

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

Pimpinelli Jonco dos Santos

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS POR
GC-MS/MS EM PLANTAS MEDICINAIS EMPREGADAS
NA PRODUÇÃO DE FITOTERÁPICOS**

Santa Maria, RS

2018

Pimperelli Jonco dos Santos

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS POR GC-MS/MS EM
PLANTAS MEDICINAIS EMPREGADAS NA PRODUÇÃO DE FITOTERÁPICOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

**Santa Maria, RS
2018**

Santos, Pimperelli Jonco dos
DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS POR GC
MS/MS EM PLANTAS MEDICINAIS EMPREGADAS NA PRODUÇÃO DE
FITOTERÁPICOS / Pimperelli Jonco dos Santos.- 2018.
128 p.; 30 cm

Orientador: Osmar Damian Prestes
Coorientador: Renato Zanella
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2018

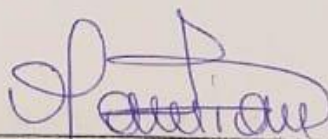
1. GC-MS/MS 2. fitoterápicos 3. plantas medicinais 4.
agrotóxicos I. Damian Prestes, Osmar II. Zanella, Renato
III. Título.

Pimperelli Jonco dos Santos

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS POR GC-MS/MS
EM PLANTAS MEDICINAIS EMPREGADAS NA PRODUÇÃO DE
FITOTERÁPICOS**

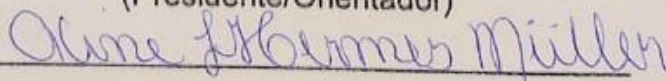
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau Mestre em Química.

Aprovada em 06 de agosto de 2018:

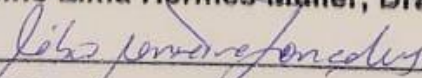


Osmar Damian Prestes, Dr. (UFSM)

(Presidente/Orientador)



Aline Lima Hermes Müller, Dra. (UFSM)



Fábio Ferreira Gonçalves, Dr. (FURG)

Santa Maria, RS
2018

DEDICATÓRIA

*A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim,
fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Osmar Damian Prestes, pela orientação, pela disponibilidade em ajudar e pela confiança depositada em mim para a elaboração deste trabalho. Obrigada por exigir de mim muito mais do que eu imaginava ser capaz de fazer.

Aos professores Dr. Renato Zanella e Dra. Martha Bohrer Adaime, por terem me dado a oportunidade de fazer parte do LARP e por terem colaborado com a realização deste trabalho.

Aos membros da banca Dra. Aline Lima Hermes Müller e Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves, pelas excelentes contribuições e comentários na banca examinadora da defesa desta Dissertação.

Aos meus pais Ademir e Marta, pelo apoio, força e amor incondicional. Sem vocês, a realização desse sonho não seria possível. Obrigada por tudo! Esta conquista também é de vocês!!

Aos meus irmãos, Ademir Jr. e Nedéia, que sempre me apoiaram e torceram por mim.

Ao meu namorado, Willian Verdi, pela compreensão e incentivo, por suportar os meus momentos de estresse e por ter acreditado em mim. Muito obrigada pelo companheirismo e carinho. Te amo!

Ao pessoal da Agilent Technologies Inc. Brasil, Dr. Celso Blatt, José Márcio Ribeiro e Mariana Baptistão, pelas recomendações, conselhos, ajuda com o manuseio do equipamento e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos amigos e colegas do LARP, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Agradeço de forma especial à Lucila, pela cumplicidade, conselhos, frases de motivação e por sempre me ajudar nos momentos que precisei. Às queridas amigas e ex-colegas de LARP, Janice Facco e Magali, pelo carinho, amizade e companheirismo. Aos amigos cariocas Paulo, Larissa e Állisson, pela parceria e amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da UFSM, pelos conhecimentos transmitidos durante toda a minha formação acadêmica.

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

À UFSM, que ao longo da minha formação acadêmica, ofereceu um ambiente de estudo agradável, motivador e repleto de oportunidades.

À CAPES pelo auxílio financeiro fornecido.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos”.

