ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	Acetamiprido	Carbendazim	Dimetoato	Tiofanato metílico
A1*	n.d.	17,8	n.d.	n.d.
A2	n.d.	13,5	n.d.	n.d.
A3	n.d.	16,7	n.d.	n.d.
A4	<LOQ	<LOQ	n.d.	n.d.
A5	n.d.	20,3	n.d.	n.d.
A7*	n.d.	16,1	n.d.	n.d.
A9*	n.d.	17,3	n.d.	n.d.
A11	n.d.	10,6	n.d.	n.d.
A12	<LOQ	42,0	n.d.	12,0
A13*	n.d.	16,5	n.d.	n.d.
A14	n.d.	16,2	n.d.	n.d.
A19*	n.d.	15,7	n.d.	n.d.
A20*	n.d.	15,2	n.d.	n.d.
A22	n.d.	14,0	n.d.	n.d.
A23	n.d.	18,5	n.d.	n.d.
A24	n.d.	13,8	n.d.	n.d.
A25*	<LOQ	26,8	<LOQ	n.d.
		<i>LRM ($\mu\text{g kg}^{-1}$)</i>		
ANVISA	300	-	-	700
EU	500	-	10	-
CODEX	500	3000	-	-

<LOQ= concentração menor que o limite de quantificação do método.

n.d. = não detectado.

*Suco de uva concentrado

Além de resíduos de tiofanato-metílico e carbendazim, foram detectados em 3 amostras (A4, A12 e A25) os inseticidas acetamiprido e dimetoato em concentrações <LOQ. O primeiro possui seu uso autorizado para o cultivo de uva com LMR de 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e foi encontrado em 3 amostras analisadas pela ANVISA no último Relatório do PARA. Entretanto, o dimetoato não possui seu uso autorizado, na cultura da uva, pela ANVISA. Porém, esta substância foi encontrada em 5 amostras analisadas pelo PARA no período de 2017-2018. De uma forma geral, as amostras A12 e A25 foram as que apresentaram maiores níveis de contaminação, sendo que em ambas foram encontrados resíduos de três agrotóxicos (acetamiprido, carbendazim e tiofanato). É importante salientar que nas amostras de suco de uva integral com certificação de alimento orgânico (A15, A16 e A18), não foram detectados nenhum dos agrotóxicos analisados neste estudo.

Os LMRs considerados na Tabela 17 foram estabelecidos para a uva, por isso, são fornecidos em $\mu\text{g kg}^{-1}$, diferente das concentrações encontradas nas amostras de suco de uva, que por serem líquidas, são em $\mu\text{g L}^{-1}$. Não foram encontradas legislações que estabelecessem como esses valores devem ser comparados, entretanto, Chiarello (2018) fez uma comparação direta entre eles. Dessa forma, neste estudo também foi feita uma comparação direta entre as concentrações de resíduos de agrotóxicos em suco de uva ($\mu\text{g L}^{-1}$) e os LMRs para a fruta *in natura* ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

Dos agrotóxicos que possuem LMR estabelecido diretamente para o suco de uva (Tabela 7), de acordo com o *Codex Alimentarius* (FAO, [s.d.]), nenhum foi encontrado nas amostras analisadas.

Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com outros trabalhos que avaliaram produtos derivados da uva como suco e vinho. No estudo realizado por Bernardi (2017) foram encontrados resíduos de carbendazim em 9 das 22 amostras de vinho analisadas. Bakirci e colaboradores (2014) encontraram acetamiprido em 1 amostra de uva ($0,037 \text{ mg kg}^{-1}$), carbendazim em 9 amostras de uva ($0,03\text{-}0,215 \text{ mg kg}^{-1}$) e tiofanato metílico em 4 amostras de uva ($0,031\text{-}0,311 \text{ mg kg}^{-1}$). Ainda, no trabalho desenvolvido por Chiarello (2018) foram encontrados resíduos de carbendazim em 11 amostras de suco de uva branca ($109,4 \pm 0,31 \mu\text{g L}^{-1}$) e em 6 amostras de suco de uva bordô ($148,9 \pm 0,21 \mu\text{g L}^{-1}$) e tiofanato metílico em uma amostra de suco de uva bordô ($10,7 \pm 0,06 \mu\text{g L}^{-1}$). O trabalho desenvolvido por Alves

e colaboradores (2014) encontrou dimetoato em 4 amostras de suco de uva brasileiros analisados, em concentrações de 14,5 a 17 mg L⁻¹.

