

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

**DETERMINAÇÃO DE FUNGICIDAS EM SUCOS DE
LARANJA EMPREGANDO MÉTODO DE EXTRAÇÃO
MINI-LUKE MODIFICADO E UPLC-MS/MS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jaqueline Fabiane Reichert

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

DETERMINAÇÃO DE FUNGICIDAS EM SUCOS DE LARANJA EMPREGANDO MÉTODO DE EXTRAÇÃO MINI-LUKE MODIFICADO E UPLC-MS/MS

Jaqueline Fabiane Reichert

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Carmem Dickow Cardoso

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Reichert, Jaqueline Fabiane
DETERMINAÇÃO DE FUNGICIDAS EM SUCOS DE LARANJA
EMPREGANDO MÉTODO DE EXTRAÇÃO MINI-LUKE MODIFICADO E UPLC-
MS/MS / Jaqueline Fabiane Reichert.-2014.
89 p.; 30cm

Orientador: Carmem Dickow Cardoso
Coorientador: Ionara Regina Pizzutti
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2014

1. Suco de laranja 2. Fungicidas 3. Método mini-Luke
modificado 4. UPLC-MS/MS I. Cardoso, Carmem Dickow II.
Pizzutti, Ionara Regina III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**DETERMINAÇÃO DE FUNGICIDAS EM SUCOS DE LARANJA
EMPREGANDO MÉTODO DE EXTRAÇÃO MINI-LUKE MODIFICADO
E UPLC-MS/MS**

Elaborada por
Jaqueline Fabiane Reichert

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dr^a Carmem Dickow Cardoso (Orientadora)
Universidade Federal de Santa Maria

Dr^a Valquíria Aparecida Polisel Jabor
Universidade de São Paulo

Dr^a Neidi Garcia Penna
Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, 26 de março de 2014.

*Dedico este trabalho à todas as
pessoas que me apoiaram e me
incentivaram durante esta
trajetória, em especial aos meus
pais Alberi e Redir, minha irmã
Karine e ao Luís Fernando, que
estiveram sempre presentes e
nunca me deixaram desistir.
Dedico esta vitória a vocês,
pessoas que amo muito!!!*

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria, pela possibilidade de execução deste trabalho.

A Prof^a. **Carmem Dickow Cardoso**, pela orientação, pelo apoio durante toda execução deste trabalho.

As professoras **Carmem Dickow Cardoso** e **Ionara Regina Pizzutti** pela oportunidade de iniciação científica, que foi de uma grandiosidade ímpar e contribuiu significativamente para minha formação.

À **Rosselei Caiél da Silva** e **Laís Weber Righi** que participaram como banca examinadora da etapa de qualificação deste trabalho, agradeço por terem aceitado o convite e pelas sugestões que certamente contribuíram para este trabalho.

As professoras **Neidi Penna Garcia** e **Valquíria Aparecida Polisel Jabor** pela participação como banca examinadora, pelas valiosas sugestões feitas para o aprimoramento deste trabalho.

A todos colegas e amigos do Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes, pela amizade, incentivo e companheirismo demonstrados durante esta caminhada.

A minha família e a todas as pessoas que sempre estiveram ao meu lado, apoiando, incentivando o que me ajudou a me manter mais forte.

Aos funcionários da UFSM, especialmente ao **Ademir** e a **Valéria** pela atenção de sempre.

A **Capes** pelo apoio financeiro.

“O químico que puder extrair de seu coração os elementos: compaixão, respeito, saudade, paciência, alegria, surpresa e esquecimento, e os juntar em um, pode criar aquele átomo que é chamado AMOR”.

Kahlil Gibran

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

DETERMINAÇÃO DE FUNGICIDAS EM SUCOS DE LARANJA EMPREGANDO MÉTODO DE EXTRAÇÃO MINI-LUKE MODIFICADO E UPLC-MS/MS

Autora: Jaqueline Fabiane Reichert

Orientadora: Carmem Dickow Cardoso

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de março de 2014.

O suco de laranja representa uma contribuição relevante para a economia brasileira, uma vez que, de cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três são produzidos no Brasil. A fim de aumentar a produção de frutas e, conseqüentemente, de sucos, também é verificado um aumento na preocupação quanto à presença de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentares, fazendo-se necessário o monitoramento, através de métodos analíticos para, assim assegurar a saúde do consumidor. Neste estudo, foi validado um método analítico para determinação de nove fungicidas em sucos de laranja natural e processado por UPLC-MS/MS. Para a extração dos fungicidas da matriz, utilizou-se o método denominado mini-Luke modificado. Desenvolvido no ano de 1975, sofreu algumas modificações nos anos posteriores e tem sido utilizado para monitorar a presença de agrotóxicos em matrizes não gordurosas como frutas e vegetais. O método consiste na adição de 30 mL de acetona, seguidos de 60 mL da mistura 1:1 (v/v) de éter de petróleo e diclorometano em 15 g de amostra. Após homogeneização e centrifugação, foi retirada uma alíquota de 1,2 mL do extrato, que após evaporação, foi ressuspendido em 1 mL de metanol acidificado com 0,1% de ácido acético e analisado por UPLC-MS/MS. Os parâmetros avaliados para validação do método foram: curva analítica e linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão (recuperação%), precisão (RSD%) e seletividade (efeito matriz%). Os resultados obtidos foram satisfatórios para todos os parâmetros avaliados, mostrando desta forma, que o método de extração mini-Luke modificado foi eficaz para extrair os fungicidas estudados em sucos de laranja natural e processado. Na faixa de concentração estudada, o método mostrou-se linear. Os valores de LOQ do método foram de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para seis, dois e um fungicidas estudados, respectivamente. Salienta-se que estes valores são iguais ou inferiores aos valores dos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pelas legislações brasileira, americana e européia, indicando que o método pode ser empregado a nível mundial para determinar os nove fungicidas estudados em sucos de laranja. Pode-se afirmar que o método é seletivo, uma vez que este parâmetro foi avaliado a partir do efeito matriz, o qual para a maioria dos fungicidas estudados foi negativo, e todos os valores permaneceram na faixa de -20 e +20%, não influenciando os resultados. Os fungicidas estudados apresentaram valores de recuperação dentro da faixa de 70 a 120% com exceção do tiofanato-metílico e do carbendazim. O tiofanato-metílico apresentou valores abaixo de 70% para os níveis de fortificação de 10 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e o carbendazim, valores acima de 120% para o nível de fortificação de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O método de extração, aliado com a técnica cromatográfica para determinação dos analitos, mostraram-se eficientes para a análise de resíduos de agrotóxicos em sucos de laranja.

Palavras-chaves: Suco de laranja, Fungicidas, Mini-Luke modificado, UPLC-MS/MS.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post Graduate Program in Chemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

FUNGICIDES DETERMINATION IN ORANGE JUICE USING MODIFIED MINI-LUKE EXTRACTION METHOD AND UPLC-MS/MS

Author: Jaqueline Fabiane Reichert

Advisor: Carmem Dickow Cardoso

Date and Place of Defense: Santa Maria, March 26, 2014

Orange juice is a relevant contribution to the Brazilian economy, as long as five glasses of orange juice consumed in the world, three are produced in Brazil. For the purpose of increase the production of fruits and, consequently, juices, there is a growing concern about the presence of pesticide residues in food, so monitoring by analytical methods is required in order to ensure consumer's health. This study shows the validation of an analytical method for the determination of nine fungicides in natural and processed orange juices by UPLC-MS/MS. The extraction procedure used was the modified mini-Luke method. Developed in 1975, it was modified in later years and has been used to monitor the presence of pesticides in non-fatty matrices such as fruits and vegetables. The method consists of adding 30 mL of acetone followed by 60 mL of 1:1 (v/v) mixture of petroleum ether and dichloromethane to 15 g of sample. After homogenization and centrifugation, an aliquot of 1.2 mL was transferred into tubes and evaporation led to a water bath to near dryness. The residue was reconstituted in 1 mL of methanol containing 0.1% acetic acid and analyzed by UPLC-MS/MS. The parameters evaluated for the validation were: calibration curve and linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), accuracy (as recovery%), precision (as RSD %) and selectivity (as matrix effects%). The results were satisfactory for all parameters, thus showing that the modified mini-Luke extraction method was effective to extract the studied fungicides in natural and processed orange juices. In the range of concentration studied, the method was linear. The method LOQ were 10, 20 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for six, two and one fungicides studied, respectively. It is noted that these values are the same or below the values of the maximum residue limits (MRL) established by Brazilian, American and European laws, indicating that the method can be used worldwide to determine the nine fungicides studied in orange juice. It can be inferred that the method is selective, as long as this parameter was assessed from the matrix effects. It was negative for most of the fungicides studied and all values remained in the range -20 to +20%, not influencing the results. The analyzed fungicides, show average recoveries between 70 and 120%, only excepting thiophanate - methyl and carbendazim. The thiophanate-methyl presented values below 70% when spiked at concentrations of 10 and 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and carbendazim presented values above 120% when spiked at concentrations of 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The extraction method, combined with modern chromatographic technique for the determination of analytes, were effective for the analysis of pesticide residues in orange juice.

Keywords: Orange juice. Fungicides. Modified Mini-Luke, UPLC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Origem e distribuição mundial da laranja (NEVES <i>et al.</i> , 2010).....	19
Figura 2 – Gráfico com os períodos de colheita por variedade e percentual de produção (NEVES <i>et al.</i> , 2010).....	23
Figura 3 – Classificação dos agrotóxicos quanto à toxicidade.....	26
Figura 4 – Produtos e subprodutos obtidos a partir de 100 kg de laranja (YAMANAKA, 2005).....	32
Figura 5 – Fluxograma indicando as etapas para o preparo das soluções analíticas.....	47
Figura 6 - Fluxograma do procedimento de extração mini-Luke modificado.....	50
Figura 7 - Cromatogramas de amostra “branco” de suco de laranja <i>in natura</i> , incluindo a intensidade dos sinais analíticos e transições dos íons precursor e produto, os quais demonstram a presença de carbendazim (A) e (B) e a ausência de tiofanato-metílico (C) e (D).....	57
Figura 8 - Gráfico contendo os valores de recuperação (%) obtidos para os 3 níveis de fortificação.....	64
Figura 9 - Gráfico contendo os valores de RSD (%) obtidos para os 3 níveis de fortificação.....	64
Figura 10 - Curvas analíticas preparadas em solvente e no extrato “branco” da matriz para os fungicidas (A) azoxistrobina e (B) tiabendazol.....	66
Figura 11 – Cromatogramas demonstrando as transições para os íons precursor e produto utilizadas para quantificar a azoxistrobina em solvente orgânico (A) e em extrato “branco” da matriz (B) na concentração de 100 ng mL ⁻¹ e as intensidades dos sinais analíticos.....	66
Figura 12 – Cromatogramas demonstrando as transições para os íons precursor e produto utilizadas para quantificar o tiabendazol em solvente orgânico (A) e em extrato “branco” da matriz (B) na concentração de 100 ng mL ⁻¹ e as intensidades dos sinais analíticos.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Evolução anual da área plantada e da quantidade produzida de laranja no Brasil e RS, no período de 2000-2011(Fonte SEPLAG, 2012).	22
Tabela 2- Efeitos toxicológicos dos fungicidas estudados (IUPAC, 2013)	29
Tabela 3- Informações sobre a modalidade de emprego e LMR dos fungicidas em estudo.	44
Tabela 4- Informações sobre a pureza dos MR e solventes usados para o preparo das soluções estoque dos agrotóxicos selecionados, na concentração de 1000 mg L ⁻¹	46
Tabela 5 - Agrotóxicos e seus respectivos íon precursor, tempo de retenção (t _R), voltagem do cone, íon produto e energia de colisão no sistema UPLC-MS/MS nas condições de análise.	55
Tabela 6 - Dados de linearidade para os agrotóxicos estudados, preparados em metanol contendo 0,1% de ácido acético e em extrato “branco” da matriz.	58
Tabela 7 - Valores estimados dos LOD e LOQ, do instrumento e do método, obtidos para os agrotóxicos determinados por UPLC-MS/MS, a partir das concentrações 0,1; 0,2; 0,5; 1,0, 5,0; 20,0 e 100,0 ng mL ⁻¹ em metanol acidificado com 0,1% de ácido acético.	60
Tabela 8 – Valores estimados de LOD e LOQ para o instrumento e para o método e de LOQ real do método, para os agrotóxicos determinados a partir das concentrações 0,1; 0,2; 0,5; 1, 5; 20 e 100 ng mL ⁻¹ em extrato “branco” da matriz.	60
Tabela 9 - Média dos percentuais de recuperação (%) e RSD (%), nos níveis de fortificação de 10, 20 e 50 µg kg ⁻¹ e o LOQ do método.....	61
Tabela 10 - Percentuais obtidos para o efeito matriz calculado em cada nível de concentração da curva analítica.....	68
Tabela 11 – Resultados das amostras de suco de laranja natural obtido a partir das frutas, adquiridas em feira livre de produtos orgânicos.	70
Tabela 12 – Resultados das amostras de suco de laranja natural obtido a partir das frutas, adquiridas em mercado 1.	70
Tabela 13 – Resultados das amostras de suco de laranja natural obtido a partir das frutas, adquiridas em mercado 2.	71
Tabela 14 – Resultados das amostras de suco de laranja concentrado e diluído a partir do concentrado, adquiridos em mercado 3.	71
Tabela 15 – Resultados das amostras de suco de laranja concentrado, diluído a partir do concentrado e integral, adquiridos em mercado 4.	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC – *Association of Official Analytical Chemistry*
CEAGESP – Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo
CEPARC – Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes
CitrusBR – Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos
Conab – Companhia Nacional de Abastecimento
d.i. – Diâmetro interno
d-SPE – Extração em Fase Sólida Dispersiva, do idioma inglês, *Dispersive Solid Phase Extraction*
Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA – Agência de Proteção Ambiental, do idioma inglês, *Environmental Protection Agency*
ESI(+) – Ionização por Eletrobulização no modo positivo, do idioma inglês, *Electrospray Ionization Positive Mode*
EU – União Européia, do idioma inglês, *European Union*
EUA – Estados Unidos da América
FAO – Organização do Alimento e Agricultura, do idioma inglês, *Food and Agriculture Organization*
FAO/FAOSTAT – *Food and Agriculture Organizations / Food and Agriculture Organizations Statistics*
FCOJ – Suco de laranja concentrado e congelado, do idioma inglês, *Frozen Concentrate Orange Juice*
Fundecitrus – Fundo de Defesa da Citricultura
GC - Cromatografia Gasosa, do idioma inglês, *Gas Chromatography*
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LC – Cromatografia Líquida, do idioma inglês, *Liquid Chromatography*
LD₅₀ – Dose Letal mediana, do idioma inglês, *Lethal dose*
LOD – Limite de Detecção, do idioma inglês, *Limit of Detection*
LOD_i – Limite de Quantificação do Instrumento, do idioma inglês, *Instrument Limit of Detection*
LOD_m – Limite de Quantificação do Método, do idioma inglês, *Method Limit of Detection*
LOQ – Limite de Quantificação, do idioma inglês, *Limit of Quantitation*
LOQ_i – Limite de Quantificação do Instrumento, do idioma inglês, *Instrument Limit of Quantification*
LOQ_m – Limite de Quantificação do Método, do idioma inglês, *Method Limit of Quantification*
m/z – Razão massa/carga
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MR – Material de Referência
MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas, do idioma inglês, *Multiple Reaction Monitoring*
MS – Espectrometria de Massas, do idioma inglês, *Mass Spectrometry*

MS/MS – Espectrometria de Massas em Série, do idioma inglês, *Tandem Mass Spectrometry*

P.I. – Padrão Interno

PARA – Programa de Análise de Resíduos e Agrotóxicos em Alimentos

pH – Potencial Hidrogeniônico

PIC – Produção Integrada de Citros

PNCRC – Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

QuEChERS – Rápido, Fácil, Econômico, Efetivo, Robusto e Seguro, do idioma inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

r^2 – Coeficiente de Determinação

RSD – Desvio Padrão Relativo, do idioma inglês, *Relative Standard Deviation*

SANCO – abreviatura, do idioma Francês, *Santé & Consommateurs*

SGQ – Sistema de Gestão de Qualidade

SPE – Extração em Fase Sólida, do idioma inglês, *Solid Phase Extraction*

TOF – Tempo de voo, do idioma inglês, *Time of Flight*

t_R – Tempo de Retenção

UFMS – Universidade Federal de Santa Maria

UPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, do idioma inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatography*

UPLC-MS – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas, do idioma inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*

UPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas em Série, do idioma inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*

USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, do idioma inglês, *United States Department of Agriculture*

v/v – Volume por volume

VWA – Autoridade de Segurança de Produtos Alimentícios e do Consumidor, do idioma inglês, *Food and Consumer Product Safety Authority*

WHO – Organização Mundial da Saúde, do idioma inglês, *World Health Organization*

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Estrutura química, fórmula e massa molecular de cada um dos agrotóxicos utilizados.....	87
APÊNDICE 2 – Avaliação da exatidão do método analítico.....	89

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 <i>Objetivos</i>	18
1.1.1 <i>Objetivos Específicos</i>	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 <i>Laranja</i>	19
2.1.1 <i>Origem da laranja no Brasil</i>	19
2.1.2 <i>Produção mundial de laranja</i>	20
2.1.3 <i>Produção nacional de laranja</i>	21
2.1.4 <i>Fatores que influenciam na produção de laranjas</i>	24
2.1.5 <i>O uso de agrotóxicos</i>	24
2.1.6 <i>Fungicidas</i>	26
2.2 <i>Suco de laranja</i>	30
2.2.1 <i>Tipos de sucos</i>	30
2.2.2 <i>Composição do suco de laranja</i>	31
2.3 <i>Técnicas de preparo de amostras para determinação de agrotóxicos em frutas e sucos de frutas</i>	32
2.4 <i>Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas</i>	34
2.5 <i>Validação de métodos analíticos</i>	35
2.5.1 <i>Curva analítica e linearidade</i>	36
2.5.2 <i>Limite de Detecção</i>	37
2.5.3 <i>Limite de quantificação</i>	37
2.5.4 <i>Exatidão</i>	38
2.5.5 <i>Precisão</i>	39
2.5.6 <i>Seletividade</i>	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 <i>Instrumentação</i>	41
3.2 <i>Materiais</i>	42
3.3 <i>Solventes e reagentes</i>	42
3.4 <i>Gases</i>	43
3.5 <i>Seleção dos agrotóxicos</i>	43

3.6 Seleção do padrão interno.....	45
3.7 Preparo das soluções analíticas	45
3.7.1 Preparo das soluções estoque	45
3.7.2 Preparo das soluções para as curvas analíticas	47
3.8 Obtenção das amostras.....	47
3.9 Obtenção do suco in natura.....	48
3.10 Validação intralaboratorial do método multirresíduo.....	48
3.10.1 Procedimento de extração.....	49
3.10.2 Curva analítica e linearidade	51
3.10.3 Limites de detecção e de quantificação.....	51
3.10.4 Ensaio de fortificação e recuperação.....	52
3.10.5 Efeito matriz.....	53
3.11 Análise cromatográfica	54
3.12 Aplicação do método para amostras reais.....	55
4. Resultados e discussão.....	56
4.1 Avaliação da amostra “branco”.....	56
4.2 Validação intralaboratorial do método multirresíduo	58
4.2.1 Curva analítica e linearidade	58
4.2.2 Limite de detecção e de quantificação.....	59
4.2.3 Ensaio de fortificação e recuperação.....	61
4.2.4 Efeito matriz.....	65
4.2.5 Aplicação do método.....	68
5. CONCLUSÃO	74
6. DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS	76
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	77
8. REFERÊNCIAS.....	78
9. APÊNDICE.....	87

1 INTRODUÇÃO

A produção total brasileira de citros (laranjas, tangerinas, limas ácidas/limões) atingiu, em 2010, a expressiva marca de R\$ 7,1 bilhões, o que faz da citricultura o quinto maior representante do agronegócio brasileiro, perdendo somente para soja, cana-de-açúcar, milho e café (IBGE, 2011).

Desde os primórdios das exportações, a citricultura vem contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento do Brasil, tornando-o não somente o maior produtor de laranjas como também o maior exportador de suco de laranja concentrado do mundo. Este desenvolvimento se deve à alta qualidade da matéria-prima (NEVES *et al.*, 2010).