(Eleanor Roosevelt)

RESUMO

DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS POR GC-MS/MS EM PLANTAS MEDICINAIS EMPREGADAS NA PRODUÇÃO DE FITOTERÁPICOS

Autora: Pimperlioni Jonco dos Santos
Orientador: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

A utilização de plantas exóticas e brasileiras como recurso para fins terapêuticos na prevenção e tratamento de doenças têm sido avaliadas quanto à possibilidade de extração de compostos ativos vegetais, bem como a criação de medicamentos para uso humano. Estes medicamentos são denominados fitoterápicos. Dessa forma, o cultivo destas plantas para este fim, deve ser monitorado quanto ao uso de agrotóxicos. Atualmente, legislações brasileiras e internacionais vêm demonstrando interesse a esta questão de saúde pública. Conforme a RDC nº 26/2014, os medicamentos fitoterápicos devidamente registrados na ANVISA, devem ser submetidos à análise de resíduos de agrotóxicos. Neste estudo, propõe-se o método QuEChERS (do acrônimo inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) para extração e posterior determinação multirresíduo de agrotóxicos em *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa), *Ginkgo biloba* L. (ginkgo biloba), *Mikania glomerata* Spreng. (guaco) e *Matricaria chamomilla* (camomila). Neste método utilizou-se, 1 g de amostra em tubo de polipropileno de 50 mL e adicionou-se 10 mL de água ultrapura, seguido de agitação em vórtex por 1 min e posterior repouso por 15 min. Após, adicionou-se 10 mL de acetonitrila (ACN), e o tubo é agitado por 1 min. Adicionou-se 4 g de MgSO₄, 1 g de NaCl, 1 g de C₆H₅Na₃O₇.2H₂O, 0,5 g de C₆H₆Na₂O₇.1,5H₂O seguido de agitação vigorosa durante 1 min e depois centrifugação a 6.000 rpm, por 8 min a 4°C. Após, transferiu-se 1 mL do sobrenadante, para um tubo de polipropileno de 2 mL, contendo 150 mg CaCl₂ e 50 mg PSA. Após, realizou-se etapa de centrifugação a 10.000 rpm, por 8 min e 4°C. O extrato foi filtrado com filtro de nylon de 0,2 µm. Após a filtração, o extrato foi injetado no sistema cromatográfico GC-MS/MS. No método QuEChERS validado obteve resultados de recuperação na faixa de 70% a 120% e RSD de ≤ 20%. O limite de detecção e o limite de quantificação obtidos foram de 1,5 a 6 µg kg⁻¹ e 5 a 20 µg kg⁻¹. O método foi validado para *Ginkgo biloba* L. e foi aplicado para a extensão de escopo nas outras matrizes.

Palavras-chave: GC-MS/MS, fitoterápicos, plantas medicinais, agrotóxicos

ABSTRACT**DETERMINATION MULTIRESIDUE OF PESTICIDES BY GC-MS/MS IN MEDICINAL PLANTS EMPLOYED IN THE PRODUCTION OF PHYTOMEDICINES**

Author: Pimpurnelli Jonco dos Santos
Advisor: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

The use of exotic and Brazilian plants as a resource for therapeutic purposes in the prevention and treatment of diseases, have been evaluated as to the possibility of extracting plant active compounds, as well as the creation of medicinal products for human use. These medicines are called phytomedicines. So, the cultivation of these plants for this purpose should be monitored for the use of pesticides. Currently, Brazilian and international legislation has been showing interest in this public health issue. According to RDC n° 26/2014, the phytomedicines appropriately registered by ANVISA must be submitted to analysis of pesticide residues. In this study, we propose the QuEChERS method (an acronym for Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) for the extraction and subsequent multi-residue determination of pesticides in *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa), *Ginkgo biloba* L. (*Ginkgo biloba*) and *Mikania glomerata* Spreng. (guaco) and *Matricaria chamomilla* (chamomile). In this method, 1 g of sample was taken into a 50 mL polypropylene tube and 10 mL of ultrapure water was added, followed by vortexing for 1 min and then soaking for 15 min. After 10 mL of acetonitrile (ACN) was added, and the tube was stirred again for 1 min. 4 g of MgSO₄, 1 g of NaCl, 1 g of C₆H₅N₃O₇·2H₂O, 0.5 g of C₆H₆Na₂O₇·H₂O, followed by vigorous stirring for 1 min and then centrifugation at 6,000 rpm for 8 min at 4 °C. Afterwards, 1 mL of the supernatant was transferred to a 2 mL polypropylene tube containing 150 mg CaCl₂ and 50 mg PSA. After that, the centrifugation step was carried out at 10,000 rpm for 8 min at 4 °C. The extract was filtered with 0.2 µm nylon filter. After filtration, the extract was injected into the GC-MS/MS chromatographic system. In the validated QuEChERS method, it obtained recovery results in the range of 70 to 120% and RSD of ≤ 20%. The limit of detection and limit of quantification obtained were 1.5 to 6 µg kg⁻¹ and 5 to 20 µg kg⁻¹, respectively. The method was validated for *Ginkgo biloba* L. and was applied for the extension of scope in the other matrices.