7 CONCLUSÕES

Este trabalho consistiu em otimizar o método QuEChERS para determinação de uma ampla gama de agrotóxicos em suco de uva integral. Foram avaliadas as versões do método QuEChERS bem como diferentes sorventes a serem utilizados na etapa de limpeza (*clean-up*). Os resultados demonstraram que o método QuEChERS acetato utilizando o sorvente Celite® antes da adição do solvente de extração foi o mais adequado, considerando que recuperou o maior número de compostos e reteu coextrativos do extrato da matriz, que poderiam causar interferências na etapa de extração e na análise cromatográfica. Além disso, a utilização do sorvente de limpeza antes da etapa de extração proporcionou redução nas etapas de preparo da amostra (etapa de limpeza por d-SPE) o que diminui a manipulação da amostra e o tempo de execução.

A otimização das condições do sistema LC-MS/MS proporcionou a separação e determinação simultânea de 153 agrotóxicos com seletividade e detectabilidade.

O método proposto neste trabalho foi validado, de acordo com os parâmetros do Guia de Validação da SANTE (2019), para 153 agrotóxicos incluindo, i) substâncias de uso autorizado e não autorizado para o cultivo de uva no Brasil pela ANVISA, ii) agrotóxicos permitidos pela Organização Internacional do Vinho – OIV e iii) agrotóxicos monitorados pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. Todos os analitos deste estudo atingiram limites de quantificação que atendem aos LMRs estabelecidos pela legislação. Foram encontrados resíduos de agrotóxicos em 17 das 23 amostras de suco de uva analisadas o que ressalta a necessidade de monitoramento dessa bebida.

O método de preparo de amostras desenvolvido e validado neste estudo, por utilizar o sorvente Celite® antes da etapa de extração, tem como vantagens uma menor manipulação da amostra, menor tempo de execução e menor número de etapas. Além disso, é um método inovador quando comparado aos outros métodos de preparo de amostras de suco de uva encontrados na literatura e, ainda, foi eficiente na extração dos analitos visto que possibilitou a determinação simultânea do maior número de agrotóxicos (153) encontrados na literatura para esta matriz.

Dessa forma, conclui-se que o método QuEChERS acetato proposto para determinação de agrotóxicos em suco de uva integral, mostrou-se eficaz, bem como

o uso do sistema LC/MS-MS, podendo ser aplicados em análises de rotina e monitoramento, uma vez que atendem as legislações de acordo com os parâmetros de validação de métodos cromatográficos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUMADA, D.A.; ZAMUDIO, A.M.; ESPAÑA, J.C. Matrix effect in pesticide analysis by ultra fast liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 4, p. 661-669. Colômbia, 2012.

ALVES, A.A.R.; *et al.* Determination of pesticides residues in brazilian grape juices using GC-MS-SIM. **Food Anal. Methods**, v. 7, p.1834-1839. Brasil. 2014.

ANASTASSIADES, M., *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-31, 2003.

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

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Ministério da Saúde. RDC nº 4, de 18 de janeiro de 2012. Dispõe sobre os critérios para a realização de estudos de resíduos de agrotóxicos para fins de registro de agrotóxicos no Brasil. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 18 jan. 2012.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Ministério da Saúde. RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Dispõe sobre os critérios para avaliação e classificação toxicológica, priorização da análise e comparação da ação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 31 jul. 2019.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Ministério da Saúde. RDC nº 166, de 24 de junho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 25 jul. 2017.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Monografias Autorizadas**. [s.d.]. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>> Acesso em: 10 fev. 2020.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimenta (PARA)**. Relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018. Brasília. 2019.

ARIAS, J.L.O., *et al.* Alternative sorbents for the dispersive solid-phase extraction step in quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction of pesticides from rice paddy soils with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1360, p. 66-75. 2014.

BAIRD, C.; CANN, M.. **Química Ambiental**, cap.10, p. 437-489, 4. ed., Bookman: Porto Alegre, 2011.