A fim de alcançar altas produções de laranja e do suco, são empregados agrotóxicos, os quais possuem a função de combater, prevenir ou controlar as pragas que podem vir a prejudicar a cultura e trazer prejuízos ao produtor.

Para controlar a exposição humana aos resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentícias e assegurar a saúde pública, agências reguladoras de vários países tem criado programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos (ANVISA, 2009).

O Brasil tornou-se um dos países que mais empregam agrotóxicos no mundo desde 2008 (KUGLER, 2012), e com o aumento no emprego dos agrotóxicos, as preocupações com os resíduos destas substâncias em alimentos ganham evidência e tornam-se cada vez mais frequentes.

No Brasil, várias iniciativas tem sido implementadas com o intuito de garantir níveis seguros de resíduos de agrotóxicos para a população que consome alimentos provenientes de culturas tratadas com estas substâncias. Dentre estas iniciativas, têm sido executados programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos, principalmente aqueles consumidos *in natura*, com o objetivo de avaliar continuamente os níveis desses resíduos nos produtos e, assim, garantir alimentos seguros à população. Esses programas de monitoramento podem ser estaduais ou de abrangência nacional, como é o caso do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), vinculada ao Ministério da Saúde, e do Programa Nacional de Controle

de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BARIZON *et al.*, 2013).

Para produtos destinados à exportação, como é o caso do suco de laranja, é necessário também o conhecimento das legislações internacionais e a adequação do produto quanto à presença de resíduos de agrotóxicos. No ano de 2012, através da realização de análises químicas foram encontrados traços ($35 \mu\text{g L}^{-1}$) do fungicida carbendazim no suco de laranja brasileiro destinado aos Estados Unidos da América (EUA)(GLOBO, 2012).

Conhecendo as legislações impostas pelo país importador de suco de laranja concentrado, é possível verificar que a entrada do produto no país somente é aceita quando os níveis residuais dos agrotóxicos empregados na cultura estejam na faixa aceita, ou seja, menor ou igual ao LMR estabelecido pela legislação. Como o uso do carbendazim não é permitido pela legislação americana, pode-se dizer que, naquele país, qualquer produto que apresente traços deste fungicida está impróprio para consumo (AUGUSTO, 2012; HOLLOSI *et al.*, 2012).

Conforme estudos realizados, o fungicida carbendazim causa aberrações cromossômicas e alteração endócrina do sistema reprodutivo masculino de ratos (GRAY *et al.*, 1990; NAKAI *et al.*, 2002; MCCARROLL *et al.*, 2002; KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003). A exposição crônica à formulação pode ocasionar disfunções do sistema nervoso central, dano ocular e dermatite, bem como disfunções hepáticas, renais, estomacais, anemia e outras disfunções sanguíneas. Efeitos mutagênicos e carcinogênicos não foram observados em seres humanos. (COUTINHO *et al.*, 2006; IPCS, 1998; BASF, 2006).

A fim de controlar a produção alimentícia tornou-se indispensável o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de determinar quantidades muito pequenas de contaminantes em alimentos, havendo sempre uma busca por métodos com LOD e LOQ cada vez menores.

1.1 Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo principal avaliar a eficiência do método de extração mini-Luke modificado para nove fungicidas em amostras de sucos de laranja, natural e processado. Validar de forma intralaboratorial um método de quantificação simultânea dos fungicidas avaliados (azoxistrobina, carbendazim, difenoconazol, famoxadona, piraclostrobina, tebuconazol, tiabendazol, tiofanato-metílico e trifloxistrobina) em sucos de laranja natural e processado, empregando a técnica analítica de cromatografia líquida de ultra eficiência e detecção por espectrometria de massas (UPLC-MS/MS) e o método mini-Luke modificado.

Sucos de laranja natural (obtido diretamente da fruta), suco concentrado, suco diluído (obtido a partir da diluição do suco concentrado) e integral pasteurizado foram utilizados. Todas as amostras foram adquiridas em mercados localizados na cidade de Santa Maria (RS).

1.1.1 Objetivos Específicos

- Aplicar o método analítico validado para avaliar a qualidade dos sucos de laranja quanto a presença de resíduos dos fungicidas estudados.
- Avaliar a presença dos fungicidas estudados em amostras de suco de laranja natural, provenientes de laranjas obtidas em feira de produtos orgânicos e mercados.
- Avaliar a presença dos fungicidas estudados em sucos processados dos tipos concentrado, diluído e integral pasteurizado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Laranja

2.1.1 Origem da laranja no Brasil

A laranjeira, assim como todas as plantas cítricas, é nativa da Ásia, de onde foi levada, na Idade Média, para o norte da África e em seguida para o sul da Europa, e de lá, trazida para as Américas por volta do ano 1500 (TURRA & GHISI, 2003).

Atualmente, os pomares mais produtivos encontram-se nas regiões de clima tropical e subtropical, destacando-se como grandes produtores de citros o Brasil, os EUA, a Espanha, os países do Mediterrâneo, o México, a China e a África do Sul (Figura 1) (TURRA & GHISI, 2003).

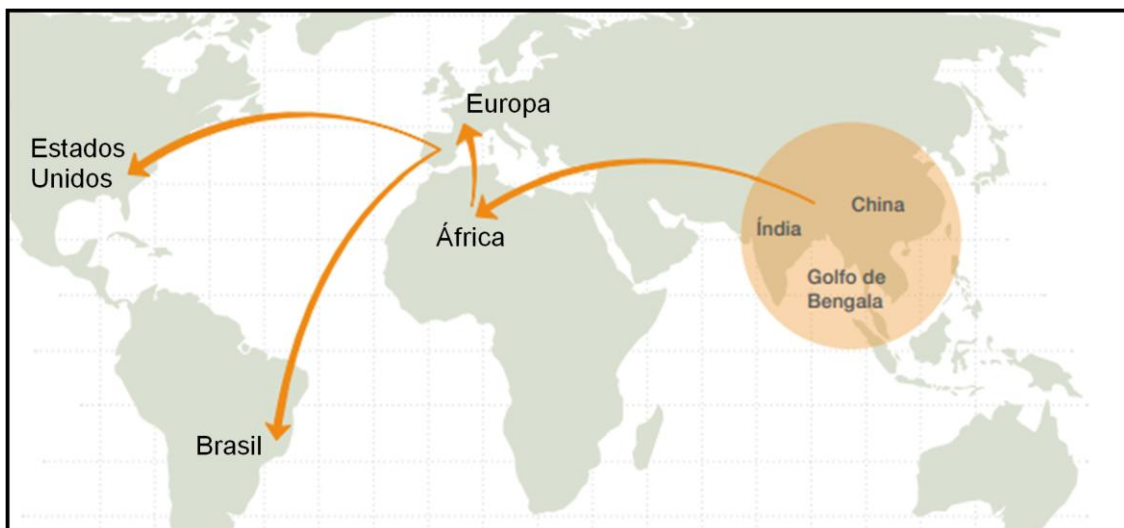


Figura 1 – Origem e distribuição mundial da laranja (NEVES *et al.*, 2010).

As mudas e as técnicas de cultivo da laranja foram trazidas da Espanha para o Brasil pelos portugueses, entre os anos de 1530 e 1540, para suprir a necessidade de vitamina C (ácido ascórbico) das tripulações dizimadas pelo escorbuto na época do descobrimento e da colonização da América Latina (NEVES *et al.*, 2010).

Após a proclamação da República, em 1889, o principal produto agrícola do Brasil era o café, cuja produção encontrava-se concentrada principalmente no interior do Estado de São Paulo. Neste período, a laranja era produzida na mesma região, porém apenas como uma cultura alternativa. Somente mais tarde, com a crise do café, é que a citricultura ganhou um espaço maior, e em 1910 ocorreu o início das exportações da laranja. Com o investimento de produtores no desenvolvimento de tecnologias de produção citrícola, a laranja se tornou um dos dez produtos mais importantes na exportação do país, em 1939 (NEVES *et al.*, 2010).

2.1.2 Produção mundial de laranja

A produção de citros no mundo está dispersa em vários países e continentes, mas há uma especialização geográfica na produção e na comercialização.

Os dados publicados pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) revelam que os países do continente americano (Brasil, EUA e Argentina) são dominantes na produção e comercialização de sucos cítricos, enquanto que os países do Mediterrâneo são mais especializados na produção e comercialização de frutas cítricas *in natura*, especialmente laranjas doces e tangerinas. Já na produção de limas ácidas, o Brasil e o México são os líderes tanto de produção quanto de exportação (ALMEIDA & PASSOS, 2011).

Nas últimas três décadas, a produção mundial de frutas cítricas aumentou em resposta à demanda global por sucos e frutas *in natura*, especialmente nos países desenvolvidos. A evolução dos meios de comunicação, transporte e embalagens contribuíram para dinamizar o comércio a longas distâncias, beneficiando diretamente o setor de perecíveis, tais como o das frutas *in natura* (ALMEIDA & PASSOS, 2011).

Na safra de 2009-2010, o Brasil liderou a posição mundial na produção de laranja e manteve a mesma colocação no ano de 2011, quando foi responsável por 81,3%, sendo que, no mesmo ano os EUA foram responsáveis por 8,2% e os demais países por 10,5% da exportação mundial de sucos de laranja. (DEPEC-BRADESCO, 2013). Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de laranja, seguido pelos EUA e China (ZULIAN *et al.*, 2013), conforme a *Food and Agriculture Organizations/ Food and Agriculture Organizations Statistics* (FAO/FAOSTAT).

Conforme dados publicados pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), estima-se que 85% das laranjas da safra de 2013-2014 serão destinadas às indústrias processadoras de suco e 15% terão como destino o mercado de frutas *in natura* (CONAB, 2013).

O fato de o Brasil ser o maior exportador mundial de suco de laranja está relacionado com a produção em larga escala e na sua estrutura logística estratégica. Navios são construídos especialmente para o transporte de suco de laranja, com tecnologia específica para que as propriedades físico-químicas e sensoriais do produto sejam mantidas, transportando-o dos portos brasileiros aos terminais próprios das indústrias espalhados pelo mundo. Além do Brasil, são mais de dez terminais em portos nos EUA, Bélgica, Holanda, Japão e Austrália (EMBRAPA, 2013).

2.1.3 Produção nacional de laranja

O Estado do Rio Grande do Sul (RS) é o sexto produtor brasileiro de laranja com uma produção média de 370.592 toneladas no período de 2009 a 2011, o que corresponde a 1,9% da produção nacional. Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), desde a década de 1990, a cultura de citros tem se expandido especialmente no Médio Alto Uruguai e na Campanha Gaúcha (SEPLAG, 2012).

A Tabela 1 relaciona a área plantada e a quantidade produzida de laranja no Brasil e no estado do RS. Comparando as áreas plantadas nos anos de 2010 e 2011, percebe-se que apesar de no ano de 2011 a área plantada no RS ter diminuído, a produção do fruto aumentou (SEPLAG, 2012).

Altas produtividades e boa qualidade dos frutos de laranja dependem de práticas culturais, que devem ser realizadas periodicamente no pomar com a finalidade de mantê-lo em condições adequadas (EMBRAPA, 2013).

Tabela 1 – Evolução anual da área plantada e da quantidade produzida de laranja no Brasil e RS, no período de 2000-2011(Fonte SEPLAG, 2012).

Ano	Brasil		Rio Grande do Sul	
	Área plantada (Hectares)	Quantidade produzida (t)	Área plantada (Hectares)	Quantidade produzida (t)
2000*	856.422	106.651.289	27.352	2.008.949
2001	824.693	16.983.436	26.869	345.723
2002	828.843	18.530.582	26.960	346.042
2003	836.041	16.917.558	27.019	354.700
2004	823.220	18.313.717	27.197	356.398
2005	805.665	17.853.443	27.217	311.745
2006	805.903	18.032.313	27.476	339.765
2007	821.244	18.684.985	27.023	347.140
2008	836.602	18.538.084	25.788	335.266
2009	787.250	17.618.450	27.162	350.650
2010	792.753	18.503.139	27.764	369.435
2011	817.292	19.811.064	27.654	391.692

*Até o ano 2000 as quantidades produzidas eram expressas em mil frutos, com exceção da banana, para a qual era utilizado mil cachos. A partir do ano de 2001 as quantidades passaram a ser expressas em toneladas.

No Brasil há uma diversificação de variedades de laranja ao longo do ano (Figura 2), o que apresenta grande importância, uma vez que evita o excesso da oferta do fruto em determinadas épocas do ano e faz com que não falte matéria-prima para a produção de suco de laranja, em outras épocas (NEVES *et al.*, 2010).

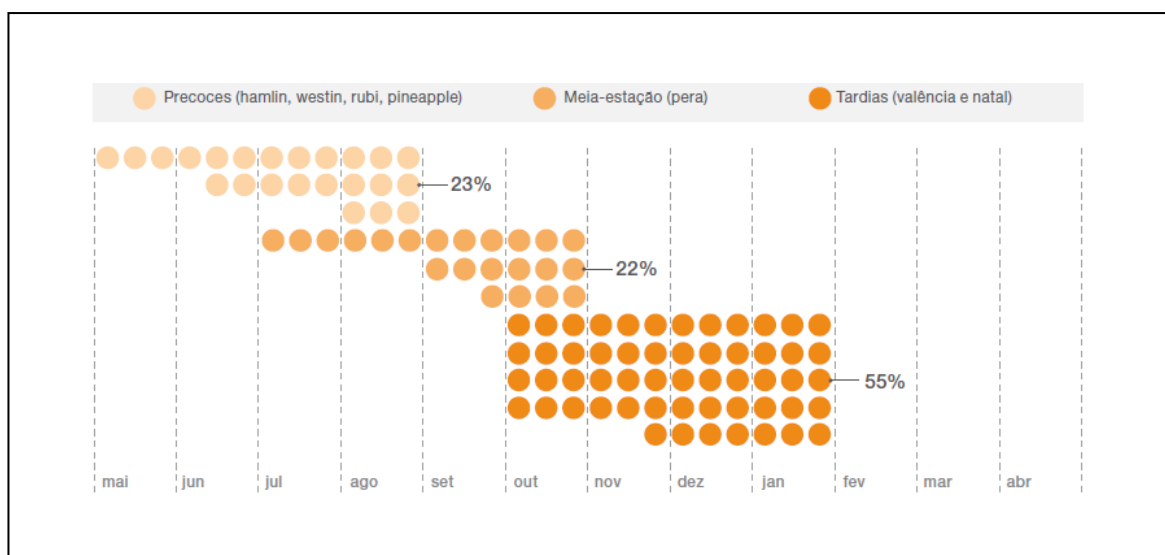


Figura 2 – Gráfico com os períodos de colheita por variedade e percentual de produção (NEVES *et al.*, 2010).

As variedades Pera, Valência, Hamlin, Natal, Folha murcha, Valência Americana e Westin tem como principal destino a indústria de sucos, exceto a variedade Pera, que além de ser utilizada na produção de sucos, parte da produção é absorvida pelo mercado interno de frutas *in natura*. O Norte do Estado de São Paulo é a região mais importante na produção de laranja, e historicamente formou-se o chamado cinturão citrícola, que abrange as macrorregiões: Centro, Sul, Norte e Castelo, com destaque para as cidades de Bebedouro e Matão. Cerca de 86% das laranjas produzidas nestas regiões são destinadas à indústria (ZAMBOLIM *et al.*, 2008; EMBRAPA, 2013).

Para manter a liderança do setor, o MAPA investe no apoio a adoção de sistemas mais eficientes, como a produção integrada, com medidas para reduzir os custos, aperfeiçoamento e ampliação da comercialização do produto. O ministério tem, ainda, ação efetiva na fiscalização e prevenção ao aparecimento de pragas e doenças (MAPA, 2012).

Os maiores problemas que os principais Estados produtores de laranja enfrentam são de ordem fitossanitária (doenças como o cancro cítrico, a clorose variegada dos citros e o *greening*) e cotações baixas para as frutas destinadas à indústria (IBGE, 2013).

2.1.4 Fatores que influenciam na produção de laranjas

São vários os fatores que influenciam no tamanho da safra de laranja. Estes fatores podem ser divididos em fatores climáticos, fitossanitários, econômicos, tecnológicos e infraestrutura logística.

A ocorrência de precipitação bem distribuída nas fases de florescimento até a colheita, geadas ou temperaturas muito baixas (abaixo de 15°C) e a falta de controle de doenças devastadoras, como o cancro cítrico, causada por bactéria, e a pinta preta, causada por fungo, podem levar à perda de toda a produção. Os custos de produção e a regulação dos preços pagos pela caixa de laranja, a infraestrutura e o grau tecnológico, plantios adensados, manejo correto da adubação, monitoramento de doenças, utilização de irrigação, entre outras práticas culturais, favorecem o aumento da produtividade e, conseqüentemente, o aumento da produção (EMBRAPA, 2013).

O uso de agrotóxicos na cadeia produtiva das frutas constitui um fator-chave na produção agrícola e na pós-colheita, todavia, o uso inadequado de tais produtos ainda persiste no país, podendo colocar em risco a saúde do consumidor, do trabalhador e do meio ambiente (BUAINAIN & BATALHA, 2007).

Os maiores problemas na citricultura são a inexistência de produtos registrados no Ministério da Agricultura para o uso em diversas frutas, o que dificulta a aplicação correta do receituário agrônomo, favorece a aplicação descontrolada de agrotóxicos e a falta de controle e de fiscalização de resíduos nas frutas. A não utilização de equipamentos de segurança nas pulverizações e o descarte incorreto das embalagens também devem ser assinalados como problemas a serem resolvidos (BUAINAIN & BATALHA, 2007).

2.1.5 O uso de agrotóxicos

O processo produtivo agrícola brasileiro está cada vez mais dependente dos agrotóxicos e fertilizantes químicos. A lei dos agrotóxicos e o decreto que regulamenta esta lei definem essas substâncias como:

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 (BRASIL, 2002).

Na safra de 2011, foram plantados, no Brasil, 71 milhões de hectares de lavoura temporária (soja, milho, cana-de-açúcar, algodão) e permanente (café, cítricos, frutas, eucaliptos), o que corresponde a cerca de 853 milhões de litros (produtos formulados) de agrotóxicos pulverizados nessas lavouras, principalmente de herbicidas, fungicidas e inseticidas. Isso representa uma média de uso de 12 litros/hectare e exposição média ambiental/ocupacional/alimentar de 4,5 litros de agrotóxicos por habitante (CRUZ *et al.* 2013 apud IBGE, 2012; SINDAG, 2011). Para a cultura de citros, o consumo médio de agrotóxicos (herbicidas, inseticidas e fungicidas) foi de 23 litros/hectare, na safra de 2011 (CARNEIRO *et al.*, 2012).

Os agrotóxicos possuem um papel fundamental na preservação dos alimentos contra o ataque de pragas e são empregados em diferentes estágios do cultivo, ou seja, durante o crescimento, pré-colheita, pós-colheita, armazenamento e transporte dos produtos. Por outro lado, em contato com o solo e recursos hídricos, os agrotóxicos podem contaminar o meio ambiente, podendo ainda serem transferidos para a cadeia alimentar (TOLEDO, 2008).

Os agrotóxicos podem ser classificados quanto à sua ação como inseticidas, fungicidas, herbicidas, raticidas, acaricidas, e quanto ao grupo químico, podem pertencer aos organoclorados, organofosforados, carbamatos, ditiocarbamatos e piretróides (TOLEDO, 2008).

De acordo com estudos realizados, 45% do total dos agrotóxicos comercializados correspondem à categoria dos herbicidas, os fungicidas e os inseticidas correspondem a 14 e 12% do mercado nacional, respectivamente, e as demais categorias de agrotóxicos a 29% (ANVISA, 2012).

Ainda do ponto de vista toxicológico, os agrotóxicos podem ser classificados em extremamente, altamente, moderadamente ou pouco tóxicos (Figura 3), de acordo com a dose letal (LD₅₀) oral e dérmica para ratos (TOLEDO, 2008).

Classe	Toxicidade	Cor indicada na embalagem
I	Extremamente tóxico	Faixa Vermelha
II	Altamente tóxico	Faixa Amarela
III	Moderadamente tóxico	Faixa Azul
IV	Pouco tóxico	Faixa Verde

Figura 3 – Classificação dos agrotóxicos quanto à toxicidade.