Keywords: GC-MS/MS, phytomedicine, medicinal plants, pesticides

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quadro comparativo dos LMRs entre as Farmacopeias Europeia, Americana e Argentina com a lista do anexo V da RDC nº 105/2016	31
Tabela 2 - Métodos cromatográficos acoplados a detectores clássicos (ECD, NPD, FID, FPD) e a espectrometria de massas para a determinação de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais e seus respectivos limites de quantificação (LOQ) e classe química dos compostos analisados.....	36
Tabela 3 - Métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas em série (MS/MS) para a análise de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais.....	40
Tabela 4 - Métodos de preparo de amostra empregados na determinação de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais, com valores de recuperação (Rec) e classe química dos compostos analisados.....	42
Tabela 5 - Relação dos agrotóxicos em estudo, analisados por GC-MS/MS, com informações sobre pKa, Log K _{ow} , fórmula molecular, classe química e ação agrônômica.....	61
Tabela 6 - Testes de limpeza empregando d-SPE realizados após a definição do método de extração.....	68
Tabela 7 - Testes de limpeza em fase sólida (SPE) realizados após a definição do método de extração.....	70
Tabela 8 - Parâmetros avaliados na etapa de validação dos métodos descritos neste trabalho.....	71
Tabela 9 - Agrotóxicos analisados por GC-MS/MS, utilizando modo de aquisição SRM, com seus respectivos tempos de retenção (t _R), íons precursores e produtos para quantificação e identificação e energias de colisão (EC).....	73

Tabela 10 - Resultados obtidos na etapa de validação do método QuEChERS para os parâmetros de validação exatidão, precisão, precisão intermediária e robustez.....	99
Tabela 11 - Resultados obtidos na extensão do escopo do método QuEChERS para as demais plantas medicinais em estudo, com respectivas recuperações (Rec), RSD, coeficiente de determinação (r^2) e efeito matriz (EM).....	103

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fluxograma representativo do procedimento realizado para a análise gravimétrica, avaliando-se a eficiência de extração de coextrativos nos métodos QuEChERS original, acetato e citrato.....65
- Figura 2 - Fluxograma representativo para avaliação da eficiência de extração dos compostos selecionados em extrato de *Ginkgo biloba* L.....66
- Figura 3 - Avaliação visual dos extratos obtidos para cada uma das amostras de planta avaliadas (ginkgo, espinheira-santa, guaco e camomila) pelos métodos QuEChERS original, acetato e citrato, respectivamente.....77
- Figura 4 - Avaliação dos QuEChERS citrato, acetato e original nas matrizes em estudo, quanto à eficiência de extração de interferentes através do teste gravimétrico.....78
- Figura 5 - Cromatograma obtido por GC-MS em modo *scan* referente ao extrato do método QuEChERS citrato de *Ginkgo biloba* L.....80
- Figura 6 - Número de compostos recuperados na faixa de 70 a 120% para os testes de limpeza por d-SPE, avaliados no nível de fortificação de 20 µg kg⁻¹.....83
- Figura 7 - Sinal cromatográfico do Hexaclorobenzeno com seu respectivo tempo de retenção A) referente ao teste T12 e B) solução padrão 2 µg L⁻¹ em solvente (acetonitrila), demonstrando que o pico determinado em A) não corresponde ao B).....84
- Figura 8 - Cromatogramas obtidos a partir de injeções no sistema GC-MS/MS em modo *scan*, do extrato "branco" de *Ginkgo biloba* L. após etapa de limpeza com EMR Captiva e 100 mg Bond Elut NH₂ (T15); EMR Captiva, 100 mg Bond Elut NH₂ e 100 mg Na₂SO₄ (T17); EMR Captiva e 500 mg Bond Elut NH₂ (T16); BeCarbon/PSA (T14); EMR Captiva, 500 mg Bond Elut NH₂ e 100 mg Na₂SO₄ (T18) e EMR Captiva e BeCarbon/PSA (T19).....88

- Figura 9 - Recuperação (%) para os compostos Clordano-Trans, Clorfenvinfós, Endrin, Flusilazol, Heptacloro, Malationa, Metidationa, Metolacloro, Miclobutanil, Mirex e Vinclozolina, após realização dos ensaios de limpeza com cartuchos de SPE.....89
- Figura 10 - Cromatograma obtido por GC-MS/MS, modo SRM, para o composto atrazina em A) amostra branco e B) ponto da curva no nível de 50 µg L⁻¹ no extrato branco da matriz *Ginkgo biloba* L.....91
- Figura 11 - Efeito matriz dos resíduos de agrotóxicos avaliados no sistema GC-MS/MS, a partir de soluções preparadas em acetonitrila e na matriz *Ginkgo biloba* L.....93
- Figura 12 - Percentagem de compostos com recuperações e RSD dentro da faixa de 70 a 120% e ≤ 20%, respectivamente, para os níveis de fortificação 5, 10, 20 e 50 µg kg⁻¹ (n=6) na etapa de validação.....94
- Figura 13 - Fluxograma do método QuEChERS citrato utilizado neste estudo.....97
- Figura 14 - Composto A) clorpirifós obtido por GC-MS/MS em amostra real de guaco, com seu B) pico de confirmação e identificação.....106