BAKIRCI, G.T., *et al.* Pesticide residues in fruits and vegetables from the Aegean region, Turkey. **Food Chemistry**, v. 160, p. 379-392. Turquia, 2014.

BANDEIRA, N. M. G. *et al.* Evaluation of QuEChERS Sample Preparation for Determination of Avermectins Residues in Ovine Muscle by HPLC-FD and UHPLC-MS/MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 5, p. 878-886. Brasil, 2017.

BERNARDI, G. **Agrotóxicos em vinho: Avaliação do método QuEChERS e da microextração líquido-líquido dispersiva na determinação multiresíduo por UHPLC-MS/MS**. 2017. 127p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

BRASIL. Instrução Normativa nº 14, de 8 de fevereiro de 2018. Dispõe a complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho e derivados da uva e do vinho. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 8 fev. 2018. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-no-14-de-8-de-fevereiro-de-2018.pdf/view>> Acesso em: 3 fev. 2021.

BRASIL. Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 11 jul. 1989. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L7802.htm>. Acesso em: 06 fev. 2020.

BRASIL. Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 8 nov. 1988. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/1980-1988/L7678.htm>. Acesso em: 28 jan. 2020.

BRASIL. Lei nº 9.819, de 14 de julho de 1994. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da Comissão Intersetorial de Bebidas e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 jul 1994. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L8918.htm>. Acesso em: 28 jan. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anexo à norma interna DIPOV nº 01/2019. **Consolidação das Normas de Bebidas, Fermentados Acéticos, Vinho e Derivados da Uva e do Vinho**. 2019. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/AnexoNormalInternaDIPOVverso301219001.pdf>>. Acesso em: 29 jan. 2020.

BRITO, N.M. *et al.* Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146. Curitiba, jan./dez. 2003.

BRUZZONITI, M.C. *et al.* QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: a critical review. **Anal Bioanal Chem**, v. 406, p. 4089-4116. Itália, 2014.

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

CAMARGO, U. A.. **Cultivares**. Agência EMBRAPA de Informação Tecnológica - AGEITEC. [20-?] Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/uva_para_processamento/arvore/CO NT000g5f8cou802wx5ok0bb4szwyx060i6.html>. Acesso em: 29 jan. 2020.

CAPALDO,, A., *et al.* The effects of the fungicide thiophanate methyl on the adrenal gland of reptilian and amphibian bioindicator organisms: Differences in the response to endocrine disruptors. **Evolutionary Molecular Strategies and Plasticity**. p. 1-24. Itália, 2007.

CETESB (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO). **Introdução a convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes**. São Paulo, 2018. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/pops/wp-content/uploads/sites/19/2018/06/Hist%C3%B3rico-e-legisla%C3%A7%C3%A3o-de-poluentes-org%C3%A2nicos-persistentes-POPs-no-Brasil.pdf>>. Acesso em: 16 set. 2020.

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

CHIARELLO, M. **Determinação de resíduos de pesticidas em alimentos por cromatografia a líquido acoplada a analisadores de espectrometria de massas**. 2018. 201p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2018.

CHRISTIA. C., *et al.* Pesticide residues in fruit samples: comparison of different QuEChERS methods using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Environmental Science Pollution Research**, v. 22, p. 13167-13178. Grécia, 2015.

CHU, X.G.; HU, X.Z; YAO, H.Y.. Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass selective detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1063, p. 201-210. China, 2005.

CORRÊA, L. C.; *et al.* **Determinação de açúcares em mosto, sucos de uva e vinho por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**. Embrapa Semiárido. Petrolina, 2013.

DEME, P.; UPADHYAYULA, V.V.R.. Ultra performance liquid chromatography atmospheric pressure photoionization high resolution mass spectrometric method for determination of multiclass pesticide residues in grape and mango juices. **Food Chemistry**, v. 173, p. 1142-1149. Índia, 2015.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). **A Viticultura no Brasil**. 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-uva-e-vinho/a-viticultura-no-brasil>>. Acesso em: 29 jan. 2020.

EUROPEAN COMMISSION. **Pesticides database**. [s.d.] Disponível em: <<https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.CurrentMRL&language=EN>> Acesso em: 10 fev. 2020.