A capacidade de um agrotóxico persistir por certo período de tempo pode ser desejável e tem sido reconhecido como importante em algumas situações, para o controle bem sucedido de pestes e doenças. Todavia, a presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos e no meio ambiente preocupa o consumidor e as autoridades competentes, já que pode oferecer riscos para a saúde humana e ao meio ambiente (TOLEDO, 2008).

O controle de resíduos de agrotóxicos em alimentos é necessário, tanto para a proteção direta do consumidor como em relação à aceitabilidade da mercadoria pelo mesmo. Seus resultados podem ser usados para introduzir medidas corretivas de prevenção de risco à saúde (TOLEDO, 2008).

As dificuldades para a produção agrícola relacionada com restrição ao uso de certos agrotóxicos autorizados, e o impacto de utilização desses produtos no consumo e nas estratégias de monitoramento de resíduos de agrotóxicos, são objeto de constante preocupação pelos diversos setores envolvidos na fruticultura (BUAINAIN & BATALHA, 2007).

2.1.6 Fungicidas

Os fungicidas são substâncias químicas empregadas no controle de doenças de plantas causadas por fungos, bactérias ou algas. Alguns produtos químicos não matam os fungos mas inibem o seu crescimento temporariamente. Tais produtos são chamados de fungistáticos. Alguns produtos químicos inibem a produção de esporos sem afetar o crescimento das hifas no interior dos tecidos e, neste caso, são

chamados antiesporulantes. Bactericidas e antibióticos com ação fungicida estão, implicitamente, incluídos no conceito (JULIATTI, 2005).

As plantas cítricas podem ser afetadas por diferentes agentes fitopatogênicos, sendo que, nos últimos anos, as doenças que mais se destacaram quanto à limitação da produção de citros no Estado de SP foram a pinta preta, o *huanglongbing* ou *greening*, o cancro cítrico, a clorose variegada e a podridão floral dos citros (SILVA, 2013).

Dentre os fungicidas orgânicos com ação sistêmica no interior da planta, os compostos benzimidazólicos são os mais conhecidos, e, talvez os mais utilizados, devido a sua propriedade e eficácia no controle de fitopatógenos de importância econômica. Os fungicidas sistêmicos desse grupo, como o benomil, o tiofanato-metílico, o tiabendazol e o carbendazim se caracterizam por uma alta seletividade, atuando em poucos processos do metabolismo dos fungos (SILVA & MELO, 1997).

Dentre os fungicidas registrados para o uso em citros, com ação contra *Guignardia citricarpa kiely*, fungo causador da doença pinta preta dos citros, encontram-se os protetores ou de contato, como os compostos a base de cobre (sulfato de cobre, hidróxido de cobre, oxicloreto de cobre e óxido cuproso) e os ditiocarbamatos (mancozeb e propineb), e com ação sistêmica, do grupo dos benzimidazóis (carbendazim e tiofanato-metílico) e das estrobilurinas (piraclostrobina, azoxistrobina, trifloxistrobina). Porém, os fungicidas benzimidazóis podem ser utilizados somente em pomares cuja produção será destinada para o mercado interno, devido às restrições do uso em citros cuja produção será destinada ao processamento e produção de suco para a exportação (VINHAS, 2011).

A pinta preta dos citros caracteriza-se através do aparecimento de lesões na casca de frutos de laranjas doces, limões, tangerinas e seus híbridos, o que os torna depreciados para o mercado de fruta *in natura*. Quando o ataque é severo, é possível observar lesões também nas ramas e folhas. Os diferentes tipos de lesões causados pela doença ficam restritos ao flavedo (parte colorida e mais externa da casca da laranja) e não afetam a qualidade interna dos frutos, porém podem causar a queda prematura da fruta, o que reduz consideravelmente a produção (SPÓSITO, 2003).

Em 2012, o Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) orientou os citricultores a suspenderem o uso dos fungicidas carbendazim e tiofanato-metílico, usados principalmente para o combate das doenças pinta preta e podridão floral,

substituindo-os por outros agrotóxicos, como aqueles à base de cobre e as estrobilurinas, além de reforçar as medidas de manejo do pomar (NOTÍCIAS AGRÍCOLAS, 2012).

Os benzimidazóis e conazóis são amplamente utilizados no campo como fungicidas pós-colheita, em particular, o tiabendazol, o carbendazim, o tiofanato-metílico, o imazalil e o procloraz são os compostos mais utilizados para prevenir doenças em frutas cítricas. Muitas vezes, uma prática industrial é usá-los por lavagem ou pulverização, para prevenir a contaminação pelo esporo do fungo após a colheita (DREASSI *et al.*, 2010). No Brasil, os benzimidazóis, além de serem aplicados na produção de citros, também são aplicados em culturas como algodão, feijão, soja, trigo e em grande variedade de frutas e vegetais.

O fungicida benomil não é permitido no Brasil, no entanto este composto é rapidamente convertido à carbendazim e apresenta um curto intervalo de tempo de meia-vida de 2 e 19 horas em água e solo, respectivamente (SÁNCHEZ-RASERO *et al.*, 1991; SINGH & CHIBA, 1993; SANDAHL *et al.*, 2000), por isso a legislação estabelece que o LMR para o benomil seja expresso em carbendazim, já que este apresenta uma maior estabilidade.

O tiofanato-metílico não pertence à classe dos agrotóxicos benzimidazóis, porém também é incluído neste grupo, pelo fato de ser convertido à carbendazim em condições naturais e artificiais, e os resultados das análises são expressos em carbendazim (HIEMSTRA *et al.*, 1995).

É extremamente importante ter conhecimento a respeito da qualidade dos produtos que chegam à mesa do consumidor. Na Tabela 2, encontram-se algumas informações quanto a toxicidade dos fungicidas estudados neste trabalho.

Tabela 2- Efeitos toxicológicos dos fungicidas estudados (IUPAC, 2013) .

Agrotóxico	Carcinogênico	Mutagênico	Desregulador endócrino	Efeitos no sistema reprodutor	Efeitos no sistema respiratório	Irritação dérmica
Azoxistrobina	X	-	-	?	-	?
Carbendazim	?	-	?	✓	X	✓
Difenoconazol	?	-	-	✓	X	X
Famoxadona	X	-	-	?	-	✓
Piraclostrobina	X	-	-	?	X	✓
Tebuconazol	?	-	-	?	X	✓
Tiabendazol	?	X	-	✓	?	X
Tiofanato-metílico	?	✓	-	?	✓	?
Trifloxistrobina	X	-	-	✓	-	✓

X: Não causa

✓: Causa

?: Possibilidade de causar

-: Não há dados suficientes

2.2 Suco de laranja

2.2.1 Tipos de sucos

Na indústria de sucos de frutas, a produção e a comercialização desses produtos depende das características exigidas pelo mercado consumidor para cada um dos diferentes tipos de suco. Entre as características pré-estabelecidas, estão a cor, o nível de turbidez, os níveis de açúcar e a acidez, os nutrientes presentes e o perfil de sabor. A empresa que pretende exportar seu produto deve levar em consideração as exigências e a legislação do país que irá consumir esse produto (EMBRAPA, 2003).

Conforme EMBRAPA (2003), os principais produtos hoje comercializados a partir de frutas são:

- **Suco de frutas:** líquido límpido ou turvo extraído da fruta por meio de processo tecnológico adequado, não fermentado, de cor, sabor e aroma característicos, submetido a tratamento que assegure a apresentação e conservação até o momento do consumo.
- **Suco integral fresco:** tratado por meio de técnica adequada que garanta a estabilização. A designação integral é somente válida para sucos sem adição de açúcar e na sua concentração natural.
- **Suco conservado:** suco integral adicionado de agente conservador químico. Estes conservantes são agentes fungistáticos ou bacteriostáticos com ação inibidora da proliferação microbiana, sendo os conservantes mais utilizados o ácido benzóico e benzoato de sódio (nível máximo estabelecido de 0,01%). O acidulante mais utilizado é o ácido cítrico e o antioxidante mais empregado é o ácido ascórbico, sendo que, em polpas e sucos de frutas e refrescos, o teor máximo é de 0,03%.
- **Suco concentrado:** suco do qual é retirado até 50% da água de constituição do suco natural.

- **Suco desidratado:** suco no estado sólido, obtido pela desidratação do suco integral. Deve conter a expressão “suco desidratado” na embalagem.
- **Néctar:** produto não fermentado, obtido pela dissolução da polpa da fruta integral em água, adicionado de açúcar (sacarose, glicose/frutose), acidulantes ou conservantes.
- **Refresco:** bebida gaseificada, não fermentada, obtida pela diluição do suco de fruta, polpa ou extrato vegetal de sua origem em água potável, adicionada de açúcares, porém, sem adição de aditivos ou conservantes.
- **Suco composto ou Blend:** obtido a partir da mistura de diferentes tipos de sucos como laranja, mamão, abacaxi e maracujá.

2.2.2 Composição do suco de laranja

O suco de laranja é constituído de uma mistura aquosa de vários componentes orgânicos, voláteis e instáveis, responsáveis pelo seu sabor e aroma, além dos açúcares, ácidos, sais minerais, vitaminas e pigmentos. Contudo, sob o ponto de vista nutricional, o suco de laranja é considerado uma excelente fonte de carotenóides e vitamina C (FRANCO, 1992).

A qualidade do suco de laranja é dependente de vários fatores como, microbiológicos, enzimáticos, químicos e físicos que podem comprometer as características sensoriais e nutricionais do produto (NETO & FARIA, 1999).

O processo de obtenção do suco de laranja concentrado congelado (FCOJ), consiste em uma série de operações industriais de grande escala e, além do suco também são obtidos vários subprodutos da laranja. A Figura 4 ilustra o rendimento teórico de produtos e subprodutos obtidos a partir de 100 kg de laranjas (YAMANAKA, 2005).

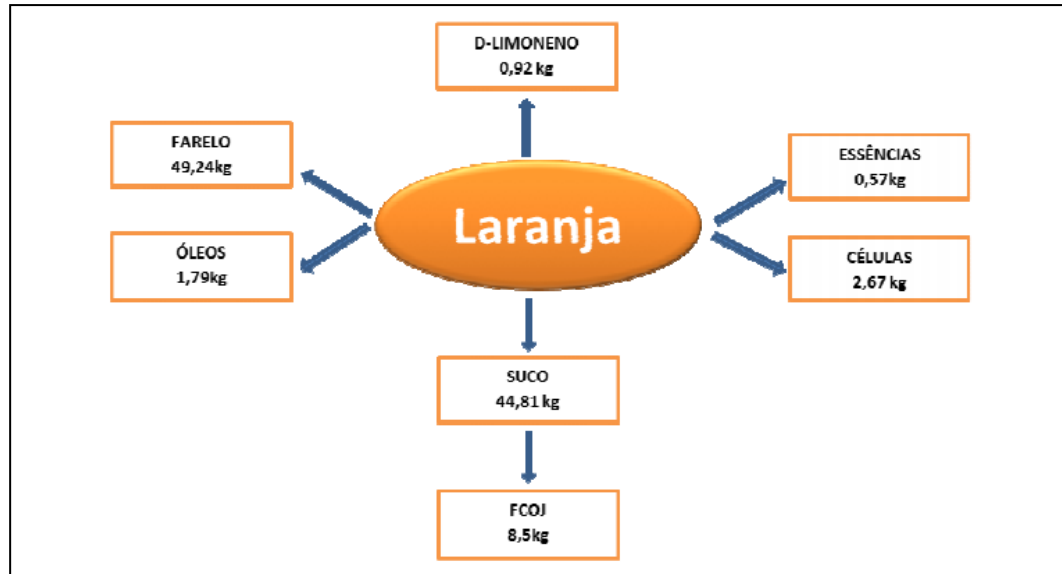


Figura 4 – Produtos¹ e subprodutos obtidos a partir de 100 kg de laranja (YAMANAKA, 2005).

2.3 Técnicas de preparo de amostras para determinação de agrotóxicos em frutas e sucos de frutas

Hiemstra & De Kok (2007), trabalharam no desenvolvimento de dois métodos analíticos (A e B), para determinar agrotóxicos e seus metabólitos nas matrizes de alface, laranja, maçã, repolho, uva e farinha de trigo, sendo um aplicado para análises de rotina (A) e outro para aqueles agrotóxicos que apresentaram recuperações inferiores a 70% quando extraídos pelo método A. Para a separação analítica, utilizaram UPLC-MS/MS e obtiveram valores de LOQ igual a $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ para todos os agrotóxicos e metabólitos estudados.

A presença de resíduos de agrotóxicos em bebidas à base de frutas em mercados europeus e marroquinos foi estudada por GILBERT-LÓPEZ *et al.* (2007). Os agrotóxicos foram extraídos das matrizes utilizando o procedimento de extração em fase sólida (SPE) com cartuchos do tipo *Oasis HLB*. A separação foi realizada com o emprego de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas com analisador de massa do tipo tempo de voo (UPLC-TOF-MS) e os valores do LOD obtidos, foram na faixa de $0,08$ a $0,45 \mu\text{g L}^{-1}$.

¹ Farelo = ração animal; Essências = Fase aquosa e fase oleosa; Células = Polpa.

ROMERO-GONZÁLEZ *et al.* (2008), desenvolveram e validaram um método analítico para determinação de 90 agrotóxicos em sucos de frutas empregando UPLC-MS/MS e compararam os resultados provenientes de dois métodos de extração diferentes: procedimento QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) tamponado sem etapa de purificação e SPE. Os valores obtidos para o LOQ foram inferiores a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ para todos os casos.

FERNÁNDEZ *et al.* (2009), desenvolveram um método para análise de agrotóxicos multirresíduo em frutas cítricas por UPLC-MS/MS. Para a extração dos analitos, utilizaram acetato de etila. Os valores de LOQ foram menores ou iguais a $0,01 \mu\text{g kg}^{-1}$, além disso, o estudo foi focado na estabilidade dos agrotóxicos na matriz de extrato de laranja. O método foi aplicado para análise de 365 amostras, sendo que destas, 103 amostras apresentaram resultados positivos para os agrotóxicos estudados e níveis de carbendazim acima do LMR.

Um método analítico multirresíduo para determinar 54 agrotóxicos em pimentão, tomate, laranja e limão foi utilizado por FENOLL *et al.* (2010). O procedimento QuEChERS foi empregado para a extração dos analitos e, posteriormente, os extratos foram analisados por UPLC-MS/MS. Os valores de LOD para os agrotóxicos estudados variaram de $0,1$ à $12,1 \mu\text{g kg}^{-1}$.

DREASSI *et al.* (2010), desenvolveram um método empregando UPLC-MS/MS para análise de tiabendazol, carbendazim, tiofanato-metílico, imazalil e procloraz em sucos de frutas comerciais. Os agrotóxicos foram extraídos com acetato de etila e o extrato final foi analisado por UPLC-MS/MS. Os valores de LOQ foram de $0,01$ e $0,06 \mu\text{g kg}^{-1}$ para imazalil e carbendazim, respectivamente.

FERRER *et al.* (2011), desenvolveram um método analítico para determinar 53 analitos em 13 tipos de sucos de frutas industrializados (laranja, abacaxi, pêsego, maçã, multifruta, manga, morango, tomate, pera, tangerina, banana e uva) por injeção direta no UPLC-MS/MS. O preparo da amostra consistiu em centrifugar uma alíquota do suco e diluir dez vezes antes da análise. O LOQ para a maioria dos agrotóxicos foi $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tendo em vista os trabalhos desenvolvidos nos últimos anos, percebe-se que as técnicas analíticas empregadas apresentam elevado nível tecnológico, bem como rapidez na etapa de preparo de amostra. Além de desenvolver métodos capazes de determinar vários analitos simultaneamente, também é desejável que estes métodos quantifiquem níveis de resíduos cada vez menores em matrizes complexas, como a

de alimentos, a fim de investigar a qualidade dos produtos naturais e processados que chegam à mesa do consumidor.

2.4 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

Houve um grande progresso quanto aos métodos de análise de agrotóxicos nos últimos anos, principalmente devido a evolução dos instrumentos cromatográficos. Atualmente, a área de química analítica exige a implementação de métodos e instrumentação mais sofisticados para acompanhar as mudanças nas técnicas de separação. A combinação de técnicas cromatográficas, tal como a cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por espectrometria de massas (MS) é essencial para a análise de agrotóxicos e cumpre os requisitos das diferentes legislações para sua quantificação (FERNANDES *et al.*, 2011; SANCO, 2013).

Utilizada há mais de um século, a cromatografia líquida (LC) é uma técnica analítica de separação de compostos muito bem estabelecida, podendo identificar e quantificar compostos em uma amostra. A grande aplicabilidade da técnica é atribuída a sua sensibilidade, capacidade de quantificação e de separação de moléculas não voláteis e termicamente frágeis, que constituem 80% dos compostos sintéticos e naturais (PIZZUTTI, 2006).

A ação dos espectrômetros de massas inicia pela ionização dos átomos ou moléculas, seguido pela escolha e posterior detecção dos íons de acordo com suas razões massa/carga (m/z). Os componentes-chaves nesse processo são a fonte de íons, para gerar os íons e o analisador de massas para os escolher. Para a determinação da massa, os íons devem passar através de um analisador de massas e migrar para o detector. Nesse ponto, os íons estão em uma fase gasosa, e o espectrômetro de massas é operado sob pressão reduzida e desta maneira os íons podem ser direcionados para o detector sem restrições. Vários tipos de fontes de íons são comumente utilizadas para LC-MS e cada uma é apropriada para uma determinada classe de compostos. Também há vários tipos de analisadores de massas, que apresentam vantagens e desvantagens dependendo do tipo de informação a ser obtida (PIZZUTTI, 2006).

As análises realizadas por cromatografia gasosa (GC) são apropriadas somente se os compostos forem voláteis e termicamente estáveis. Entretanto, muitos compostos não apresentam estas características, além de serem muito polares. Porém, esses compostos podem ser separados com sucesso através da técnica de LC, e o grande desenvolvimento ocorrido da implementação das interfaces tornou a LC-MS mais popular.

2.5 Validação de métodos analíticos

O desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis, seletivos e reprodutíveis tem sido sempre um pré-requisito para a obtenção de dados de alta qualidade em programas de fiscalização e monitoramento. Nos dias atuais, outras características dos métodos quantitativos são requeridas, tais como o uso de pequenas quantidades de amostra e reagentes, abordagens mais sustentáveis, uso de solventes e reagentes que causam menos danos aos analistas, métodos mais rápidos e menos trabalhosos (PIZZUTTI *et al.*, 2009).

A validação de um método analítico é um processo capaz de provar que um procedimento analítico é adequado para sua finalidade e os resultados obtidos a partir do método de estudo de validação podem ser usados para julgar a qualidade, confiabilidade e consistência dos resultados analíticos (RIBANI *et al.*, 2004; KAZUSAKI *et al.*, 2012).

A adequação ao uso de métodos analíticos aplicados a ensaios rotineiros é geralmente avaliada através de estudos de validação (RIGHI, 2012).

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação do método analítico e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI *et al.*, 2004).

Considerando-se as inúmeras áreas que necessitam gerar dados confiáveis, é consenso que esses conceitos e definições não estão completa e rigidamente estabelecidos, mas continuam a evoluir e aprimorarem-se, no sentido de confirmar que o método proposto tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer, e que os dados gerados possuem a qualidade necessária, em termos de confiabilidade e rastreabilidade, entre outros, para o fim que se propõe (PIZZUTTI, 2006; KUSSUMI, 2007).

Para a validação de métodos analíticos, geralmente são avaliados parâmetros como: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação (exatidão), precisão, seletividade e robustez (INMETRO, 2011).

2.5.1 Curva analítica e linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais às concentrações dos analitos, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie, gerando uma curva analítica. Essa relação matemática pode ser expressa como uma equação de reta, $y = ax + b$, que relaciona as variáveis x e y e gera os coeficientes de regressão a (inclinação da curva) e b (interseção da curva com o eixo y , quando $x=0$) (RIBANI *et al.*, 2004; REICHERT, 2012).