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CI – Ionização química, do inglês *chemical ionization*

d-SPE – Extração em fase sólida dispersiva (do inglês *dispersive solid phase extraction*)

DAD – Detector por arranjo de diodos, do inglês *diode array detector*

EC – Energia de colisão

ECD – Detector por captura de elétrons, do inglês *electron capture detector*

EI – Ionização por elétrons, do inglês *electron ionization*

EMR-Captiva® - Do inglês, *enhanced matrix removal of lipids* – modo em cartucho

EMR-Lipid® – Do inglês, *enhanced matrix removal of lipids* – modo dispersivo

ESI – Eletronebulização, do inglês *electrospray ionization*

EP – Farmacopeia Europeia, do inglês *European Pharmacopoeia*

EUA – Estados Unidos da América

FD – Detector por fluorescência, do inglês *fluorescence detector*

FID – Ionização em chama, do inglês *flame ionization detector*

FPD – Detector fotométrico de chama, do inglês *flame photometric detector*

GC – Cromatografia gasosa, do inglês *gas chromatography*

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

GC-MS/MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em série, do inglês *gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry*

GCB – Carbono grafitizado, do inglês *graphitized carbon black*

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *high performance liquid chromatography*

IFAV – Insumos farmacêuticos ativos vegetais

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LARP – Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas

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

LLE – Extração líquido-líquido, do inglês *liquid-liquid extraction*

LMR – Limite máximo de resíduo

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

Log K_{ow} – Coeficiente de partição octanol/água

LOQ – Limite de quantificação, do inglês *limit of quantification*

m/z – Razão massa/carga

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

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

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

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

NF – Formulário Nacional, do inglês *National Formulary*

PC – Padrão de controle

PI – Padrão interno

pKa – Logaritmo negativo da constante de acidez

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PNPMF – Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

PSA – Amino primária secundária, do inglês *primary secondary amine*

PVPP – Polímero polivinilpirrolidona

QqQ – Analisador de massas do tipo triplo quadrupolo

QuEChERS – Acrônimo em inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*

r^2 – Coeficiente de determinação da reta

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

Rec – Valores de recuperação

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS

RENAME – Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

RSD – Desvio padrão relativo

S/N – Razão sinal/ruído, do inglês *signal/noise*

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

SLE – Extração sólido-líquido, do inglês *solid-liquid extraction*

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

SUS – Sistema Único de Saúde

TCD – Detector por condutividade térmica, do inglês *thermal conductivity detector*

t_R – Tempos de retenção

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria

USP – Farmacopéia Americana, do inglês *United States Pharmacopeia*

UV-vis – Detector de ultravioleta e visível

v/v – Razão volume/volume

v/v/v – Razão volume/volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 OBJETIVOS	22
1.1.1 Objetivo geral	22
1.1.2 Objetivos específicos.....	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 PLANTAS MEDICINAIS	23
2.2 MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS	24
2.2.1 Regulamentação para medicamentos fitoterápicos no Brasil	25
2.2.2 Padronização e segurança dos medicamentos fitoterápicos	26
2.2.3 Implementação e utilização de medicamentos fitoterápicos no Sistema Único de Saúde	27
2.3 PRESENÇA DE CONTAMINANTES EM PLANTAS MEDICINAIS	28
2.3.1 Presença de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais	28
2.3.2 Determinação de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais empregando métodos cromatográficos.....	33
2.3.2.1 <i>Cromatografia líquida e gasosa acopladas à espectrometria de massas para determinação de resíduos de agrotóxicos.....</i>	39
2.3.3 Métodos de preparo de amostra para determinação de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais.....	41
2.4 VALIDAÇÃO.....	53
2.4.1 Seletividade	53
2.4.2 Curva analítica e linearidade	53
2.4.3 Exatidão	54
2.4.4 Precisão	54
2.4.4.1 <i>Precisão intermediária.....</i>	54
2.4.4.2 <i>Repetitividade.....</i>	54