EURL (EUROPEAN UNION REFERENCES LABORATORIES). **Molecular components map of representative matrices within the commodity groups in Document SANCO 12571/2013**. União Europeia, 2013.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), Codex Alimentarius. **Pesticides Database** – Commodities detail. Grapes. [s.d.] Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/commodities-detail/en/?lang=en&c_id=113> Acesso em: 10 fev. 2020.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). **Codex Alimentarius**. FAOStat – Glossary search. 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/glossary/en/>> Acesso em: 06 fev.2020.

FARAJZADEH, M.A.; DJOZAN, D.; KHORRAM, P. Development of a new microextraction method based on a dynamic single drop in a narrow-bore tube: Application in extraction and preconcentration of some organic pollutants in well water and grape juice samples. **Talanta**, v. 85, p. 1135-1142. Irã, 2011.

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

FRANK, A. A.. **Vinho & Saúde/Os benefícios da uva**. União Brasileira da Vitivinicultura. Rio de Janeiro, [20-?]. Disponível em: <http://www.uvibra.com.br/vinhoesaude_18.htm>.

GRIMALT, S.; DEHOUCK, P. Review of analytical methods for the determination of pesticide residues in grapes. **Journal of Chromatography A**, v. 1433, p. 1-23. Bélgica, 2016.

HACKART, H.C.S., *et al.* Método QuEChERS para determinação de ocratoxina a e citrinina em arroz e farelo de arroz. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1733-1737. 2012.

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

KEMMERICH, M., *et al.* 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, n. 3, p. 728-739. Brasil, 2014.

KIRSCHNER, N. *et al.* Novel approach to high-throughput determination of endocrine disruptors using recycled diatomaceous earth as a green sorbent phase for thin-film solid-phase microextraction combined with 96-well plate system. **Analytica Chimica Acta**, v. 996, p.29–37. Santa Catarina, 2017.

KOESUKWIWAT, U.; SANGUANKAEW, K.; LEEPIPATPIBOON, N. Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 626, n. 1, p. 10-20. 2008.

LAMBROPOULOU, D.A.; ALBANIS, T.A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry-based techniques: a review. **Anal Bioanal Chem**, p. 1663-1683, Grécia, 2007.

LANÇAS, F.M.. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27-46. São Paulo, 2013.

LEÃO, P.C.S.. **Breve histórico da vitivinicultura e a sua evolução na região semiárida brasileira**. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica. Recife, v. 7, p. 81-85, 2010.

LEÃO, P.C.S. **Principais variedades de uvas de mesa e porta-enxertos**. EMBRAPA, 2001.

LEHOTAY, S. J. *et al.* 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. Estados Unidos, 2010.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. **Journal of AOAC Interational**, v. 88, p. 615-629, 2005.

LIU, X., *et al.* Effervescence assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on cohesive floating organic drop for the determination of herbicides and fungicides in water and grape juice. **Food Chemistry**, v. 245, p. 653-658. China, 2018.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 25, n. 4, p. 659-664. Campinas, 2005.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 197-207. São Paulo, 2012.

MEIRA, A. P. G. Técnicas de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal: uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 22, n. 2, p. 766-777. Campinas, 2015.

MIELE, A. *et al.* Physicochemical composition, minerals, and pesticide residues in organic grape juices. **Food Science and Technology**, v. 35, p. 120-126. Campinas, 2015.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Pubchem DataBase**. [s.d.] Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em: 29 jan. 2020.

NICÁCIO, A.E., *et al.* Modified QuEChERS method for phenolic compounds determination in mustard greens (*Brassica juncea*) using UHPLC-MS/MS. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 4681-4690. Brasil, 2020.

OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION. **Regulation (EC) n° 396/2005** - maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC of 23 February 2005. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R0396&from=EN>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

ORELLANA-SILLA, A. *et al.* Development of immunosorbents for the analysis of forchlorfenuron in fruit juices by ion mobility spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 23, p. 5961-5967. 2018.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Comparação de métodos por cromatografia líquida na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em morangos. **Química Nova**, v. 38, n. 10, p. 1273-1281. Brasil, 2015.

PICO, Y.; KOZMUTZA, C. Evaluation of pesticide residue in grape juices and the effect of natural antioxidants on their degradation rate. **Anal Bioanal Chem**, v. 389, p. 1805-1814. 2007.