Um coeficiente de correlação (r) maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual ou superior a 0,99, já o INMETRO, um valor acima de 0,90. Em qualquer técnica instrumental, a relação linear simples, descrita pela equação $y = ax + b$, só é válida em um determinado intervalo de massa ou concentração da espécie medida. Este intervalo de massas ou concentrações, no qual se pode construir uma curva analítica linear, é a faixa linear dinâmica (RIBANI *et al.*, 2004).

Além dos coeficientes de regressão “ a ” e “ b ”, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (r), que é dado pela raiz

quadrada do coeficiente de determinação (r^2). O coeficiente de correlação permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1 menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004).

2.5.2 Limite de Detecção

O LOD representa a menor concentração da substância em estudo que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. Este parâmetro pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método. Ainda, o limite de detecção para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra (INMETRO, 2011).

2.5.3 Limite de quantificação

O LOQ representa a menor concentração da substância em estudo que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental. A determinação do LOQ representa um compromisso entre a concentração, a precisão e a exatidão exigidas. Isto significa que, quando decresce o nível de concentração do LOQ, a medição torna-se menos precisa. Se houver necessidade de maior precisão, uma concentração maior deve ser registrada para o LOQ (RIBANI *et al.*, 2004).

2.5.4 Exatidão

Exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2003).

A recuperação é a quantidade do analito remanescente na determinação final de uma amostra, após a sua adição, comumente a uma amostra “branco”² antes do procedimento de extração e sempre é considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, sempre associada a valores de precisão. Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (RIBANI *et al.*, 2004).

Os valores de recuperação são calculados pela Equação 1 e, em geral, são expressos em porcentagem. Os intervalos aceitos devem estar entre 70 e 120% para a maioria dos métodos analíticos (SANCO, 2013).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde:

C_1 = Concentração do analito determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração do analito na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração do analito adicionada à amostra fortificada;

² Considera-se o termo amostra “branco” como sendo a amostra de suco de laranja isenta dos fungicidas estudados e o termo extrato “branco” é utilizado para o extrato obtido no final do procedimento de extração.

2.5.5 Precisão

É o termo geral que representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou materiais de referencia (MR), sob condições definidas (RIBANI *et al.*, 2004).

Usualmente é expressa pelo desvio padrão relativo (RSD, do idioma inglês, Relative Standard Deviation), através da Equação 2:

$$\text{RSD\%} = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad \text{(Equação 2)}$$

Sendo:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

x_m = valor médio determinado;

Normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as três formas mais comuns de expressá-la são: por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão relativo e coeficiente de variação (INMETRO, 2011).

2.5.6 Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em análise na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. Este parâmetro avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes (RIBANI *et al.*, 2004).

Uma matriz complexa pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração (INMETRO, 2011).

Existem diversos fatores que podem interferir na ionização, identificação e quantificação nas interfaces de ionização por eletronebulização (ESI), e, por isso, é fundamental a escolha adequada do processo de preparo da amostra e otimização das condições cromatográficas (HAJSLOVÁ & ZROSTLÍKOVÁ, 2003).

Através do estudo do efeito matriz, pode-se avaliar a seletividade do método, averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz, o que gera, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental (também chamada de resposta instrumental) (MAPA, 2011).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os protocolos experimentais deste trabalho foram realizados no Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes (CEPARC) da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. O CEPARC tem seu Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ) baseado na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025, o que garante maior confiabilidade para os resultados obtidos, já que vários parâmetros de ambiente dos laboratórios são controlados (temperatura e umidade), assim como dos equipamentos de armazenagem das amostras, além de outros itens exigidos pela referida norma.

3.1 Instrumentação

- Cromatógrafo a líquido, sistema UPLC-MS/MS (Waters, EUA)
incluindo:
 - Amostrador automático (com refrigeração), Bomba quaternária, Forno para coluna e Sistema de desgaseificação (a vácuo);
 - Coluna cromatográfica BECH C18, 100 mm de comprimento, 1,7 mm de diâmetro interno e 1,7 μ m de tamanho de partícula, contendo pré-coluna em seu interior (Waters, EUA);
 - Detector MS triplo quadrupolo, Xevo TQS (Waters, EUA) utilizando o modo de ionização por eletronebulização (ESI), operando no modo positivo;
- Gerador de Nitrogênio (Peak Scientific, EUA);
- Balança analítica de precisão com 2 casas decimais (Mettler, Suíça);
- Balança analítica de precisão com 4 casas decimais (Sartorius, Alemanha);
- Centrífuga Heraeus Varifugue (Thermo Scientific, Alemanha);
- Homogeneizador de tecidos (Polytron, Suíça);

- Pipetador automático Handy Step (Brand, Alemanha);
- Sistema de aquisição de dados através do software MassLynx e Targetlynx versão 4.1 (Waters, EUA);
- Sistema de purificação de água Milli-Q® para obtenção de água grau HPLC (MilliPore, EUA).

3.2 Materiais

Os materiais empregados para o preparo e armazenamento das soluções analíticas dos fungicidas estudados foram :

- Frascos de vidro, capacidade de 22 mL, com batoque de teflon® (Nalgene, EUA);
- Tubos de polipropileno para centrifuga, com tampas rosqueáveis, capacidade de 50 mL (Nalgene, EUA);
- Tubos de teflon®, capacidade de 250 mL;
- Frascos de vidro, com tampas rosqueáveis , específicos para amostrador automático (Waters, EUA)
- Balões volumétricos calibrados, com capacidade de 5 e 10 mL (Blau Brand, Alemanha ou Restek, EUA);
- Vidrarias comuns de laboratório;
- Ponteiras descartáveis para pipetador automático *Handy Step* (1,25; 2,5; 5,0; 12,5 e 50,0 mL).

3.3 Solventes e reagentes

- Acetona, grau resíduo (J.T. Baker, New Jersey, EUA);
- Acetonitrila, grau HPLC (J.T. Baker, New Jersey, EUA);

- Ácido acético glacial HPLC (J.T. Baker, New Jersey, EUA);
- Diclorometano, grau HPLC (Mallinckrodt, Missouri, EUA);
- Éter de petróleo, grau resíduo (Mallinckrodt, Missouri, EUA);
- Formiato de amônio p.a., grau de pureza superior a 97.0 % (Fluka Analytical, Seelze, Alemanha);
- Metanol, grau HPLC (Mallinckrodt, Missouri, EUA);
- Materiais de referência (MR) sólido dos agrotóxicos (Dr.Ehrenstorfer, Augsburg, Alemanha): azoxistrobina, carbendazim, difenoconazol, famoxadona, piraclostrobina, tiofanato-metílico, tiabendazol, tebuconazol, trifloxistrobina. A pureza dos MR constam na Tabela 3;
- Sulfato de sódio anidro (UCT, Inglaterra).

3.4 Gases

- Argônio 99,999% de pureza (Air Products, Brasil) (gás de colisão do UPLC-MS/MS);
- Gerador de Nitrogênio (Peak Scientific, EUA);

3.5 Seleção dos agrotóxicos

Tendo em vista os problemas relacionados à exportação do suco de laranja concentrado no ano de 2011 e 2012, realizou-se uma pesquisa na página eletrônica da ANVISA, a fim de estudar quais agrotóxicos são permitidos para a cultura de citros no Brasil, e a partir destes foram selecionados somente os agrotóxicos pertencentes à classe dos fungicidas e que apresentam características físico-químicas compatíveis com a técnica instrumental de LC.

Os agrotóxicos selecionados para o trabalho foram azoxistrobina, carbendazim, difenoconazol, famoxadona, piraclostrobina, tiofanato-metílico, tiabendazol, tebuconazol e trifloxistrobina. No Apêndice 1, encontram-se as fórmulas estrutural e molecular, bem como a massa molecular desses agrotóxicos.

De acordo com a lista da Produção Integrada de Citros (PIC) de agrotóxicos permitidos na cultura de frutas cítricas, disponibilizada pela Fundecitrus, dos fungicidas estudados neste trabalho, somente carbendazim, famoxadona e tiofanato-metílico tem uso permitido segundo a ANVISA, porém não são permitidos pela lista da PIC.

Na Tabela 3 são listados os fungicidas estudados neste trabalho, sua modalidade de emprego e os LMR estabelecidos pelos principais órgãos mundiais: *United States Department of Agriculture (USDA)* nos EUA, *Codex Alimentarius*, *European Union (EU)* na Europa e ANVISA no Brasil.

O *Codex Alimentarius* é um documento proveniente do fórum internacional de normatização do comércio de alimentos estabelecido pela Organização das Nações Unidas, ONU, por ato da Organização para a Agricultura e Alimentação, FAO, e Organização Mundial de Saúde, OMS.

Tabela 3- Informações sobre a modalidade de emprego e LMR dos fungicidas em estudo.

Agrotóxico	Modalidade de emprego	LMR mg kg ⁻¹			
		USDA	<i>Codex Alimentarius</i>	EU	ANVISA
Azoxistrobina	Foliar	15,0	15,0	15,0	0,5
Carbendazim	Foliar	-	1,0	0,2	5,0
Difenoconazol	Foliar	0,6	0,5	0,1	0,5
Famoxadona	Foliar	-	-	0,02	0,05
Piraclostrobina	Foliar	2,0	2,0	2,0	0,5
Tebuconazol	Foliar	-	0,5	0,9	5,0
Tiabendazol	Foliar/pós-colheita	10,0	7,0	5,0	10,0
Tiofanato-metílico	Foliar	-	-	0,05	5*
Trifloxistrobina	Foliar	0,6	0,5	0,3	0,2

* LMR do tiofanato-metílico é expresso como carbendazim.

3.6 Seleção do padrão interno

Padrão interno (P.I.) é uma substância química adicionada a uma quantidade da amostra em análise ou ao extrato da amostra, em uma concentração conhecida, em uma etapa específica da análise, a fim de avaliar a execução correta do procedimento analítico (ou parte dele). O P.I. deve ser quimicamente estável e/ou, se possível, mostrar o mesmo comportamento dos analitos (SANCO, 2013).

Para a determinação dos fungicidas por UPLC-MS/MS utilizou-se uma alíquota de 40 μL de uma solução do agrotóxico propoxur, na concentração de 10 mg L^{-1} , o qual foi adicionado em todas as soluções das curvas analíticas bem como nas amostras para o estudo de exatidão do método. Dessa forma, havendo alterações no sinal do P.I., também haverá alterações nos sinais dos analitos, na mesma intensidade. O propoxur pertence à classe dos inseticidas.

3.7 Preparo das soluções analíticas

3.7.1 Preparo das soluções estoque

Inicialmente foram preparadas as soluções estoque individuais para cada agrotóxico, na concentração de 1000 mg L^{-1} , levando em consideração a pureza e a solubilidade dos MR (Tabela 4).

O MR de cada analito foi pesado, individualmente, diretamente no frasco de vidro com tampa tipo batoque de teflon[®] (capacidade de 22 mL) e em seguida, efetuou-se o cálculo do volume de solvente a ser adicionado para alcançar a concentração desejada, levando-se em consideração a pureza da substância.

Após a pesagem, o MR foi diluído no solvente adequado, o frasco foi fechado, agitado manualmente e então levado para banho de ultrassom durante aproximadamente 5 minutos a fim de solubilizar qualquer partícula sólida remanescente.

Após o preparo da solução estoque de cada fungicida, foi preparada a solução mistura contendo todos os analitos na concentração de 1 mg L^{-1} . Para isso, adicionou-se $10 \text{ }\mu\text{L}$ de cada solução estoque em balão volumétrico de 10 mL contendo um pequeno volume de metanol acidificado com $0,1\%$ de ácido acético glacial, e o volume final foi completado com metanol acidificado. A partir dessa solução, preparou-se diluições nas concentrações de 100 e 20 ng mL^{-1} , adicionando-se 100 e $250 \text{ }\mu\text{L}$, respectivamente, da solução mistura 1 mg L^{-1} .

Todas as soluções, tanto estoque quanto as diluídas, foram armazenadas em congelador, com temperatura controlada em aproximadamente $-18 \text{ }^\circ\text{C}$. Antes do uso, as soluções foram retiradas, com antecedência, e deixadas em repouso até alcançar a temperatura controlada de $\pm 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

As informações relevantes para o preparo das soluções estoques individuais para os fungicidas estudados e para o propoxur (P.I.) a partir dos MR, estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4- Informações sobre a pureza dos MR e solventes usados para o preparo das soluções estoque dos agrotóxicos selecionados, na concentração de 1000 mg L^{-1} .

Agrotóxicos	Solvente	Fornecedor	Pureza (%)
Azoxistrobina	Tolueno	Dr. Ehrenstorfer [®]	99,0
Carbendazim	Acetona/Metanol	Dr. Ehrenstorfer [®]	97,0
Difenoconazol	Tolueno	Dr. Ehrenstorfer [®]	98,7
Famoxadona	Tolueno	Dr. Ehrenstorfer [®]	99,5
Piraclostrobina	Tolueno	Dr. Ehrenstorfer [®]	97,0
Propoxur (P.I.)	Tolueno	Dr. Ehrenstorfer [®]	99,5
Tebuconazol	Tolueno	Dr. Ehrenstorfer [®]	98,8
Tiabendazol	Metanol	Dr. Ehrenstorfer [®]	98,3
Tiofanato-metílico	Metanol	Dr. Ehrenstorfer [®]	99,9
Trifloxistrobina	Tolueno	Dr. Ehrenstorfer [®]	99,9

3.7.2 Preparo das soluções para as curvas analíticas

Com as diluições das soluções nas concentrações de 20 e 100 ng mL⁻¹ foram preparadas as soluções para as curvas analíticas em solvente orgânico (metanol acidificado) e em matriz (extrato “branco” de suco de laranja natural obtido conforme descrito no item 3.10.1) nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 5,0; 20,0; 100,0 ng mL⁻¹.

A Figura 5 indica as etapas de preparo das soluções, desde o preparo das soluções estoque, partindo dos MR.

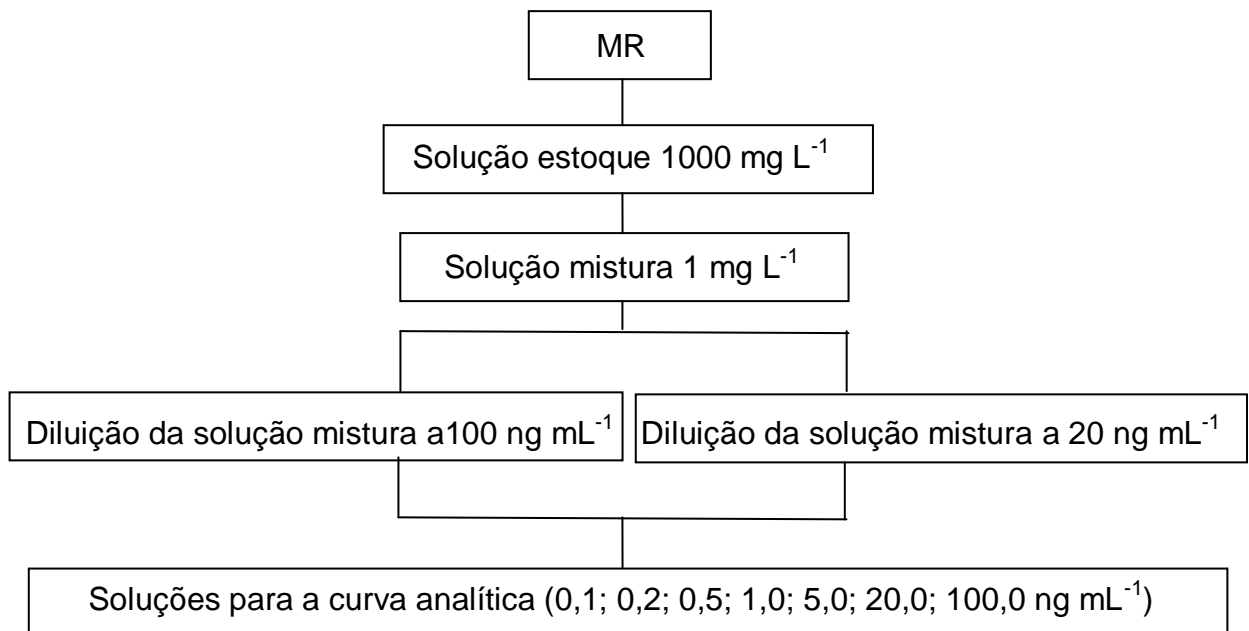


Figura 5 – Fluxograma indicando as etapas para o preparo das soluções analíticas.

3.8 Obtenção das amostras

As amostras de laranja consideradas como amostra “branco” (amostras livre dos fungicidas estudados) foram adquiridas em pomares, nos quais não foram aplicados agrotóxicos propositalmente.

Já as amostras reais de laranja utilizadas para a aplicação do método foram coletadas semanalmente, durante um mês em feira de produtos orgânicos e em mercados comuns, localizados no município de Santa Maria/RS. As amostras reais de sucos de laranja concentrado e integral foram coletadas, também, em mercados comuns e o suco diluído foi preparado a partir do concentrado. Os sucos natural, concentrado, diluído e integral foram armazenados em congelador, com temperaturas controladas a aproximadamente -18 °C.

3.9 Obtenção do suco *in natura*

No mesmo dia em que as amostras de laranja chegaram ao laboratório, as frutas foram lavadas com água de torneira, secas com papel toalha, partidas ao meio e espremidas manualmente, para extração do suco da forma mais natural possível. Posteriormente, o suco foi armazenado em recipiente de alumínio em congelador, com temperatura controlada a aproximadamente -18 °C.

3.10 Validação intralaboratorial do método multirresíduo

A validação intralaboratorial consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar que um método adotado de outras fontes está bem aplicado (RIBANI *et al.*, 2004).

O processo de validação de um método deve estar descrito em um procedimento, e os estudos para determinar os parâmetros de validação devem ser realizados com equipamentos dentro das especificações, funcionando corretamente e adequadamente calibrados (INMETRO, 2011).

3.10.1 Procedimento de extração

Para este trabalho, validou-se o método de extração mini-Luke modificado para determinar fungicidas em sucos de laranja por UPLC-MS/MS e, posteriormente, foi feita uma avaliação em sucos de laranja, a fim de demonstrar a qualidade fitossanitária dos sucos que chegam à mesa do consumidor no Município de Santa Maria/RS.

O método de extração selecionado para a execução deste trabalho é denominado mini-Luke modificado. Originalmente foi desenvolvido pelo VWA - *Food and Consumer Product Safety Authority*, na Holanda e é baseado no método de Luke original (LUKE *et al.*, 1975), porém utiliza quantidades de amostra e solventes reduzidas, sem ser necessário adicionar cloreto de sódio para a transferência dos analitos polares da fase aquosa para a fase orgânica.

O procedimento de extração mini-Luke foi desenvolvido na década de 1980 e vem sendo utilizado para monitoramentos de alimentos e estudos de avaliação de riscos e análises de rotina em amostras não gordurosas, tais como frutas e vegetais.

Como um método de extração alternativo, desenvolveu-se no VWA - *Food and Consumer Product Safety Authority*, uma modificação do método de extração mini-Luke nos anos 1990, onde foi adicionado sulfato de sódio anidro na etapa de extração levando, assim, a uma melhor extração dos agrotóxicos polares (HIEMSTRA & DE KOK, 2007).

Para este método, destacam-se vantagens como a velocidade de extração, a obtenção de extratos limpos embora não seja aplicada uma etapa de purificação, e a compatibilidade com ambas as classes de detectores, seletivos e espectrômetros de massas (HIEMSTRA & DE KOK, 2007).

Visto que o método mini-Luke modificado, além de ser rápido, também proporciona respostas satisfatórias para amostras de origem vegetal e com baixo teor de gordura, como é o caso dos sucos de laranja, empregou-se este método para a determinação de nove fungicidas aplicados na cultura de citros. O procedimento experimental está descrito no fluxograma da Figura 6.