2.4.4.3 Reprodutibilidade	55
2.4.5 Robustez	55
2.4.6 Efeito matriz.....	55
2.4.7 Limite de quantificação e detecção	55
3 MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1 INSTRUMENTAÇÃO	57
3.2 REAGENTES, SOLVENTES, GASES E DEMAIS MATERIAIS UTILIZADOS.....	57
3.3 AMOSTRAS DE PLANTAS MEDICINAIS	59
3.4 COMPOSTOS SELECIONADOS E PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS	59
3.4.1 Utilização do Padrão Interno (PI) e Padrão de Controle (PC)	64
3.5 CONDIÇÕES DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO GC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM PLANTAS MEDICINAIS	64
3.6 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QUENCHERS PARA EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM PLANTAS MEDICINAIS.....	64
3.6.1 Avaliação do teste gravimétrico na etapa de partição/extração	64
3.6.2 Avaliação da eficiência de extração dos compostos selecionados para análise em plantas medicinais	66
3.6.3 Avaliação da remoção de interferentes na etapa de limpeza (clean up) do método QuEChERS em plantas medicinais.....	67
3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM PLANTAS MEDICINAIS POR GC-MS/MS	71
3.7.1 Método QuEChERS citrato modificado validado neste trabalho	71
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO GC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM PLANTAS MEDICINAIS	73
4.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QUENCHERS PARA EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM PLANTAS MEDICINAIS.....	76
4.2.1 Avaliação do teste gravimétrico na etapa de extração/partição	76
4.2.2 Avaliação da eficiência de extração do método QuEChERS em plantas medicinais para posterior determinação de agrotóxicos	81

4.2.3 Avaliação da remoção de interferentes na etapa de limpeza (clean up) do método QuEChERS em plantas medicinais	82
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM PLANTAS MEDICINAIS	90
4.3.1 Seletividade	90
4.3.2 Linearidade	90
4.3.3 Efeito matriz	92
4.3.4 Exatidão, Precisão e Precisão Intermediária	92
4.3.5 Limite de Quantificação e de Detecção	96
4.3.6. Robustez	96
4.3.7 Método QuEChERS citrato modificado validado neste trabalho	97
4.4 EXTENSÃO DO ESCOPO VALIDADO PARA OUTRAS PLANTAS MEDICINAIS	102
4.5 ANÁLISE EM AMOSTRAS REAIS	106
5 CONCLUSÕES	107
6 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS	109
7 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	110
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

1 INTRODUÇÃO

Através da história da humanidade, nota-se a utilização de plantas como recurso para fins terapêuticos na prevenção e tratamento de doenças. Além disso, percebe-se que no último século houve um aumento nos estudos científicos sobre plantas medicinais, com a finalidade de obtenção de novos medicamentos. Muitos destes estudos são provenientes de conhecimento popular a cerca de uma determinada planta. O Brasil apresenta-se mundialmente como um país com rica biodiversidade de plantas, porém sua flora é pouco aproveitada para a produção de fitoterápicos (OLIVEIRA, 2012).

Os medicamentos fitoterápicos, conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2017), são aqueles obtidos a partir de plantas medicinais. São obtidos empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. Como todos os medicamentos, os fitoterápicos são caracterizados pelo conhecimento da eficácia, dos riscos de seu uso, pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (OLIVEIRA e ROPKE, 2016). Assim, as plantas utilizadas como matéria-prima para a produção de fitoterápicos devem ser submetidas a um controle de qualidade quanto ao uso de agrotóxicos. Estes compostos são aplicados nas plantas para evitar e combater o ataque de possíveis pragas.

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA, através da RDC nº 105, de 31 de agosto de 2016, há necessidade de realizar análise de resíduos de agrotóxicos nas matérias-primas vegetais empregadas na produção de medicamentos fitoterápicos devidamente registrados no Brasil. Estão isentos os medicamentos fitoterápicos que são comprovadamente obtidos a partir de espécies vegetais provenientes de cultivo orgânico. O anexo V desta resolução traz a lista dos 250 agrotóxicos a serem analisados.

Não há registros até o momento de métodos oficiais para determinação de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais empregadas na produção de fitoterápicos no Brasil. Por outro lado, têm-se apenas o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais quando estas são usadas como alimentos (gingibre, alho, hortelã, entre outros). Segundo a RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, a determinação deve ser realizada em drogas vegetais e/ou derivados vegetais. Sendo assim, esta deve ser realizada em partes da planta onde as substâncias

responsáveis pela ação terapêutica estejam presentes, ou em produtos provenientes da extração da planta medicinal fresca, como óleos, infusões, ceras, extratos e outros.

A determinação de resíduos de agrotóxicos tem grande importância, uma vez que, permite a identificação e quantificação de compostos orgânicos em diferentes matrizes, como as plantas medicinais. As plantas medicinais apresentam uma composição química muito complexa, tornando-se um grande desafio frente ao desenvolvimento de métodos multirresíduo de agrotóxicos (ZUIN, YARIWAKE e LANÇAS, 2003).