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

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

PROTAS, J.F.S., CAMARGO, U.A.; MELLO, L.M.R. **Vitivinicultura brasileira: regiões tradicionais e pólos emergentes**. Informe Agropecuário. Vinhos finos: rumo à qualidade. Belo Horizonte, v. 27, n. 234, p. 7-15, set/out 2006.

QUÍMICA NOVA INTERATIVA. **Polivinilpirrolidona**, (C₆H₉NO)_n. 2021. Disponível em:

<[http://qnint.sbg.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=jSk7dFagsfhIxmNiCwDBhbFrE2eVdwizWIRjNS4OJDbghVowVt3p8G3OYZMhLwlzpMtkTUulZA5zNo9VHG WwQ#:~:text=A%20polivinilpirrolidona%20\(PVP\)%20%C3%A9%20um,sua%20alta%20solubilidade%20em%20%C3%A1gua.&text=A%20PVP%20%C3%A9%20sintetizada%20a,com%20emprego%20de%20um%20iniciador.](http://qnint.sbg.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=jSk7dFagsfhIxmNiCwDBhbFrE2eVdwizWIRjNS4OJDbghVowVt3p8G3OYZMhLwlzpMtkTUulZA5zNo9VHG WwQ#:~:text=A%20polivinilpirrolidona%20(PVP)%20%C3%A9%20um,sua%20alta%20solubilidade%20em%20%C3%A1gua.&text=A%20PVP%20%C3%A9%20sintetizada%20a,com%20emprego%20de%20um%20iniciador.)> Acesso em: 18 fev. 2021.

RAVELO-PÉREZ, L.M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M.A.. Multi-walled carbon nanotubes as efficient solid-phase extraction materials of organophosphorus pesticides from apple, grape, orange and pineapple fruit juices. **Journal of Chromatography A**, v. 1211, p. 33-42. Espanha, 2008.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. Recent trends in sample preparation and liquid chromatography/mass spectrometry for pesticide residue analysis in food and related matrixes. **Journal of AOAC International**, v. 98, p. 1143-62, 2015.

RIZZETTI, T.M., *et al.* Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC–MS/MS. **Food Chemistry**, v. 196, p. 25-33. Brasil, 2016.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. **Suco e Uva**. Embrapa: Informação Tecnológica. Brasília, DF, 2007.

RIZZON, L.A.; MANFROI, V.; MENEGUZZO, J. **Elaboração de suco de uva na propriedade vitícola**. Embrapa. Bento Gonçalves, RS. 1998.

ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A.G.; VIDAL, J.L.M. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 76, p. 211-225. Espanha, 2008.

RUTKOWSKA, E.; LOZOWICKA, B.; KACZYŃSKI, P. Modification of multiresidue QuEChERS protocol to minimize matrix effect and improve recoveries for determination of pesticide residues in dried herbs followed by GC-MS/MS. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 709-724. 2018

SANTANA-MAYOR, A. *et al.* Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 116, p. 214-235, 2019.

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

SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S.J. Review of recent developments and applications in low-pressure (vacuum outlet) gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, v. 758, p. 80-92. Estados Unidos, 2013.

SEAPDR (SECRETARIA DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DESENVOLVIMENTO RURAL). **Produção de uvas e produtos vitivinícolas elaborados na safra de 2019**, no Estado do Rio Grande do Sul – resumo geral. [2020?] Disponível em: <https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201906/27173311-sisdevin-dados-da-safra-2019.pdf>. Acesso em 28 jan. 2020.

SIGMA-ALDRICH. Celite® 545. 2021. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigald/22140?lang=pt®ion=BR> Acesso em: 18 fev. 2021.

SIGMA-ALDRICH. Merck. [s.d.]. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html> Acesso em: 18 fev. 2021.

SILVA, C.M.M.S.; MELO, I.S. **Biodegradação de fungicidas benzimidazóis**. *Microbiologia Ambiental*, cap. 6, p. 142. [s.d.] Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Melo_BiodegradacaoFungicidasBenzimidazois_000fdqbaqe302wx5eo0a2ndxyjebw1mn.pdf Acesso em: 16 jan. 2021.