Pesou-se 15 g ($\pm 0,05$ g) de suco de laranja *in natura* em tubos de teflon com capacidade de 250 mL que foram utilizadas tanto para as amostras fortificadas quanto para os extratos “branco” da matriz. Em seguida, adicionou-se 30 mL de

acetona e a mistura foi submetida à homogeneização durante 20 segundos a 15000 rpm. Posteriormente adicionou-se 15 g de sulfato de sódio anidro e a amostra foi novamente homogeneizada por 20 segundos a 15000 rpm, seguido da adição de 30 mL de éter de petróleo e 30 mL de diclorometano. Após homogeneização nas mesmas condições anteriores, o extrato foi centrifugado durante 3 minutos a 3600 rpm. Uma alíquota de 1,2 mL do extrato foi transferida para um tubo de evaporação, e levado a banho de água inicialmente a temperatura de 45 °C, e posteriormente elevada até 62 °C, até próximo à secura (a secura completa ocorreu à temperatura ambiente). O resíduo foi ressuspensionado em 1 mL de metanol acidificado contendo o P.I. (propoxur) na concentração de 40 ng mL⁻¹.

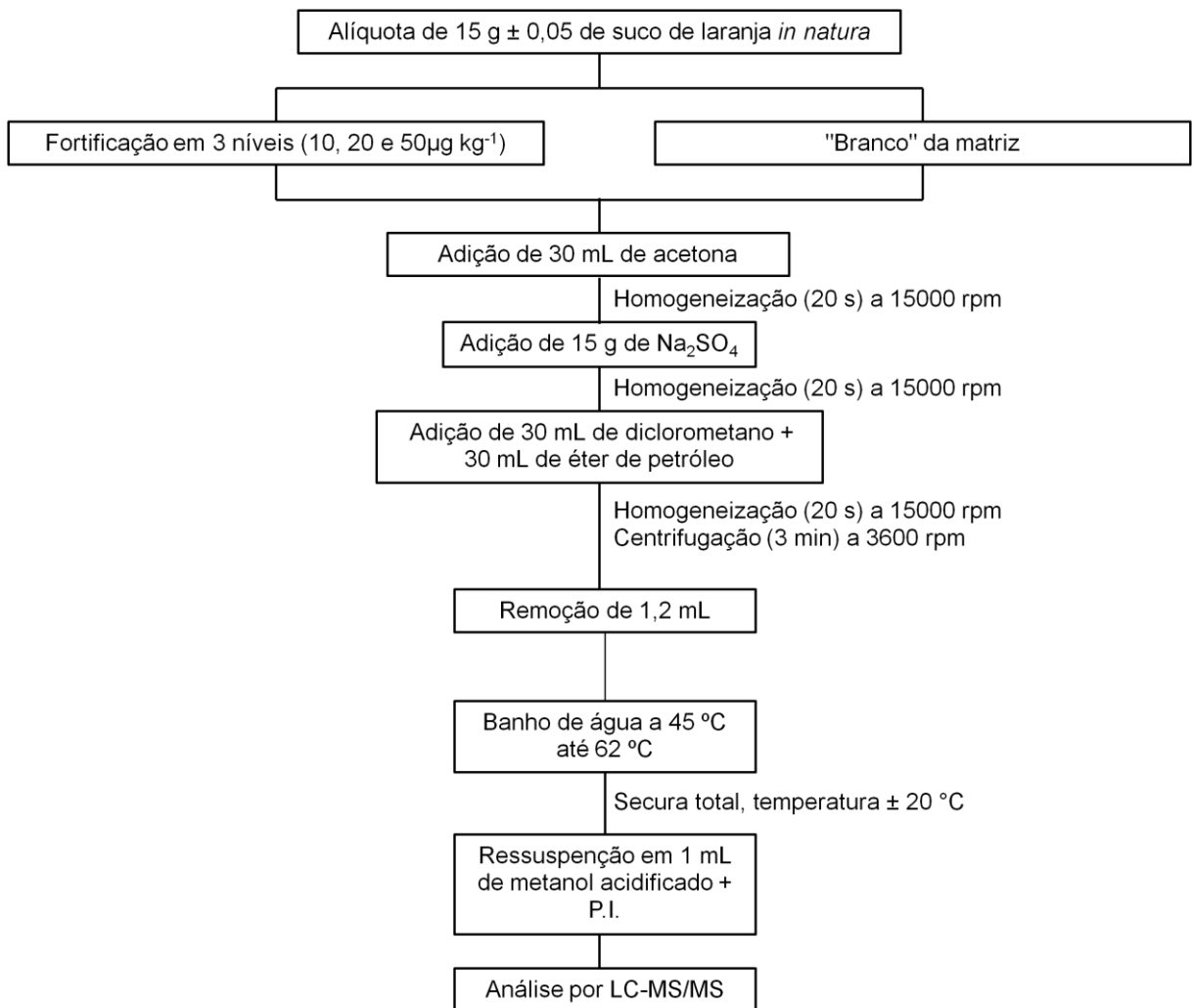


Figura 6 - Fluxograma do procedimento de extração mini-Luke modificado.

3.10.2 Curva analítica e linearidade

As soluções de trabalho nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 5,0; 20,0 e 100,0 ng mL⁻¹, utilizadas para o estudo de linearidade, foram preparadas em metanol acidificado com 0,1% de ácido acético) e em extrato "branco" da matriz (suco de laranja *in natura*), a partir da diluição da solução estoque da mistura dos agrotóxicos na concentração de 1 mg L⁻¹. O extrato "branco" de suco foi obtido conforme o procedimento descrito no item 3.10.1.

Primeiramente, injetou-se o "branco" dos reagentes (procedimento realizado em matriz e sem a adição dos analitos). Em seguida, procedeu-se a injeção das soluções analíticas preparadas em solvente e em extrato "branco" da matriz, em ordem crescente de concentração, onde as soluções em solvente e em extrato "branco" na mesma concentração foram injetados alternadamente a fim de evitar *carryover*³ na coluna cromatográfica. Esta sequência de injeção foi repetida 7 vezes.

A partir dos dados obtidos foi realizado o cálculo da média das áreas e dos valores de RSD (%) das injeções. Os valores de área e concentração foram colocados em gráfico a fim de obter a equação da reta $y = ax + b$ para a obtenção dos parâmetros das curvas analíticas para cada agrotóxico, bem como os valores de coeficiente de determinação (r^2), coeficiente angular (a) e coeficiente linear (b).

3.10.3 Limites de detecção e de quantificação

A partir dos dados do estudo de linearidade para cada um dos 9 agrotóxicos estudados, procedeu-se a determinação da estimativa do limite de detecção do instrumento (LOD_i) e do método (LOD_m), bem como o limite de quantificação do instrumento (LOQ_i) e do método (LOQ_m).

³ Carryover, no idioma inglês, é o fenômeno conhecido como sendo o sobrecarregamento da amostra na coluna cromatográfica.

Através das áreas e RSD (%), sete replicatas, de cada analito, presente nas sete soluções analíticas estudadas, aplicando-se a Equação 3, obteve-se a estimativa do LOD_i , em $\mu\text{g L}^{-1}$.

$$LOD_i(\mu\text{g.L}^{-1}) = 3 \times RSD\% \times C \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde:

RSD: Desvio padrão relativo das áreas obtidas;

C: Concentração da solução analítica;

Multiplicando-se o valor estimado do LOD_i pelo fator de diluição obtido para o método de extração (fator cinco), obteve-se a estimativa do LOD_m em $\mu\text{g kg}^{-1}$.

A partir do LOD_i aplicando-se a Equação 4, obteve-se o LOQ_i .

$$LOQ_i(\mu\text{g.L}^{-1}) = LOD_i \times 3,33 \quad \text{(Equação 4)}$$

O LOQ_m estimado foi obtido multiplicando-se o LOQ_i pelo fator de diluição do método de extração. No entanto, considera-se o valor real do LOQ_m ($\mu\text{g kg}^{-1}$), como sendo a menor concentração que, ao ser fortificada na matriz, apresenta recuperações entre 70 e 120%, com RSD menor ou igual a 20% (PIZZUTTI, 2006).

3.10.4 Ensaios de fortificação e recuperação

Os ensaios de fortificação e recuperação tem por objetivo avaliar a exatidão do método, que representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Normalmente são utilizados para avaliar a exatidão de um método em materiais de referência, em comparações interlaboratoriais e em ensaios de recuperação (INMETRO, 2003).

Para este estudo, fortificou-se a amostra “branco” com quantidade conhecida da solução mistura 1 mg L^{-1} nos níveis de concentração 10, 20 e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ adicionando-se, respectivamente, 150, 300 e $750 \mu\text{L}$ da solução. Imediatamente

após a fortificação das amostras, procedeu-se à extração, como descrito no item 3.9.1. O procedimento foi realizado 7 vezes ($n=7$), para cada concentração de fortificação (3 concentrações), e também para a amostra “branco” (sem adição dos pesticidas), para a verificação da ausência desses compostos na matriz e em seguida cada extrato foi injetado uma vez no sistema cromatográfico.

As informações necessárias para os ensaios de fortificação encontram-se no Apêndice 2.

3.10.5 Efeito matriz

Avaliou-se o efeito matriz para determinação de agrotóxicos em sucos de laranja de duas maneiras distintas, sendo uma delas a comparação entre as áreas obtidas a partir das soluções preparadas em solvente orgânico e em extrato “branco” da matriz, conforme a Equação 5, possibilitando a determinação do efeito matriz em cada ponto da curva analítica.

$$\text{Efeito matriz\%} = \left(\frac{A_1 - A_2}{A_2} \right) \times 100 \quad \text{(Equação 5)}$$

Onde:

A_1 = Média das áreas de cada agrotóxico da solução analítica, preparada em matriz, numa dada concentração;

A_2 = Média das áreas de cada agrotóxico da solução analítica, preparada em solvente, numa dada concentração;

A outra maneira de avaliação do efeito matriz foi através da comparação das inclinações das curvas analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato “branco” da matriz, de acordo com a Equação 6

$$\text{Efeito matriz\%} = \left(\frac{1 - S_m}{S_s} \right) \times 100 \quad \text{(Equação 6)}$$

Sendo:

S_m = Inclinação da curva preparada em extrato “branco” da matriz;

S_s = Inclinação da curva preparada em solvente orgânico;

3.11 Análise cromatográfica

As condições cromatográficas utilizadas no sistema UPLC-MS/MS, foram as seguintes:

Para o cromatógrafo a líquido:

- Volume de injeção: 2 μL no modo de injeção *partial loop with needle overflow*;
- Temperatura do forno da coluna: 60 $^{\circ}\text{C}$;
- Fase móvel A: solução aquosa de formiato de amônio 0,3 g L^{-1} ;
- Fase móvel B: metanol;
- Gradiente da fase móvel: o programa foi iniciado com 80% do eluente A e levado diretamente a 15% em 11 minutos. Manteve-se essa proporção durante 1 minuto e, posteriormente, a composição foi levada à composição inicial (80% do eluente A) em 0,5 minutos e manteve-se essa proporção até o final da corrida cromatográfica;
- Vazão da fase móvel: 0,45 mL min^{-1} ;
- Tempo total de corrida cromatográfica: 14 minutos;

Para o espectrômetro de massas:

- Ionização à pressão atmosférica com ESI no modo positivo;
- Voltagem do capilar: 3,00 kV;
- Temperatura do gás de dessolvatação: 400 $^{\circ}\text{C}$;
- Vazão do gás de dessolvatação: 500 L h^{-1} ;
- Vazão do gás no cone de amostragem: 150 L h^{-1} ;
- Vazão do gás de nebulização: 7,0 L h^{-1} ;

- Vazão do gás de colisão (Argônio): 0,15 mL min⁻¹;
- A voltagem do cone, bem como as energias de colisão para cada transição e duas transições MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas), sendo uma transição para quantificação além de mais uma transição (segunda maior abundância) para confirmação para cada agrotóxico em estudo constam na Tabela 5.

Tabela 5 - Agrotóxicos e seus respectivos íon precursor, tempo de retenção (t_R), voltagem do cone, íon produto e energia de colisão no sistema UPLC-MS/MS nas condições de análise.

Agrotóxicos	Íon precursor	t_R (min)	Voltagem do cone (V)	Transição de Quantificação		Transição de Confirmação	
				Íon produto	Energia de colisão (eV)	Íon produto	Energia de colisão (eV)
Azoxistrobina	404,1	7,10	15	372,0	16	328,9	30
Carbendazim	192,0	2,81	25	159,9	30	132,0	16
Difenoconazol	406,1	9,66	35	250,9	25	187,8	40
Famoxadona	392,2	9,15	20	331,1	9	93,0	31
Piraclostrobina	388,1	9,11	25	163,0	25	193,9	12
Propoxur (P. I.)	210,1	4,57	15	110,9	12	92,9	25
Tebuconazol	308,2	8,76	30	70,1	24	124,9	40
Tiabendazol	202,0	3,48	45	174,9	25	130,9	30
Tiofanato-metílico	343,0	4,48	25	151,0	23	311,0	10
Trifloxistrobina	409,2	9,87	25	185,9	14	145,0	40

3.12 Aplicação do método para amostras reais

O método validado neste trabalho foi aplicado para quatro tipos de suco de laranja a fim de verificar a presença de fungicidas em produtos que chegam na mesa do consumidor.

Foram usados como amostras o suco de laranja natural, obtido diretamente da fruta, suco de laranja concentrado, suco de laranja diluído a partir do suco concentrado (como indicado no rótulo do frasco) e o suco integral.

4. Resultados e discussão

4.1 Avaliação da amostra “branco”

Todas as amostras de suco de laranja para seleção da amostra “branco” foram obtidos a partir de laranjas consideradas orgânicas, onde não havia sido aplicado nenhum tipo de agrotóxico propositalmente. No entanto, estas amostras apresentaram contaminação pelos fungicidas carbendazim, piraclostrobina e tiabendazol, todos estudados neste trabalho. Dessa forma, foi necessário descontar essa contaminação, para considerar o extrato como “branco”, e assim não causar comprometimento nos resultados finais.

O fato de ter sido encontrado os fungicidas na amostra “branco” pode ser atribuído a contaminações cruzadas, ou seja, fatores como vento, água e insetos que transportam agrotóxicos empregados em outras culturas até os laranjais.

A Figura 7 apresenta os cromatogramas, intensidades dos sinais analíticos e transições dos íons precursor e produto, indicando a presença de carbendazim e ausência de tiofanato-metílico na amostra “branco”. Verifica-se a contaminação por carbendazim (t_R de 2,81), uma vez que há sinal cromatográfico tanto para a transição de quantificação (A) quanto para a transição de confirmação (B). No entanto, para o fungicida tiofanato-metílico (t_R de 4,48) há sinal analítico somente para a transição de quantificação (C), ou seja, o sinal analítico não se confirmou através da razão massa/carga (m/z) estabelecida para confirmação (D). Assim, foi possível verificar somente a presença de carbendazim.

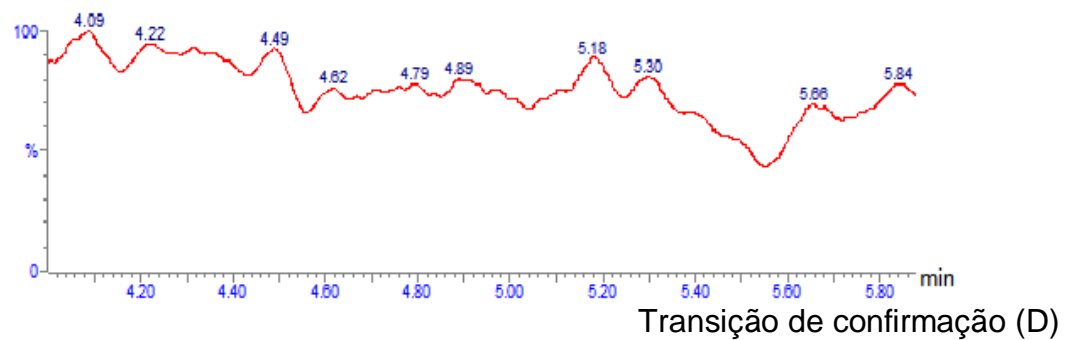
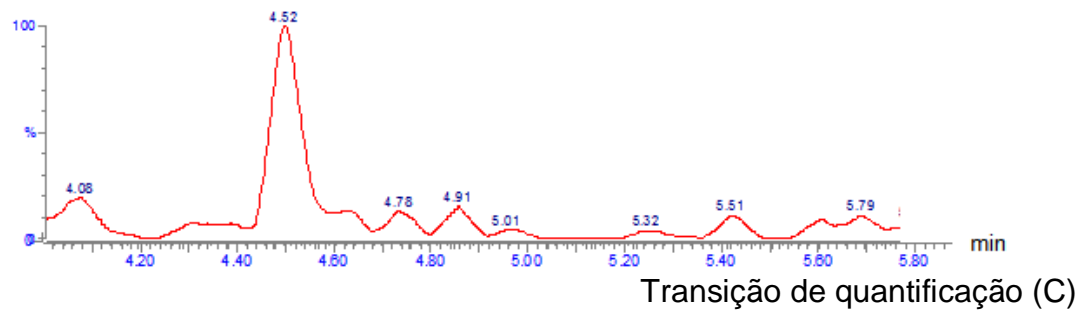
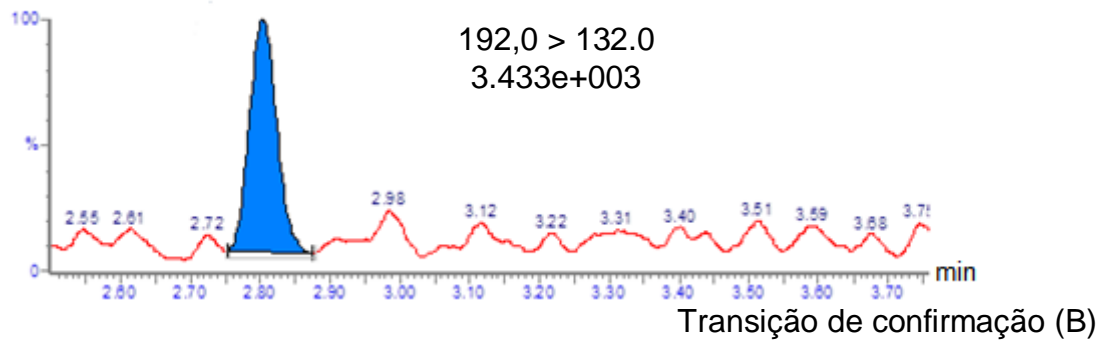
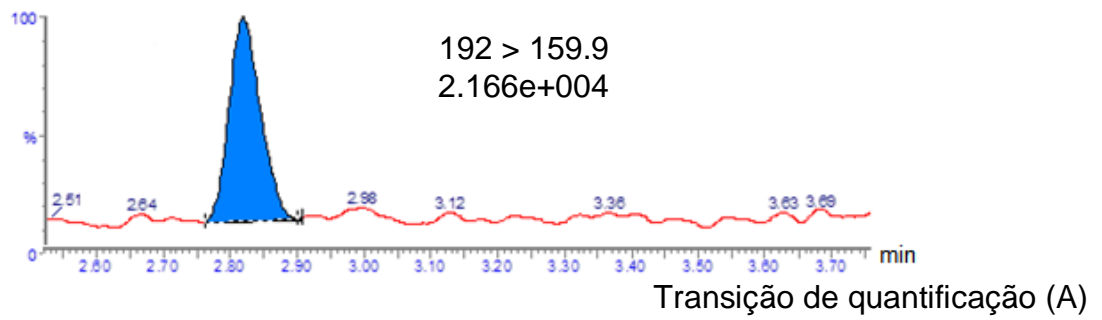


Figura 7 - Cromatogramas de amostra “branco” de suco de laranja *in natura*, incluindo a intensidade dos sinais analíticos e transições dos íons precursor e produto, os quais demonstram a presença de carbendazim (A) e (B) e a ausência de tiofanato-metílico (C) e (D).

4.2 Validação intralaboratorial do método multirresíduo

4.2.1 Curva analítica e linearidade

Através das áreas obtidas foi possível calcular as médias das áreas bem como os valores de RSD (%) das injeções, coeficiente de determinação (r^2), coeficiente de correlação (r) e coeficientes angulares e lineares de cada reta correspondente a cada analito.

A Tabela 6 apresenta a faixa linear de trabalho para cada fungicida, bem como os coeficientes r^2 e r das curvas obtidas tanto em solvente quanto no extrato “branco” da matriz.

Tabela 6 - Dados de linearidade para os agrotóxicos estudados, preparados em metanol contendo 0,1% de ácido acético e em extrato “branco” da matriz.