A necessidade de realizar monitoramento de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais empregadas para a produção de medicamentos fitoterápicos apresenta grande importância em nível de saúde pública, pois tem como objetivo a prevenção do acesso da população a estes compostos químicos. Estes, normalmente, são encontrados em níveis baixos de concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$). O contato frequente a estes compostos, mesmo em baixas concentrações, pode trazer prejuízos à saúde (ŁOZOWICKA et al., 2014).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a aplicabilidade do método QuEChERS (do acrônimo em inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) associado a diferentes etapas de limpeza (extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) e extração em fase sólida (SPE)) como preparo de amostra na determinação multirresíduo de agrotóxicos em plantas medicinais utilizadas na produção de fitoterápicos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em série (GC-MS/MS).

1.1.2 Objetivos específicos

- Estudar as melhores condições para a determinação dos resíduos de agrotóxicos por GC-MS/MS;
- Avaliar as três versões do método QuEChERS (original, acetato e citrato) em relação a quantidade de coextrativos extraída das amostras de plantas medicinais empregadas na produção de fitoterápicos;
- Avaliar o efeito de diferentes sorventes (PSA, C18, GCB, EMR®) na etapa de limpeza da amostra por d-SPE e SPE;
- Avaliar os parâmetros envolvidos na validação do método analítico;
- Aplicar o método desenvolvido na determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de plantas medicinais comercializadas na Região de Santa Maria/RS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

Conforme Bettega e colaboradores (2011), a fitoterapia caracteriza-se pelo emprego de plantas, ou suas partes, com o intuito de prevenir, aliviar ou curar um processo patológico. No decorrer do processo evolutivo, o homem aprendeu a selecionar plantas para fins de alimentação e alívio de males e doenças. Este seguimento resultou no conhecimento do uso de plantas medicinais por diversas populações (FERREIRA e PINTO, 2010).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2017), as plantas medicinais são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade. Para usá-las é necessário ter conhecimento sobre a planta, como por exemplo, saber o local de coleta e como prepará-las.

Os ingredientes ativos presentes nas plantas medicinais podem ser encontrados em qualquer parte do vegetal como folhas, raízes, cascas, sementes e flores. As plantas medicinais podem ser consumidas por i) via oral na forma de infusão, maceração ou decocção; ii) inalação; ou iii) topicamente, em forma de compressas ou cataplasmas. Quanto à comercialização e consumo, grande parte das plantas medicinais é vendida em farmácias e em lojas de produtos naturais rotuladas industrialmente. Muitas vezes a comercialização é baseada em anúncios que asseguram seu uso por serem de fonte natural. (VEIGA JUNIOR, PINTO e MACIEL, 2005).

As plantas medicinais exercem grande importância no campo da medicina e farmacologia moderna. Em primeiro lugar, fornecem princípios ativos importantes que seriam dificilmente obtidos via síntese química. Além disso, os compostos provenientes das plantas podem sofrer modificações em sua estrutura, tornando-os menos tóxicos, além de aumentar sua potencialidade medicamentosa. Também, auxiliam na produção de medicamentos servindo como protótipos para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, com base às atividades terapêuticas a dos compostos originais (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

Diante disso, as plantas medicinais podem ser empregadas para o preparo e produção de medicamentos fitoterápicos. Conceitualmente, os medicamentos fitoterápicos são medicamentos elaborados exclusivamente com insumos farmacêuticos ativos vegetais (IFAV), ou seja, a partir de matérias-primas vegetais ativas (droga ou derivado vegetal) de plantas medicinais (BIRADAR, 2015; BRITO e RODRIGUES, 2015; BRASIL, 2014).

Geralmente, as formulações de fitoterápicos produzidas no Brasil, têm seu preparo a partir de plantas exóticas, uma vez que, há maior número de estudos e pesquisas já estabelecidos pela comunidade científica sobre a eficácia, segurança e estabilidade de seus compostos ativos. Outro fator que contribui para a preferência na fabricação de fitoterápicos com plantas exóticas é a grande dificuldade, por parte das indústrias farmacêuticas, ao acesso à biodiversidade brasileira. Isto ocorre devido à burocratização e penalização impostas por agências regulatórias do país. Além disso, o clima diversificado do Brasil permite o cultivo e produção de espécies importadas em diferentes regiões do país (OLIVEIRA et al., 2016; BRITO e RODRIGUES, 2015).