SILVA, V.D., *et al.* Combination of hollow-fiber-supported liquid membrane and dispersive liquid–liquid microextraction as a fast and sensitive technique for the extraction of pesticides from grape juice followed by high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, v. 38, n. 11, p. 1959-1968. Brasil, 2015.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Bookman. Porto Alegre, 2002.

SOUZA, F.S.; SOUZA, E.L.; BORGES, E.M. Determination of pesticides in grape juices by QuEChERS and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 27, n. 9, 1626-1635, 2016.

STACHNIUK, A.; FORMAL, E. Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of pesticide residues in food. *Food Analytical Methods*. v. 9, p. 1654–1665. 2016.

UNICAMP (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS). **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO**. 4. ed. UNICAMP: Campinas, 2011. Disponível em: http://www.cfn.org.br/wp-content/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf. Acesso em: 29 jan. 2020.

UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE. **Pesticide Properties DataBase**. [s.d.] Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/> Acesso em: 29 jan. 2020.

VAILLANT, F. *et al.* Clarification and concentration of melon juice using membrane processes. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 213-220. França, 2005.

VIERA, M.S.; *et al.* Multiresidue determination of pesticides in crop plants by the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method and ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry using a calibration based on a single level standard addition in the sample. **Journal of Chromatography A**, v. 1526, p. 119-127. Brasil, 2017.

WANG, S., *et al.* Chromatographic Methods for Detection and Quantification of Carbendazim in Food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 43. 2020.

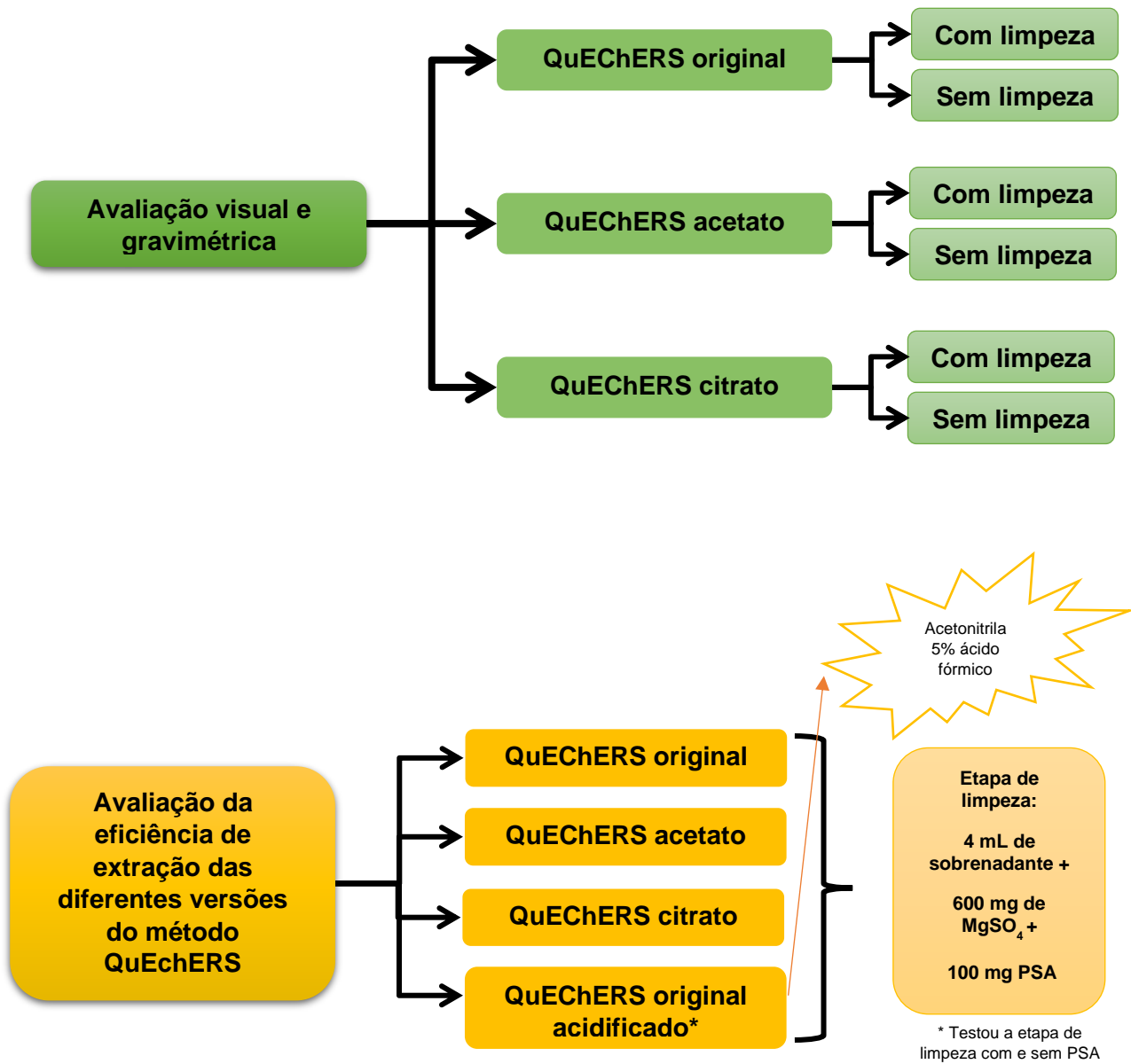
WATERS CORPORATIONS. **Solid-Phase Extraction with Oasis® HLB Sorbent: Simple Procedures for Superior Sample Preparation**. [s.d.] Disponível em: https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/my_oas98.pdf. Acesso em: 13 jan. 2021.