Agrotóxicos	Solvente orgânico			Extrato "branco" da matriz		
	Faixa linear (ng mL ⁻¹)	r^2	r	Faixa linear (ng mL ⁻¹)	r^2	r
Azoxistrobina	0,1 - 100,0	0,9985	0,9992	0,1 - 100,0	0,9975	0,9987
Carbendazim	0,1 - 100,0	0,9981	0,9990	0,1 - 100,0	0,9967	0,9983
Difenoconazol	0,1 - 100,0	0,9995	0,9997	0,1 - 100,0	0,9988	0,9993
Famoxadona	0,1 - 100,0	0,9969	0,9984	0,1 - 100,0	0,9978	0,9988
Piraclostrobina	0,1 - 100,0	0,9982	0,9990	0,1 - 100,0	0,9970	0,9984
Tebuconazol	0,1 - 100,0	0,9985	0,9992	0,1 - 100,0	0,9976	0,9987
Tiabendazol	0,1 - 100,0	0,9996	0,9997	0,1 - 100,0	0,9995	0,9997
Tiofanato-metílico	0,1 - 100,0	0,9964	0,9981	0,1 - 100,0	0,9967	0,9983
Trifloxistrobina	0,1 - 100,0	0,9988	0,9993	0,1 - 100,0	0,9986	0,9992

Com base nos resultados apresentados na Tabela 6, observa-se que as soluções preparadas em solvente orgânico e no extrato “branco” da matriz apresentam-se lineares, visto que todos os analitos apresentam r^2 superior a 0,99. Todos os coeficientes de determinação (r^2) correspondem a coeficientes de

correlação (r) que obedecem aos critérios recomendados pela ANVISA e pelo INMETRO, de 0,99 e 0,90, respectivamente.

Para todos os fungicidas a faixa linear de trabalho foi de 0,1 – 100,0 ng mL⁻¹.

4.2.2 Limite de detecção e de quantificação

Os valores de LOD e LOQ foram obtidos conforme o procedimento descrito no item 3.10.3.

Nas Tabelas 7 e 8 encontram-se os valores de LOD e LOQ do instrumento e do método para cada fungicida em solvente orgânico e em extrato “branco” da matriz, respectivamente.

Para o valor real do LOQ_m (µg kg⁻¹), considerou-se a menor concentração que, ao ser fortificada na matriz, apresentou tanto valores de recuperação (%) quanto de RSD (%) dentro da faixa aceitável, ou seja, entre 70 e 120% e ≤ 20%, respectivamente (item 4.2.3, Tabela 8).

Analisando os dados contidos nas Tabelas 7 e 8, percebe-se que o LOD_i obtido para a maioria dos fungicidas, preparados tanto em solvente orgânico quanto em extrato “branco” da matriz foi de 0,1 ng mL⁻¹, que é o menor nível de fortificação. Ainda o difenoconazol e o tebuconazol apresentaram LOD_i igual a 0,2 e a famoxadona apresentou LOD_i igual a 0,5 ng mL⁻¹.

Considerou-se, para o tiofanato-metílico, um LOQ_m real de 50 µg kg⁻¹ (maior nível de fortificação), embora para este fungicida os valores de RSD para todos os níveis de fortificação apresentem valores maiores que 20% (Tabela 8), o que pode ser fundamentado na instabilidade do analito, que se degrada rapidamente a produtos intermediários ou a carbendazim. Em casos como este a legislação permite considerar o valor real do LOQ_m como sendo aquele que mais se aproxima dos valores permitidos (SANCO, 2013).

Foi possível determinar, para todos os analitos, o valor real de LOQ_m. Estes valores estão em níveis iguais ou menores aos estabelecidos pelas legislações nacional e internacional (Tabela 3) para os fungicidas estudados na cultura de citros, sendo assim, o método pode ser empregado para a quantificação dos mesmos.

Tabela 7 - Valores estimados dos LOD e LOQ, do instrumento e do método, obtidos para os agrotóxicos determinados por UPLC-MS/MS, a partir das concentrações 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 5,0; 20,0 e 100,0 ng mL⁻¹ em metanol acidificado com 0,1% de ácido acético.

Agrotóxicos	LOD _i (ng mL ⁻¹)	LOD _m (µg kg ⁻¹)	LOQ _i (ng mL ⁻¹)	LOQ _m (µg kg ⁻¹)
Azoxistrobina	0,1	0,5	0,3	1,7
Carbendazim	0,1	0,5	0,3	1,7
Difenoconazol	0,2	1,0	0,7	3,3
Famoxadona	0,5	2,5	1,7	8,3
Piraclostrobina	0,1	0,5	0,3	1,7
Tebuconazol	0,2	1,0	0,7	3,3
Tiabendazol	0,1	0,5	0,3	1,7
Tiofanato-metílico	0,1	0,5	0,3	1,7
Trifloxistrobina	0,1	0,5	0,3	1,7

Tabela 8 – Valores estimados de LOD e LOQ para o instrumento e para o método e de LOQ real do método, para os agrotóxicos determinados a partir das concentrações 0,1; 0,2; 0,5; 1, 5; 20 e 100 ng mL⁻¹ em extrato “branco” da matriz.

Agrotóxicos	LOD _i (ng mL ⁻¹)	LOD _m (µg kg ⁻¹)	LOQ _i (ng mL ⁻¹)	LOQ _m (µg kg ⁻¹)	LOQm real (µg kg ⁻¹)
Azoxistrobina	0,1	0,5	0,3	1,7	10
Carbendazim	0,1	0,5	0,3	1,7	20
Difenoconazol	0,2	1,0	0,7	3,3	20
Famoxadona	0,5	2,5	1,7	8,3	10
Piraclostrobina	0,1	0,5	0,3	1,7	10
Tebuconazole	0,2	1,0	0,7	3,3	10
Tiabendazol	0,1	0,5	0,3	1,7	10
Tiofanato-metílico	0,1	0,5	0,3	1,7	50
Trifloxistrobina	0,1	0,5	0,3	1,7	10

4.2.3 Ensaio de fortificação e recuperação

As amostras “branco” foram fortificadas nas concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os resultados das recuperações médias (%) ($n=7$), RSD (%) e LOQ_m , para todos os agrotóxicos estudados, podem ser visualizados na Tabela 9.

Pode-se verificar que, dos nove fungicidas estudados, a azoxistrobina, a famoxadona, a piraclostrobina, o tebuconazol, o tiabendazol e a trifloxistrobina apresentaram valores aceitáveis de recuperação para o nível de fortificação de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para o nível de fortificação de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ o carbendazim e o difenoconazol apresentaram resultados aceitáveis e para para o nível de fortificação de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ somente o tiofanato-metílico apresentou valores aceitáveis.

Tabela 9 - Média dos percentuais de recuperação (%) e RSD (%), nos níveis de fortificação de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e o LOQ do método.

Agrotóxicos	Níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ_m ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	10		20		50		
	Rec Média (%)	RSD (%)	Rec Média (%)	RSD (%)	Rec Média (%)	RSD (%)	
Azoxistrobina	116,7	5,1	105,9	3,0	100,3	5,8	10
Carbendazim	141,2	11,0	112,9	3,7	99,4	11,3	20
Difenoconazol	89,1	35,5	102,3	2,4	99,8	5,9	20
Famoxadona	109,7	4,8	104,8	4,6	102,8	5,8	10
Piraclostrobina	112,9	2,7	106,3	3,9	100,6	6,0	10
Tebuconazol	111,1	4,4	105,1	2,7	101,4	5,8	10
Tiabendazol	118,3	2,6	108,9	2,6	100,8	6,0	10
Tiofanato-metílico	7,7	55,1	41,6	27,6	74,5	22,1	50
Trifloxistrobina	112,9	2,7	107,8	2,6	102,5	6,3	10

$n=7$ (7 extrações x 1 injeção de cada extrato)

A partir dos resultados obtidos para os ensaios de fortificação e recuperação, percebe-se que o método empregado mostrou-se exato e preciso, uma vez que a

maioria dos analitos forneceram valores de recuperações e RSD aceitáveis para o menor nível de fortificação estudado.

O fungicida tiofanato-metílico foi o analito que apresentou valores de recuperação mais baixos. Para o nível de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, o analito apresentou recuperação menor que 70%; já o valor de recuperação para o carbendazim ultrapassou 120%. À medida que os níveis de fortificação aumentaram, as recuperações para o tiofanato-metílico também aumentaram e para o carbendazim, os valores diminuíram. Este fato pode ser explicado pela degradação do tiofanato-metílico à carbendazim.

Desta forma, optou-se por um LOQ_m de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o tiofanato-metílico, pois neste nível de fortificação, apesar de apresentar RSD maior que 20% (22,1%), o valor de recuperação ficou dentro da faixa aceitável. Salienta-se que conforme o SANCO, valores de recuperações na faixa de 60 a 140%, bem como valores de RSD acima de 20%, podem ser considerados para alguns casos, como para o tiofanato-metílico que se degrada facilmente (SANCO, 2013).

FERNÁNDEZ *et al.* (2001), também determinaram a presença de alguns fungicidas na matriz de laranja empregando UPLC-MS/MS e encontraram baixas recuperações para o agrotóxico tiofanato-metílico, no entanto o carbendazim foi recuperado dentro da faixa esperada. Os autores justificaram que os baixos valores de recuperação para o tiofanato-metílico se devem à degradação deste a produtos intermediários diferentes do carbendazim, como por exemplo, o composto 2-aminobenzimidazole.

Neste estudo, em virtude dos altos valores de recuperação para o carbendazim acredita-se que o tiofanato-metílico se degradou a carbendazim, principalmente pelo fato de que no método de extração empregou-se aquecimento, o que poderia acelerar a degradação. HIEMSTRA & De KOK (2007), relatam que baixos valores de recuperação e altos de RSD estão relacionados a agrotóxicos instáveis, que se decompõem durante o procedimento de extração.

De acordo com a legislação brasileira, resíduos de benomil e tiofanato-metílico são expressos como carbendazim em virtude de sua instabilidade.

HIEMSTRA & DE KOK (2007), também aplicaram o método de extração mini-Luke modificado e determinaram, por UPLC-MS/MS, 171 agrotóxicos e seus metabólitos de degradação. Através do estudo, perceberam que para a matriz de alface o tiofanato-metílico apresentou valor de recuperação menor que 50%,

enquanto que o carbendazim alcançou recuperações superiores a 100%, no entanto quando utilizaram a matriz de laranja valores permaneceram nas faixas aceitáveis. Os autores relatam que a explicação mais provável para o comportamento do tiofanato-metílico na matriz de alface, é a degradação deste para carbendazim, já que o tiofanato-metílico é instável em meio ácido.

Os resultados de recuperação e RSD obtidos neste trabalho demonstram que o fato da amostra empregada (suco de laranja) apresentar pH ácido não foi o suficiente para evitar a degradação do tiofanato-metílico à carbendazim. Um estudo da estabilidade do analito na matriz de suco de laranja antes de iniciar o procedimento experimental, conforme recomendado pela ANVISA e pelo SANCO, pode ser uma alternativa para se entender se o comportamento do tiofanato-metílico seja devido a alguma instabilidade na matriz.

O tiofanato-metílico também foi o fungicida que apresentou valores de RSD acima de 20% para os três níveis de fortificação, já para o carbendazim os valores de RSD se mantiveram dentro da faixa para todos os níveis de fortificação. Este fato foi responsável pela escolha do valor real do LOQ_m de 20 µg kg⁻¹, ou seja, o menor nível de fortificação com valor de recuperação dentro da faixa entre 70 a 120%. Salienta-se que o ideal seria encontrar valores de LOQ_m igual ao menor nível de fortificação para o carbendazim, quando se sabe que a legislação americana não permite o emprego desta substância em frutas cítricas e bebidas à base de laranja, assim quanto menor o LOQ_m, menores concentrações poderiam ser quantificadas.

Os resultados de recuperação e RSD também podem ser visualizados nas Figuras 8 e 9.

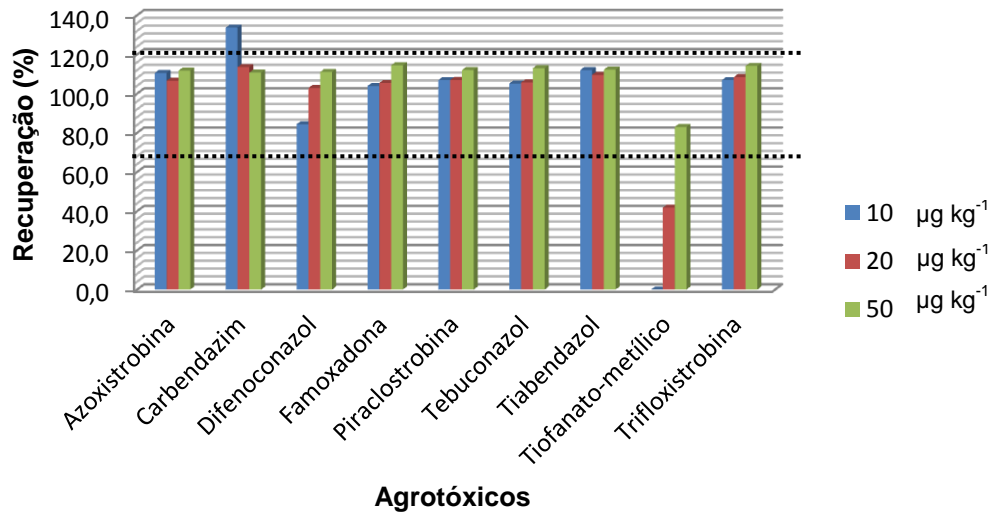


Figura 8 - Gráfico contendo os valores de recuperação (%) obtidos para os 3 níveis de fortificação.

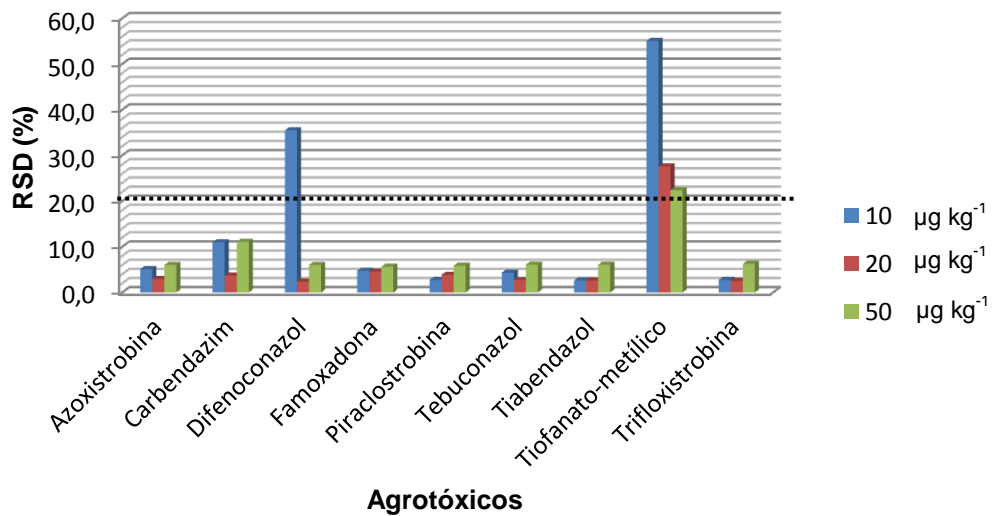


Figura 9 - Gráfico contendo os valores de RSD (%) obtidos para os 3 níveis de fortificação.

4.2.4 Efeito matriz

O efeito matriz tem sido amplamente estudado e reconhecido como uma fonte de erros na análise quantitativa de amostras de alimentos por LC-MS/MS (NIESSEN *et al.*, 2006; GARRIDO FRENICH *et al.*, 2009).

Em LC-MS/MS este efeito é normalmente causado pela interferência dos componentes da matriz que eluem na mesma banda ou tempo de retenção que o analito e competem com ele durante o processo de ionização. Em baixas concentrações, o efeito matriz pode se tornar significativamente relevante, pois ocorre um decréscimo ou um aumento na ionização do analito devido à baixa concentração desse na matriz (PIZZUTTI, 2006). Quando há um decréscimo na ionização, diz-se que ocorreu uma supressão na ionização e a intensidade do sinal do pico cromatográfico diminui.

Através da Figura 10, que mostra dois exemplos de curvas analíticas, sendo que um agrotóxico (azoxistrobina) não teve o sinal analítico afetado, enquanto que o outro agrotóxico (tiabendazol) apresentou um decréscimo no sinal cromatográfico, ou seja, houve uma supressão do sinal. No entanto, as Figuras 11 e 12 mostram os cromatogramas referentes aos mesmos agrotóxicos quando analisados em solvente e em extrato “branco” da matriz. Pode-se observar que o formato dos picos para ambos agrotóxicos, não sofreu diferença. Contudo, quando analisadas as intensidades dos sinais cromatográficos, percebe-se que para o fungicida azoxistrobina a diferença foi de -0,59% e para o tiabendazol foi de -13,01%, quando comparadas as intensidades dos picos correspondentes à solução em solvente orgânico e em extrato “branco” da matriz. Para o fungicida tiabendazol o efeito matriz foi bem mais pronunciado, entretanto, não interferiu na exatidão e precisão dos resultados, já que os valores permaneceram na faixa aceitável.

Na Tabela 10 encontram-se os percentuais para efeito matriz obtidos para cada agrotóxico, em cada concentração das soluções da curva analítica e na Tabela 10 estão apresentados os valores de efeito matriz determinados a partir da inclinação das curvas analíticas em solvente orgânico e em extrato “branco” da matriz.

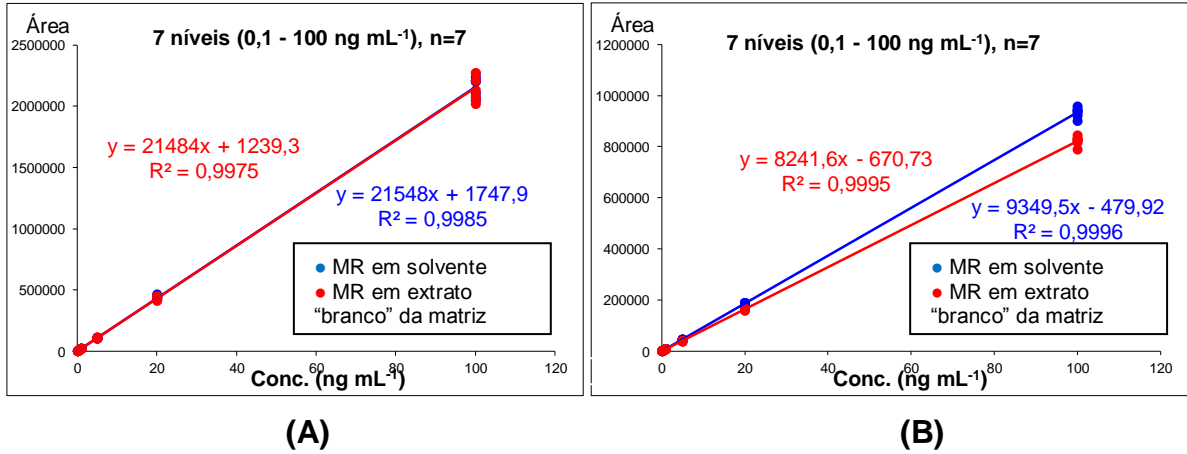


Figura 10 - Curvas analíticas preparadas em solvente e no extrato "branco" da matriz para os fungicidas (A) azoxistrobina e (B) tiabendazol.