2.2 MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

Conforme a RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, os medicamentos fitoterápicos devem apresentar segurança e eficácia que sejam comprovadamente baseadas em evidências clínicas, além de apresentarem constância de sua qualidade. A produção de medicamentos fitoterápicos, normalmente, é realizada a partir da droga vegetal (presença de constituintes terapêuticos em plantas após o processo de coleta, estabilização e processamento, podendo apresentar-se na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada). Ainda, podem ser obtidos através do derivado vegetal (produto gerado a partir da extração da planta medicinal fresca ou da droga vegetal, o qual apresenta compostos com propriedades medicamentosas e, pode apresentar-se em diversas formas, como por exemplo, extrato, óleo fixo e volátil, cera, exsudato e outros). Além disso, os medicamentos fitoterápicos apresentam propriedades terapêuticas com finalidade curativa, profilática ou paliativa (BRASIL, 2014).

Os medicamentos fitoterápicos possuem componentes farmacologicamente ativos e adjuvantes farmacêuticos, os quais auxiliam na incorporação de agentes terapêuticos de fontes naturais para facilitar sua administração em sistemas biológicos. Para a escolha da forma farmacêutica (cápsula, comprimido, xarope, entre

outros) mais apropriada, deve-se considerar a eficácia e segurança do componente ativo, além de avaliar a via de administração mais adequada cuja aplicação seja simples e sua dose seja efetiva (TOLEDO et al., 2003).

Diversos países possuem sua atenção voltada ao uso de plantas medicinais como forma de tratamento de doenças, apesar do grande desenvolvimento voltado para fármacos sintéticos. Desde a década de 80, foram desenvolvidos métodos capazes de extrair e isolar compostos ativos de plantas, permitindo seu uso para pesquisa e criação de novos fármacos. Com isso, nos últimos anos houve uma revalorização do emprego de preparações fitoterápicas. Estas preparações são eficazes da mesma forma que os produtos sintéticos, porém, ao transformar a planta em medicamento, deve-se preservar a integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo sua potencialidade terapêutica e ação biológica. Deste modo, as indústrias farmacêuticas aprimoraram seus estudos para a produção de medicamentos fitoterápicos em escala industrial (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006; TOLEDO et al., 2003).

2.2.1 Regulamentação para medicamentos fitoterápicos no Brasil

No Brasil, a ANVISA é o órgão responsável pelo acompanhamento e elaboração das normas destes medicamentos. Nos últimos anos, a legislação para medicamentos fitoterápicos vem sofrendo mudanças quanto às etapas de produção e controle de qualidade. Através destas normas, obtém-se o controle sanitário no país para acompanhar e avaliar produtos de origem vegetal (CARVALHO et al., 2012).

A RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, é a legislação vigente que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Apenas as indústrias farmacêuticas certificadas pela ANVISA podem registrar e produzir estes medicamentos. Além disso, esta resolução estabelece parâmetros de controle de cada etapa de produção, desde a matéria-prima vegetal ativa (droga e derivados vegetais) até o produto acabado (medicamento fitoterápico) (CARVALHO et al., 2012; BRASIL, 2014).

2.2.2 Padronização e segurança dos medicamentos fitoterápicos

As plantas medicinais utilizadas na produção de medicamentos, são produtos estranhos ao organismo humano. Assim, são consideradas como xenobiótico. Dessa forma, é necessário obter comprovadamente a segurança e eficácia de seus produtos nas vias de biotransformação presentes no organismo. Após estudos comprobatórios

de sua potência terapêutica e garantia de seu uso em humanos, as plantas medicinais podem ser utilizadas para fabricação de medicamentos fitoterápicos (NICOLETTI et al., 2007).

Segundo Veiga Junior, Pinto e Maciel (2005) e Nicoletti e colaboradores (2007), as plantas medicinais podem desencadear diversos efeitos adversos em organismos humanos. Estas reações são associadas à falta de conhecimento da planta, como as condições de cultivo, a correta identificação farmacobotânica e a forma de utilização. Além disso, outros fatores como possibilidade de adulteração, informações insuficientes sobre as reações adversas, a posologia adequada relacionada ao período de utilização e, as interações medicamentosas entre plantas medicinais e medicamentos sintéticos, também contribuem para o aparecimento de intoxicações.

Com base nestas informações, nota-se a necessidade das indústrias farmacêuticas produtoras de medicamentos à base de plantas, em seguir critérios específicos. Estes devem ter a finalidade de padronizar as matérias-primas vegetais ativas e assegurar o emprego de fitoterápicos para o tratamento de enfermidades. Este cuidado deve-se em função da complexidade que os fitoterápicos apresentam, devido a grande diversidade de substâncias químicas presentes nas plantas. Por outro lado, há outros fatores que contribuem para a composição química das plantas, os quais podem torná-las não uniformes. Exemplos disso são a composição do solo, clima, sazonalidade, ação da luz e calor, entre outros. (SHARAPIN, 2000; SIMÕES et al., 2002; CARVALHO et al., 2012).