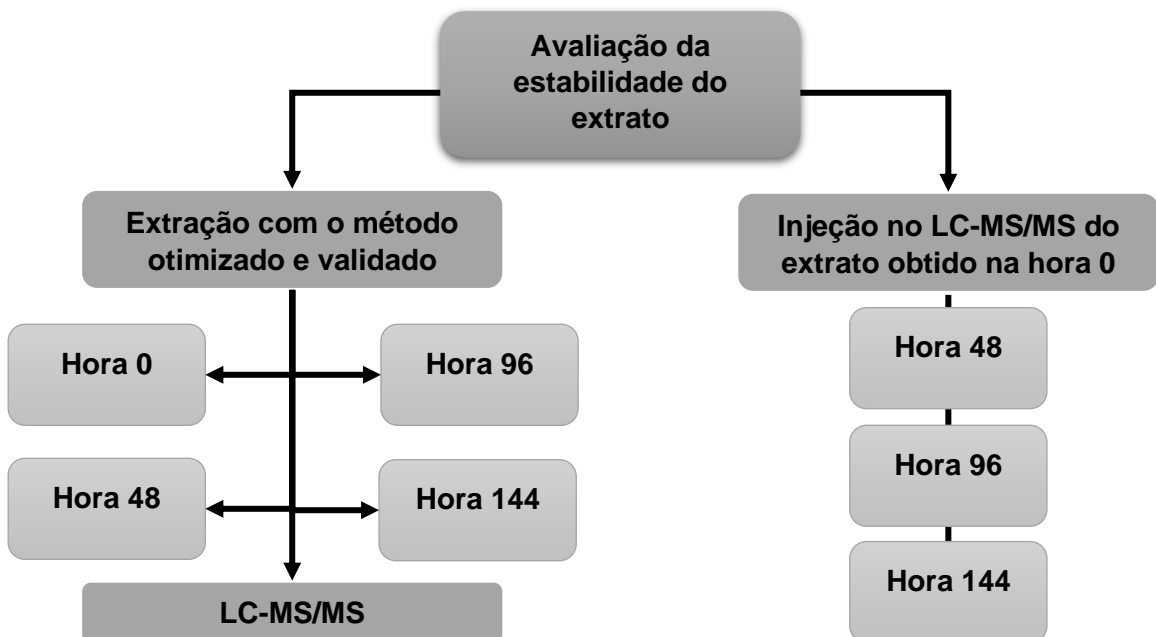
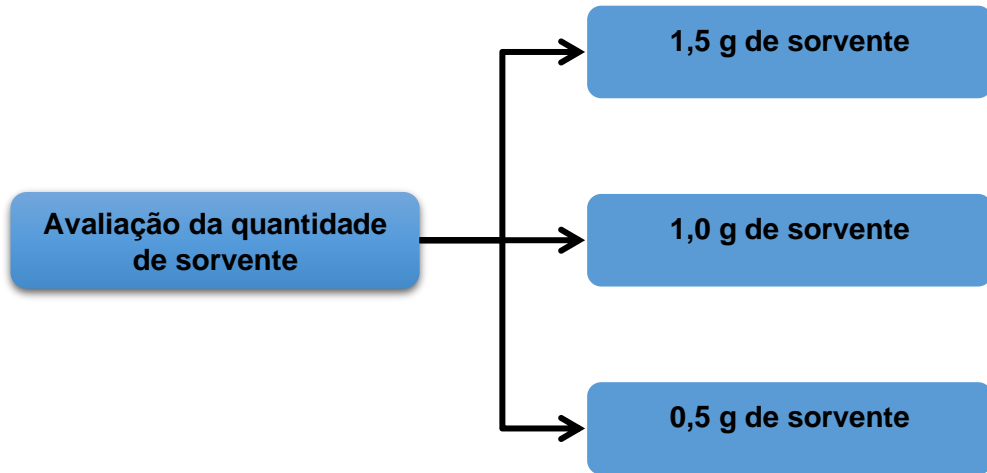
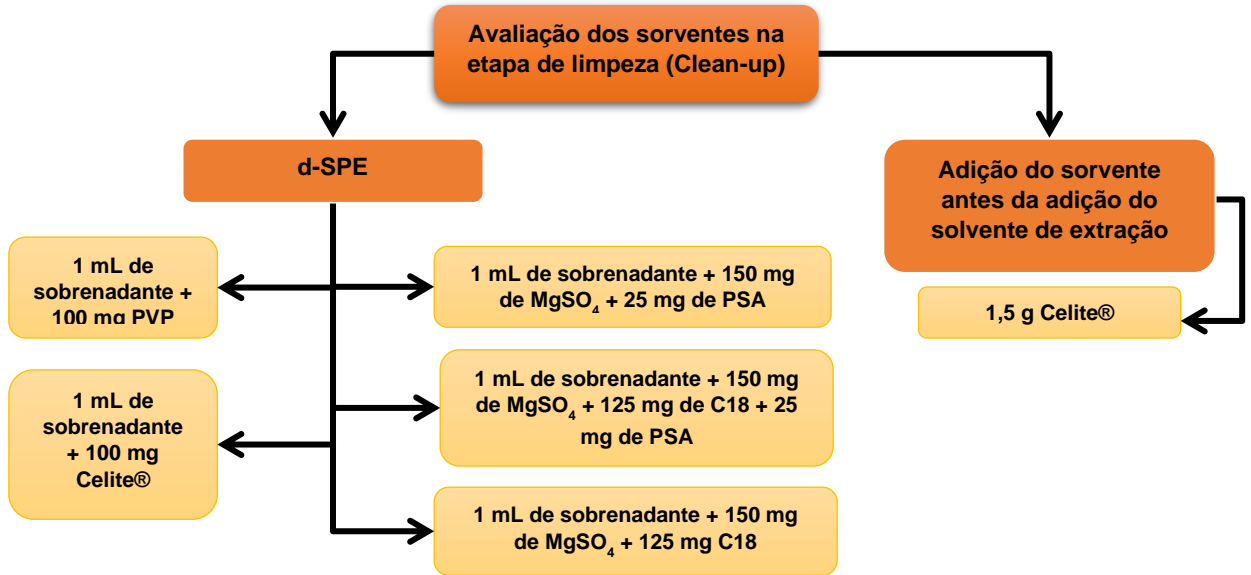
WOŁEJKO, E.; ŁOZOWICKA, B.; KACZYŃSKI, P. Pesticide residues in berries fruits and juices and the potential risk for consumers. **Desalinization & Water Treatment**, v. 52, p. 3804-3818. Polônia, 2014.

YADAV, I.C.; DEVI, N.L. Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. **Environmental science and engineering: Toxicology**. Cap. 7, v. 6, p. 140-158. 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/313445102_Pesticides_Classification_and_Its_Impact_on_Human_and_Environment. Acesso em: 06 fev. 2020.

ANEXOS

ANEXO A – FLUXOGRAMA DOS TESTES REALIZADOS PARA OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRAS





ANEXO B – ILUSTRAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS ACETATO OTIMIZADO NESTE ESTUDO