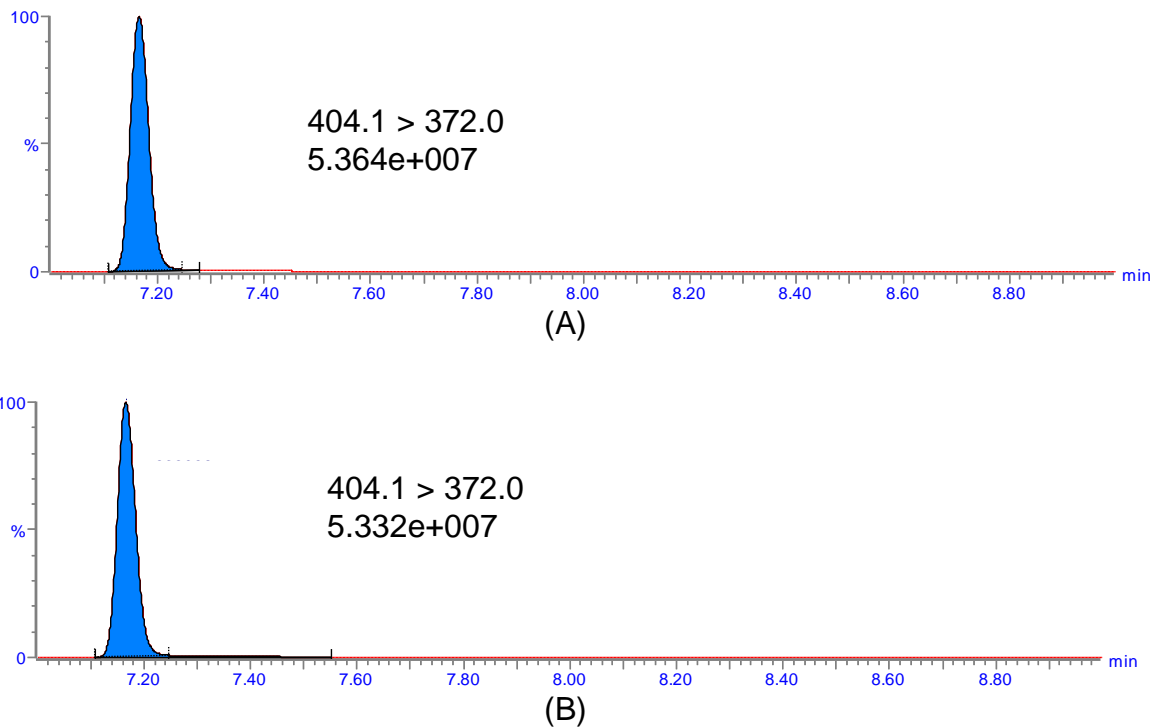


Figura 11 – Cromatogramas demonstrando as transições para os íons precursor e produto utilizadas para quantificar a azoxistrobina em solvente orgânico (A) e em extrato "branco" da matriz (B) na concentração de 100 ng mL⁻¹ e as intensidades dos sinais analíticos

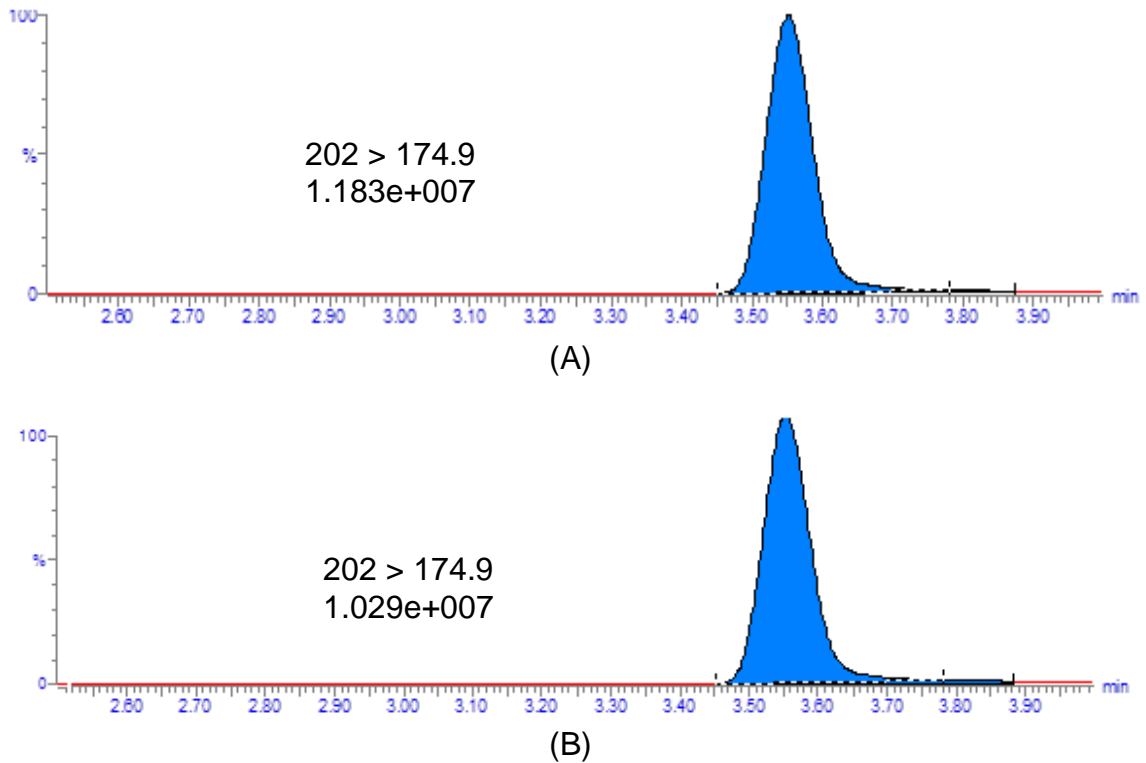


Figura 12 – Cromatogramas demonstrando as transições para os íons precursor e produto utilizadas para quantificar o tiabendazol em solvente orgânico (A) e em extrato “branco” da matriz (B) na concentração de 100 ng mL^{-1} e as intensidades dos sinais analíticos

A partir dos resultados apresentados na Tabela 10 é possível observar que todos os fungicidas estudados apresentaram percentuais de efeito matriz aceitáveis, ou seja, na faixa entre +20 e -20%, sem comprometer o resultado da análise. Também pode-se observar que o efeito matriz é em sua maioria negativo, isto é, é exercido um efeito de supressão do sinal analítico, diminuindo a intensidade do sinal através da interferência dos componentes da matriz.

Em casos onde o método analítico não está isento do efeito matriz e seja de objetivo quantitativo, aconselha-se que a construção das curvas analíticas sejam feitas na matriz em estudo (SANCO, 2013).

Tabela 10 - Percentuais obtidos para o efeito matriz calculado em cada nível de concentração da curva analítica.

Agrotóxicos	Nível 1 (%)	Nível 2 (%)	Nível 3 (%)	Nível 4 (%)	Nível 5 (%)	Nível 6 (%)	Nível 7 (%)	Média (%)
Azoxistrobina	- 2,7	1,4	0,1	0,6	1,8	- 1,8	-0,3	- 0,1
Carbendazim	- 21,5	21,9	10,7	-3,3	6,7	- 2,1	-3,7	1,2
Difenoconazol	- 4,7	- 17,0	5,2	1,2	1,0	- 0,9	0,9	- 2,1
Famoxadona	-	- 27,6	- 3,7	-10,8	- 9,7	- 9,3	-9,6	- 11,8
Piraclostrobina	-17,5	- 13,9	- 4,6	-1,9	- 0,9	- 4,6	-2,5	- 6,6
Tebuconazol	11,2	5,6	5,1	-1,2	- 3,2	- 2,2	-0,9	2,1
Tiabendazol	- 22,2	- 17,9	-13,2	-11,5	- 12,4	- 12,5	-11,9	- 14,5
Tiofanato-metílico	- 2,4	- 4,0	- 9,0	-7,9	25,9	- 7,2	-3,9	- 1,2
Trifloxistrobina	- 19,1	- 1,6	- 0,1	1,3	2,6	0,6	-0,9	- 2,4

4.2.5 Aplicação do método

Dos nove fungicidas avaliados neste trabalho, seis são permitidos pela lista da Produção Integrada dos Citros (PIC) para exportação de suco de laranja, os demais fungicidas, ou seja, carbendazim, tiofanato-metílico e famoxadona não são permitidos.

O método analítico validado foi aplicado para a determinação de fungicidas em 20 amostras reais, ou seja, de bebidas à base de laranja. Do total, 15 amostras foram de suco natural obtidos de frutas adquiridas em uma feira livre de produtos orgânicos e dois mercados (identificados como 1 e 2), sendo que foram coletadas cinco amostras de cada local e as coletas, realizadas semanalmente, durante cinco semanas.

Para os sucos processados, foi coletada uma amostra de suco concentrado em dois mercados diferentes (identificados como 3 e 4). As amostras de suco diluído foram preparadas a partir do suco concentrado. Também foi coletada uma amostra de suco integral, adquirida no mercado 4. Desta forma, foi possível efetuar uma investigação preliminar acerca da possível presença de resíduos dos fungicidas

estudados, tanto em sucos naturais quanto nos sucos processados que chegam à mesa do consumidor da cidade de Santa Maria/RS.

Nas amostras analisadas, foram encontrados resíduos dos fungicidas azoxistrobina, carbendazim, piraclostrobina, tebuconazol, trifloxistrobina e tiofanato-metílico em concentrações abaixo do LOQ_m (< LOQ). Destes fungicidas, o carbendazim, o tebuconazol e o tiofanato-metílico não tem uso permitido para a cultura de citros segundo a legislação americana, e a sua presença em laranjas e/ou sucos de laranja podem comprometer a exportação e, conseqüentemente, a economia brasileira.

Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 11, 12, 13, 14 e 15.

Tabela 11 – Resultados das amostras de suco de laranja natural obtido a partir das frutas, adquiridas em feira livre de produtos orgânicos.

Amostras					
Agrotóxicos	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 5
Azoxistrobina	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Carbendazim	n.d	n.d	n.d	<LOQ	<LOQ
Difenoconazol	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Famoxadona	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Piraclostrobina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Tebuconazol	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Tiabendazol	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Tiofanato-metílico	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d
Trifloxistrobina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

LOQ = Limite de quantificação

LOQ para azoxistrobina, famoxadona, piraclostrobina, tebuconazol, tiabendazol e trifloxistrobina = 10 µg kg⁻¹; carbendazim e difenoconazol = 20 µg kg⁻¹; tiofanato-metílico = 50 µg kg⁻¹.

n.d.= não detectado

Tabela 12 – Resultados das amostras de suco de laranja natural obtido a partir das frutas, adquiridas em mercado 1.

Amostras					
Agrotóxicos	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 5
Azoxistrobina	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Carbendazim	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d
Difenoconazol	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d
Famoxadona	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Piraclostrobina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Tebuconazol	<LOQ	n.d	<LOQ	n.d	<LOQ
Tiabendazol	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Tiofanato-metílico	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Trifloxistrobina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

LOQ = Limite de quantificação

LOQ para azoxistrobina, famoxadona, piraclostrobina, tebuconazol, tiabendazol e trifloxistrobina = 10 µg kg⁻¹; carbendazim e difenoconazol = 20 µg kg⁻¹; tiofanato-metílico = 50 µg kg⁻¹.

n.d.= não detectado

Tabela 13 – Resultados das amostras de suco de laranja natural obtido a partir das frutas, adquiridas em mercado 2.

Agrotóxicos	Amostras				
	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 5
Azoxistrobina	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d
Carbendazim	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d
Difenoconazol	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Famoxadona	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Piraclostrobina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Tebuconazol	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Tiabendazol	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d
Tiofanato-metílico	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Trifloxistrobina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

LOQ = Limite de quantificação

LOQ para azoxistrobina, famoxadona, piraclostrobina, tebuconazol, tiabendazol e trifloxistrobina = 10 µg kg⁻¹; carbendazim e difenoconazol = 20 µg kg⁻¹; tiofanato-metílico = 50 µg kg⁻¹.
n.d.=não detectado

Tabela 14 – Resultados das amostras de suco de laranja concentrado e diluído a partir do concentrado, adquiridos em mercado 3.

Agrotóxicos	Amostras	
	concentrado	diluído
Azoxistrobina	n.d	n.d
Carbendazim	n.d	n.d
Difenoconazol	n.d	n.d
Famoxadona	n.d	n.d
Piraclostrobina	<LOQ	<LOQ
Tebuconazol	<LOQ	<LOQ
Tiabendazol	n.d	n.d
Tiofanato-metílico	n.d	n.d
Trifloxistrobina	<LOQ	<LOQ

LOQ = Limite de quantificação

LOQ para azoxistrobina, famoxadona, piraclostrobina, tebuconazol, tiabendazol e trifloxistrobina = 10 µg kg⁻¹; carbendazim e difenoconazol = 20 µg kg⁻¹; tiofanato-metílico = 50 µg kg⁻¹.
n.d.=não detectado

Tabela 15 – Resultados das amostras de suco de laranja concentrado, diluído a partir do concentrado e integral, adquiridos em mercado 4.

Agrotóxicos	Amostras		
	concentrado	diluído	integral
Azoxistrobina	n.d	n.d	n.d
Carbendazim	<LOQ	n.d	<LOQ
Difenoconazol	n.d	n.d	n.d
Famoxadona	n.d	n.d	n.d
Piraclostrobina	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Tebuconazol	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Tiabendazol	n.d	n.d	n.d
Tiofanato-metílico	n.d	n.d	n.d
Trifloxistrobina	<LOQ	<LOQ	<LOQ

LOQ = Limite de quantificação

LOQ para azoxistrobina, famoxadona, piraclostrobina, tebuconazol, tiabendazol e trifloxistrobina = $10 \mu\text{g kg}^{-1}$; carbendazim e difenoconazol = $20 \mu\text{g kg}^{-1}$; tiofanato-metílico = $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

n.d.= não detectado

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 11, 12 e 13, percebe-se que os fungicidas piraclostrobina e trifloxistrobina foram encontrados em todas as amostras de suco de laranja natural, contudo não foi possível quantificar os níveis de contaminação, pois a concentração encontrada foi inferior ao LOQ_m. Ainda em algumas amostras de sucos de laranja natural foram encontrados os fungicidas carbendazim, tebuconazol, difenoconazol e tiofanato-metílico, que não são permitidos para a cultura de citros, conforme a legislação americana.

Ao analisar os sucos industrializados dos tipos concentrado, diluído e integral (resultados apresentados nas Tabelas 14 e 15) foram encontrados os fungicidas piraclostrobina, trifloxistrobina e tebuconazol em todas as amostras, em concentrações abaixo do LOQ_m. Ainda foi possível verificar a presença de carbendazim nos sucos concentrado e integral oriundos do mercado 5, ou seja, ao preparar o suco a partir do concentrado como indicado no rótulo do produto, suco concentrado:água (1:2, v/v), o consumidor estará ingerindo quantidades pequenas do fungicida carbendazim para dentro do seu corpo.

Considerando os aspectos econômicos, a grande preocupação está relacionada à presença de carbendazim no suco concentrado, já que trata-se da principal forma em que o suco é exportado para os EUA. Conforme já comentado

anteriormente, o carbendazim não é permitido pela lista PIC e no ano de 2013 foi substituído por outro princípio ativo, que atua da mesma maneira, porém é permitido pela legislação americana.

Atualmente, alimentos ou bebidas integrais são escolhidos pelo consumidor por serem, aparentemente, mais saudáveis, contudo no caso do consumo de sucos percebe-se que o suco integral apresentou contaminações em proporções semelhantes para os tipos de suco concentrado. Se fosse alcançado LOQ_m igual a 10 µg kg⁻¹ (menor nível de fortificação), seria possível quantificar os níveis de carbendazim e seria notório que o suco integral apresentasse concentrações mais elevadas do fungicida quando comparado com o suco concentrado.

CHIARADIA (2009), ao aplicar o método de extração QuEChERS e a técnica analítica de UPLC-MS/MS para determinar oito agrotóxicos, em sucos de laranja e tangerina, não encontrou quantidades detectáveis para os agrotóxicos estudados em amostras reais.

RIZZETTI (2013), após desenvolver um método analítico para determinar 76 agrotóxicos em suco de laranja integral empregando o método de QuEChERS e UPLC-MS/MS também aplicou o método para amostras reais. Das 14 amostras analisadas, 10 amostras apresentaram concentrações do fungicida carbendazim acima do LOQ, porém abaixo do LMR estabelecido pela legislação brasileira. Neste trabalho, também foi encontrado carbendazim em 5 amostras, contudo não foi possível quantificar, pelo fato desses valores estarem abaixo do LOQ_m.

Através do método validado, foi possível verificar a presença ou ausência dos fungicidas estudados em diferentes tipos de sucos a base de laranja. Tendo em vista que as legislações vigentes nos países que importam sucos de laranja aceitam diferentes limites destes fungicidas, percebe-se a importância em desenvolver métodos e aplicá-los a fim de verificar a qualidade do suco que está sendo produzido e, assim, preservar a saúde do consumidor, evitar problemas relacionados à barreiras fitossanitárias e atender as exigências requeridas pelo país que importa os produtos brasileiros.

5. CONCLUSÃO

Devido ao alto índice da incidência de pragas na cultura de citros, é comum o emprego de agrotóxicos para maximizar a produtividade. No entanto, ao aplicar estas substâncias, é possível que as mesmas permaneçam, mesmo que em níveis residuais, na fruta *in natura*, bem como em produtos processados. Desta forma, é de extrema importância desenvolver e validar métodos analíticos a fim de controlar a qualidade dos produtos com relação a presença de agrotóxicos, uma vez que as legislações dos países importadores podem diferir entre si.

O método de extração mini-Luke modificado mostrou-se eficaz para a extração dos nove fungicidas na matriz estudada.

Para os testes de linearidade, todos os analitos apresentaram equações com coeficiente de determinação (r^2) e coeficiente de correlação (r) maior que 0,99, para as curvas analíticas preparadas em solvente e em extrato “branco” da matriz, correspondendo aos critérios recomendados pelo INMETRO e pela ANVISA.

Através do preparo das soluções analíticas em solvente orgânico e no extrato “branco” da matriz, foi possível verificar que a maioria dos fungicidas estudados apresentou efeito matriz negativo, mas todos os valores permaneceram entre -20 e +20%, não influenciando os resultados.

O tiofanato-metílico apresentou percentuais de recuperação dentro da faixa aceita somente para o maior nível de fortificação ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$) enquanto que o carbendazim apresentou valores de recuperação maiores que 100%, justificando a conversão do tiofanato-metílico a carbendazim.

Os valores estimados para LOD e LOQ tanto para o instrumento quanto para o método, bem como os valores reais do LOQ_m , para todos os agrotóxicos foram iguais ou menores que os estabelecidos pelas legislações brasileira, americana e europeia. Dessa forma, o método validado poderá ser utilizado para os fins propostos a nível mundial.

Através dos resultados obtidos nos ensaios de fortificação e recuperação, pode-se dizer que o método é exato e preciso, uma vez que a maioria dos fungicidas apresentaram valores aceitáveis tanto para recuperação quanto para RSD.

O método validado foi aplicado para a determinação de fungicidas em amostras de diferentes tipos de suco. Todas as amostras apresentaram

contaminação por piraclostrobina e trifloxistrobina, no entanto, os níveis foram inferiores ao LOQ_m, não sendo possível, dessa forma, a quantificação destes agrotóxicos. Ainda, algumas amostras apresentaram contaminação por difenoconazol, carbendazim, tebuconazol e tiofanato-metílico, sendo que alguns destes podem vir a comprometer a exportação do produto, uma vez que a legislação americana não permite o uso destas substâncias.

Através deste trabalho foi possível constatar que estes sucos não estão em condições adequadas para serem exportados para os EUA.

Por fim, conclui-se que o método de extração mini-Luke modificado aliado ao moderno sistema UPLC-MS/MS é uma importante ferramenta para análise de resíduos de fungicidas em sucos de laranja naturais e processados, podendo ser empregado em análises de rotina.

6. DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos gerados no desenvolvimento deste trabalho foram encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da UFSM e sua destinação final ficaram sob responsabilidade de empresa terceirizada.

Foram gerados resíduos líquidos e resíduos sólidos. Os líquidos foram armazenados em frascos identificados como halogenados, não-halogenados e resíduos de acetona, enquanto que os resíduos sólidos foram colocados em sacos plásticos, devidamente identificados.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Miniaturizar o método de extração mini-Luke modificado e assim diminuir o gasto de solventes e a quantidade de resíduos gerados;
- Aumentar o escopo dos agrotóxicos;
- Utilizar outro P.I., uma vez que o agrotóxico propoxur é permitido na cultura de citros conforme a legislação europeia;
- Aplicar o método desenvolvido para determinar agrotóxicos em outras frutas cítricas como tangerinas, limões e limas, bem como em produtos processados à base destas frutas, além de aumentar o número de cada amostra analisada;
- Otimizar o método a fim de alcançar valores de LOQ inferiores a $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, tornando possível a quantificação do fungicida carbendazim em trabalhos de monitoramento, bem como diminuir o tempo de corrida cromatográfica a fim de analisar um maior número de amostras em um curto intervalo de tempo.

8. REFERÊNCIAS

ABNT NBR ISO/IEC 17025. **Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Disponível em: < file:///E:/nbr_iso_iec_17025_2005.pdf > . Acesso em 12 fev. 2014.

ALMEIDA, C. O. DE; PASSOS, O. S. **Citricultura brasileira em busca de novos rumos. Desafios e oportunidades na região Nordeste, 2011**. Disponível em < http://livraria.sct.embrapa.br/liv_resumos/pdf/00083440.pdf >. Acesso em 12 jan. 2013.

ANVISA. **Divulgado monitoramento de agrotóxicos em alimentos, 2009**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/150409_1.htm>. Acesso em: 05 mar. 2014.

ANVISA. **Seminário de mercado de agrotóxicos e regulação, 2012**. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/capadr/audiencias-publicas/audiencias-2012/rap-09-de-maio-de-2012-anvisa-agenor>>. Acesso em: 21 jan. 2013.

AUGUSTO, C. **Fungicida carbendazin trava exportação de suco de laranja brasileiro nos EUA**. Disponível em: <<http://www.fiesp.com.br/noticias/fungicida-carbendazin-trava-exportacao-de-suco-de-laranja-brasileiro-nos-eua/>>. Acesso em: 21 ago. 2012.

BARIZON, R. R. M.; SPADOTTO, C. A.; SOUZA, M. D. DE; QUEIROZ, S. C. N. DE; FERRACINI, V. L. **Análise das Violações encontradas em Alimentos nos Programas Nacionais de Monitoramento de Agrotóxicos**. Disponível em:<<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/960481/1/Doc92.pdf>>. Acesso em: 05 mar. 2014.

BASF. **The Chemical Company. Informativos técnicos: modo de ação-benzimidazóis, 2006**. Disponível em: <http://www.agro.basf.com.br/produtos/informativo/fungicidas/modo_de_acao_princ/benzimidazoles/benzimidazoles.asp?area=2>. Acesso: 28 mar. 2012.

BATTAGLIN, W. A.; SANDSTROM, M. W.; KUIVILA, K. M.; KOLPIN, D. W.; MEYER, M. T. Occurrence of Azoxystrobin, Propiconazole, and Selected Other Fungicides in US Streams, 2005–2006. **Water Air Soil Pollut**, v. 218, p. 307–322, 2011.

BRASIL. **DECRETO Nº 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002.** Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm>. Acesso em: 20 jan. 2014.

BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O. **Cadeia Produtiva de Frutas.** v. 7, Brasília-DF, 2007.

CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; RIZZOLO, A.; MULLER, N. M.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C. **Dossiê ABRASCO- Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1- Agrotóxicos, segurança alimentar e saúde.** Disponível em: <http://www.abrasco.org.br/UserFiles/Image/_Dossie%20abrasco%20port.pdf>. Acesso em 12 dez. 2013.

CHIARADIA, M. C. **Desenvolvimento, validação e aplicação de métodos para análise multirresidual de agrotóxicos em suco de laranja e tangerina utilizando CLAE-DAD, CL-EM-EM e CLUE-DAD.** Tese (Doutorado em Química Analítica). Universidade Estadual de Campinas, 2009.

CODEX ALIMENTARIUS. **Pesticide Residues in Food and Feed.** Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/pesticides/index.html?lang=em>>. Acesso em 23 dez. 2013.

CONAB. **Acompanhamento da Safra de Laranja – 2013/2014, 2013.** Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_09_14_40_40_boletim_laranja_2o_2013.pdf>. Acesso em 02 out. 2013.

COUTINHO, U. F. B.; GALLI, A.; MAZO, L. H.; MACHADO, S. A. S. Carbendazim e o meio ambiente: Degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 16, p. 63–70, 2006.

CRUZ, I.; VALICENTE, F. H.; VIANA, P. A.; MENDES, S. M. **Risco Potencial das Pragas de Milho e de Sorgo no Brasil.** Disponível em: <<http://www.embrapa.br/alerta-helicoverpa/Doc150.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

DEPEC-BRADESCO. **Suco de laranja, 2013.** Disponível em: <http://www.economiaemdia.com.br/EconomiaEmDia/pdf/infset_suco_de_laranja.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2013.

DREASSI, E.; ZANFINI, A.; ZIZZARI, A. T.; et al. Lc/Esi/Ms/Ms determination of postharvest fungicide residues in citrus juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 9, p. 1301–1306, 2010.

EMBRAPA. **Polpa e suco de frutas**. 1ª Edição ed. Distrito Federal- Brasília, 2003.
EMBRAPA. **Considerações sobre a produção de laranja no Estado de São Paulo**, 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Citricultura/35RO/35^aRO_Citricultura_Embrapa parte 3.pdf>. Acesso em: 21 ago. 2013.

EU. **EU Pesticides Databases**. Disponível em: <http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=activesubstance.selection>. Acesso em 23 dez. 2013.

FENOLL, J.; HELLÍN, P.; MARTÍNEZ, C. M.; FLORES, P. Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and citrus fruits by LC-MS/MS. **Chromatographia**, v. 72, p. 857–866, 2010.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. **Chromatographic Mass Spectrometry Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues**. Amsterdã, Holanda: Elsevier, 2005.

FERNANDES, V. C.; DOMINGUES, V. F.; MATEUS, N.; DELERUE-MATOS, C. Determination of Pesticides in Fruit and Fruit Juices by Chromatography Methods. An Overview. **Journal of Chromatography Science**, v. 49, p. 715–730, 2011.

FERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ, R.; PICÓ, Y.; MAÑES, J. Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of post-harvest fungicides in citrus fruits. **Journal of chromatography A**, v. 912, p. 301–310, 2001.

FERNÁNDEZ, R.; GARRIDO, A. F.; MARTÍNEZ, L. J. V.; ROMERO, R. G.; HERNÁNDEZ, E. M. T. E. One-year Routine Application of a New and Rapid Method Based on Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry to the Analysis of Selected Pesticides in Citric Fruits. **Analytical Sciences**, v. 25, p. 535–540, 2009.

FERRER, C.; MARTÍNEZ-BUENO, M. J.; LOZANO, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Pesticide residue analysis of fruit juices by LC-MS/MS direct injection. One year pilot survey. **Talanta**, v. 83, n. 5, p. 1552–1561, 2011.

FRANCO, G. **Tabela de Composição química dos alimentos**. 9ª Edição ed. São Paulo, 1992.

GARRIDO FRENICH, A.; MARTÍNEZ VIDAL, J. L.; FERNÁNDEZ MORENO, J. L.; ROMERO-GONZÁLEZ, R. Compensation for matrix effects in gas chromatography-tandem mass spectrometry using a single point standard addition. **Journal of chromatography A**, v. 1216, p. 4798–4808, 2009.

GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J. F.; MEZCUA, M.; MOLINA-DÍAZ, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Determination of postharvest fungicides in fruit juices by solid-phase extraction followed by liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 26, p. 10548–56, 2007.

GLOBO. **Suco: FDA encontra carbendazim em 11 amostras**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2012/01/suco-fda-encontra-carbendazim-em-11-amostras.html>>. Acesso em: 17 set. 2013.

GRAY, L. E.; OSTBY, J.; LINDER, R.; GOLDMAN, J.; REHNBERG, G.; COOPER, R. Carbendazim-induced alterations of reproductive development and function in the rat and hamster. **Fundamental and applied toxicology**, v. 15, p. 281–297, 1990.

HAJSLOVÁ, J.; ZROSTLÍKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra) trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of chromatography A**, v. 1000, p. 181–197, 2003.

HIEMSTRA, M.; JOOSTEN, J. A.; DE KOK, A. Fully Automated Solid-Phase Extraction Cleanup and On-line Liquid Chromatographic Determination of Benzimidazole Fungicides in Fruit and Vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 78, p. 1267–1274, 1995.

HIEMSTRA, M.; DE KOK, A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1154, p. 3–25, 2007.

HOLLOSI, L.; BOUSOVA, K.; ATES, E.; MITTENDORF, K. Determination of carbendazim and benomyl residues in oranges and orange juice by automated online sample preparation using TLX-LC-MS / MS. **Thermo scientific**, 2012. Dreiech, Germany.

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia Estatística, 2011.** Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1613&z=t&o=11>>. Acesso em: 27 out. 2012.

IBGE. **Lavouras, 2013.** Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201309c_omentarios.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2013.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE - 008, Rev. 01.** Disponível em: <http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao_inmetro.pdf>. Acesso em 12 jul. 2012.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008 revisão 04 - Jul/2011.** Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>. Acesso em: 26 set. 2013.

IPCS. **Toxicology and risks, 1998.** Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics1277.htm>>. Acesso em: 05 mar. 2012 .

IUPAC. **Global availability of information on agrochemicals, 2013.** Disponível em: < <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/54.htm>>. Acesso em: 12 mar. 2014.

JØRGENSEN, L. F.; KJÆR, J.; OLSEN, P.; ROSENBOM, A. E. Leaching of azoxystrobin and its degradation product R234886 from Danish agricultural field sites. **Chemosphere**, v. 88, p. 554–562, 2012.

JULIATTI, F. C. **Modo de ação dos fungicidas sobre plantas e fungos.** Disponível em: <[http://www.ipni.net/ppiweb/pbrazil.nsf/1c678d0ba742019483256e19004af5b8/4d4c7e5503f5a2c503256fdd004c4a8f/\\$FILE/Anais_Fernando_Juliatti.pdf](http://www.ipni.net/ppiweb/pbrazil.nsf/1c678d0ba742019483256e19004af5b8/4d4c7e5503f5a2c503256fdd004c4a8f/$FILE/Anais_Fernando_Juliatti.pdf)>. Acesso em: 13 jan. 2014.

KUGLER, H. Paraíso dos agrotóxicos. **Ciência Hoje**, v. 50, n. 296, p. 20-25, 2012.
KAZUSAKI, M.; UEDA, S.; TAKEUCHI, N.; OHGAMI, Y. Validation of analytical procedures by high – performance liquid chromatography for pharmaceutical analysis. **Chromatography**, v. 33, n. 2, p. 65 – 73, 2012.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; EICHENLAUB-RITTER, U.; DECORDIER, I. Indirect mechanisms of genotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 140-141, p. 63–74, 2003.

KOMÁREK, M.; EVA, Č.; CHRASTNÝ, V.; BORDAS, F.; BOLLINGER, J. Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. **Environment International**, v. 36, p. 138–151, 2010.

KUSSUMI, T. A. **Desenvolvimento de Método Multirresíduo para Determinação de Pesticidas Benzimidazóis, carbamatos e Triazinas em Milho por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem e sua Certificação**. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Materiais), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2007.

LUKE, M. A.; FROBERG, J. E.; MASUMOTO, H. T. Extraction and clean-up of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. **Journal of AOAC**, v. 58, p. 1020 – 1026, 1975.

MAPA. **Validação e Controle de Qualidade Analítica, 2011**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/RCA/Guia%20de%20valida%C3%A7%C3%A3o%20e%20controle%20de%20qualidade%20analitica.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2014.

MAPA. **Instrução Normativa No 27, De 11 de Dezembro de 2012**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/Ano%20safra%202012%20-%202013.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2014.

MCCARROLL, N. E.; PROTZEL, A.; IOANNOU, Y.; STOCK, F. H.; JACKSON, A. M.; WATERS, D. M.; DEARFIELD, L. K. A survey of EPA / OPP and open literature on selected pesticide chemicals III . Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim. **Mutation research**, v. 512, p. 1–35, 2002.

NAKAI, M.; MILLER, M.; CARNES, K.; HESS, R. Stage-specific effects of the fungicide carbendazim on Sertoli cell microtubules in rat testis. **Tissue and Cell**, v. 34, p. 73–80, 2002.

NETO, R.; DA S. C.; FARIA, J.; DE A. F. Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 19, 1999.

NEVES, F. M. (Coord.) **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia, 2010.

NIESSEN, W. M. A.; MANINI, P.; ANDREOLI, R. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, p. 881–899, 2006.

NOTÍCIAS AGRÍCOLAS. **Carbendazim: Fundecitrus orienta para a substituição de fungicida rejeitado pelos EUA, 2012**. Disponível em: <<http://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/laranja-citrus/101880-carbendazim-fundecitrus-orienta-para-a-substituicao-de-fungicida-rejeitado-pelos-eua.html#.UvWLFPI5M0U>>. Acesso em: 03 jan. 2014.

PIZZUTTI, I. R. **Validação de métodos multirresíduos de extração e desenvolvimento de métodos de purificação por GPC para análise de resíduos de pesticidas em soja utilizando GC-MS, GC-MS/MS e LC-MS/MS**, 2006. Tese (Doutorado em Química Analítica), Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

PIZZUTTI, I. R.; DE KOK, A.; HIEMSTRA, M.; WICKERT, C.; PRESTES, O. D. Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1216, n. 21, p. 4539–4552, 2009.

REICHERT, B. **Desenvolvimento e validação de método multirresidual para determinação de pesticidas em café verde utilizando GC-MS (NCI-SIM)**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

RIGHI, L. W. **Método multirresíduo para determinação de micotoxinas em vinho por UPLC-MS/MS**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIZZETTI, T. M. **Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Suco de Laranja Integral Empregando Método Quechers e UHPLC-MS/MS**. (Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

ROMERO-GONZÁLEZ, R.; GARRIDO FRENICH, A.; MARTÍNEZ VIDAL, J. L. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 76, n. 1, p. 211–225, 2008.

SÁNCHEZ-RASERO, F.; ROMERO, T. E.; DIOS, C. G. Liquid chromatographic determination of carbendazim in the presence of some normal soil constituents with photodiode-array detection. **Journal of Chromatography**, v. 538, p. 480–483, 1991.

SANCO. **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**, Document No. SANCO 12571, 2013.

SANDAHL, M.; MATHIASSEN, L.; JÖNSSON, J. A. Determination of thiophanate-methyl and its metabolites at trace level in spiked natural water using the supported liquid membrane extraction and the microporous membrane liquid-liquid extraction techniques combined on-line with high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography A**, v. 893, n. 1, p. 123–131, 2000.

SEPLAG. **Pêssego, laranja e tangerina (Atlas socioeconômico Rio Grande do Sul)**, 2012. Disponível em: <http://www.scp.rs.gov.br/atlas/conteudo.asp?cod_menu_filho=819&cod_menu=817&tipo_menu=ECONOMIA&cod_conteudo=1506>. Acesso em: 25 ago. 2013.

SILVA, C. M. M. DE S.; MELO, I. S. DE. Biodegradação de Fungicidas Benzimidazóis. **Microbiologia Ambiental**. 1^a ed, São Paulo, Ed. Embrapa-CNPMA, p.141, 1997.

SILVA, F. P. **Adequação de doses de fungicidas, volume de calda e intervalo de aplicação no controle da mancha**. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade), Fundecitros, Araraquara, 2013.

SINGH, R. P.; CHIBA, M. Determination of benomyl and its degradation products by chromatographic methods in water , wettable powder formulations , and crops. **Journal of Chromatography**, v. 643, p. 249–260, 1993.

SPÓSITO, M. B. **Dinâmica Temporal e Espacial da Mancha Preta (Guignardia citricarpa) e Quantificação dos Danos Causados à Cultura dos Citrus**. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2003.

TOLEDO, H. H. B. de; ROCHA, S. B.; KASSUMI, T. A.; LEMES, V, R, R. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4ª Edição ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, cap.20.

TURRA, C.; GHISI, F. **Laranja orgânica no Brasil: Produção, mercado e tendências**. Disponível em: < <http://www.sober.org.br/palestra/12/01P052.pdf> >. Acesso em: 15 fev. 2013.

USDA, United States Department of Agriculture. **Tolerances and exemptions for pesticide chemical residues in food**. Disponível em: < <http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=933a41ea645024102760159a36081108&node=40:25.0.1.1.27&rtn=div5#40:25.0.1.1.27.3.19.277> (EUA) >. Acesso em : 23 dez. 2013.

VENEZIANO, A.; VACCA, G.; ARANA, S.; SIMONE, F. DE; RASTRELLI, L. Determination of carbendazim, thiabendazole and thiophanate-methyl in banana (*Musa acuminata*) samples imported to Italy. **Food Chemistry**, v. 87, p. 383–386, 2004.

VINHAS, T. **Controle químico da Guignardia citricarpa , agente causal da mancha preta dos citros em frutos de laranja “ Valência ,”**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Fitossanidade), Fundecitros, Araraquara, 2011.

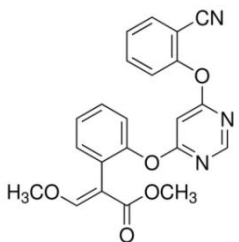
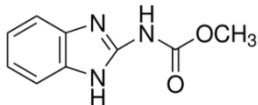
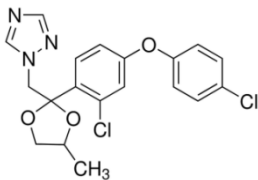
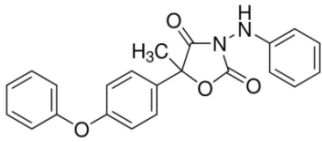
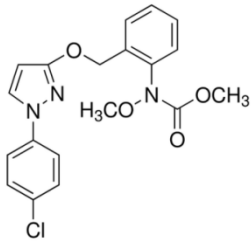
YAMANAKA, H. T. **Sucos Cítricos, 2005**. Disponível em: < http://www.crq4.org.br/downloads/sucos_citricos.pdf >. Acesso em: 15 jun. 2012.

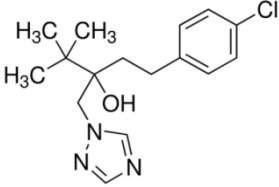
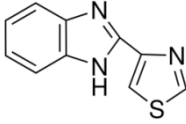
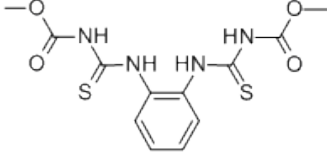
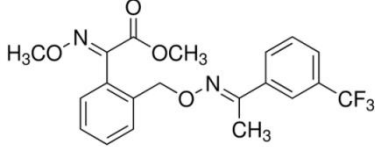
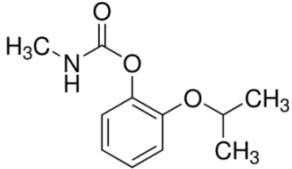
ZAMBOLIM, L.; NASSER, L. C. B.; ANDRIGUETO, J. R.; TEIXEIRA, J. M. A.; KOSOSKI, A. R.; FACHINELLO, J. C. **Produção integrada no Brasil: agropecuária sustentável alimentos seguros / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretária de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo**. 1ª edição ed. Brasília-DF, 2008.

ZULIAN, A.; DÖRR, A. C.; ALMEIDA, S. C. Citricultura e agronegócio cooperativo no brasil. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 11, n. 11, p. 2290–2306, 2013.

9. APÊNDICE

APÊNDICE 1 – Estrutura química, fórmula e massa molecular de cada um dos agrotóxicos utilizados.

Agrotóxicos	Estrutura	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g mol ⁻¹)
Azoxistrobina		C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	403,39
Carbendazim		C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	191,19
Difenoconazol		C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	406,26
Famoxadona		C ₂₂ H ₁₈ N ₂ O ₄	374,39
Piraclostrobina		C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	403,80

Agrotóxicos	Estrutura	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g mol ⁻¹)
Tebuconazol		C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	307,8
Tiabendazol		C ₁₀ H ₇ N ₃ S ₁	201,2
Tiofanato-metílico		C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S ₂	342,4
Trifloxistrobina		C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄	408,3
Propoxur (P.I.)		C ₁₁ H ₁₅ NO ₃	209,2

APÊNDICE 2- Avaliação da exatidão do método analítico.

Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentração da solução mistura (mg L^{-1})	Volume adicionado da solução mistura (μL)	Massa absoluta de agrotóxico adicionado à amostra (ng)	Quantidade de amostra (g)	Volume de solvente de extração (mL)	Concentração dos agrotóxicos antes da injeção (ng mL^{-1})	Fator do método
10	1	150	150	15	90	2	5
20	1	300	300	15	90	4	5
50	1	750	750	15	90	10	5