Conforme Selvi e Paramasivam (2017), a segurança e a qualidade dos materiais vegetais e dos medicamentos fitoterápicos são uma grande preocupação para as autoridades de saúde, indústrias farmacêuticas e ao público. Isto deve-se ao crescente uso mundial de fitoterápicos e a rápida expansão de seu mercado global. Em muitos países, onde o consumo de plantas medicinais é comum, sabe-se que podem ser tóxicas para o fígado, rins e outros tecidos, devendo portanto, serem usadas com precaução. No Brasil, a ANVISA toma as providências necessárias para que apenas fitoterápicos seguros e eficazes tenham acesso ao mercado (CAPASSO et al., 2000; CARVALHO et al., 2012).

A qualidade dos medicamentos fitoterápicos está relacionada a garantia da identidade do medicamento e a produção do efeito terapêutico desejado. A segurança

refere-se a probabilidade de não provocar danos ao organismo sob condições de uso adequadamente propostas, enquanto a eficácia é a capacidade de induzir um benefício clínico. Com isso, pode-se explorar o potencial toxicológico das plantas medicinais associado aos estudos de farmacovigilância, oferecendo vantagens para a promoção do uso racional de medicamentos fitoterápicos (CARVALHO et al., 2012; MOREIRA et al., 2014; CALIXTO, 2000).

Portanto, os estudos e conhecimentos obtidos, devem relacionar-se com o intuito de produzir medicamentos à base de plantas que sejam adequados, conforme os conceitos vigentes de qualidade. Devem conduzir sua total adequabilidade ao fim que se destinam em conjunto às normas dispostas, para alcançar a qualidade total do produto (TOLEDO et al., 2003).

2.2.3 Implementação e utilização de medicamentos fitoterápicos no Sistema Único de Saúde

No ano de 2006, a criação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC), trouxeram a oportunidade de discussão sobre a importância, dificuldades, facilidades e vantagens da implementação da prática de fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS). A PNPMF estimulou nacionalmente a criação de projetos e programas que colocassem esta modalidade terapêutica na rede pública (FIGUEREDO et al., 2014).

Diante disso, o Ministério da Saúde determinou algumas prioridades na análise de plantas medicinais, instituindo a fitoterapia como prática oficial da medicina. Também, orientou as Comissões Interinstitucionais de Saúde a realização da integração da fitoterapia nos serviços de atenção básica, servindo como opção à falta crônica de medicamentos no sistema, além de favorecer o conhecimento popular sobre o manejo de plantas medicinais e de preparações herbárias (OLIVEIRA e LEHN, 2015; FERREIRA et al., 2014).

Em decorrência a este fortalecimento, planejamento e compreensão da fitoterapia integrada ao SUS, o conhecimento dos profissionais de saúde sobre esta prática fez-se imprescindível, com o objetivo de promover a aceitação da comunidade usuária do sistema básico de saúde e o uso seguro das preparações herbárias pela população (CACCIA-BAVA et al., 2017).

O desenvolvimento de tecnologias e inovações com a utilização da biodiversidade vegetal brasileira, trouxe atenção à cadeia produtiva dos fitoterápicos, desde o cultivo até sua comercialização e dispensação. A partir disso, no ano de 2009 foi divulgada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS). Nela está presente a relação de 71 espécies de plantas utilizadas empiricamente no país. Entre estas 71 plantas, 12 espécies vegetais foram liberadas e publicadas na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), sendo escolhidas com base de sua utilização nos serviços de saúde estaduais e municipais e, por apresentarem comprovação de sua eficácia por meio de estudos etnofarmacológicos e científicos. Estas 12 espécies vegetais, são empregadas para a formulação de fitoterápicos e dispensadas pelo SUS desde 2012 (FERNANDES, FÉLIX e NOBRE, 2016; OSHIRO et al., 2016).

2.3 PRESENÇA DE CONTAMINANTES EM PLANTAS MEDICINAIS

Dentre as substâncias presentes nas espécies vegetais medicinais, há a possibilidade de desencadeamento de reações adversas provocadas pelos próprios constituintes das plantas ou, ainda, devido à presença de adulterantes ou contaminantes em preparações fitoterápicas. O aparecimento destes contaminantes tem efeito direto sobre a qualidade dos fitoterápicos. Exemplos destes podem ser citados, como resíduos de agrotóxicos, metais pesados, micotoxinas, metabólitos e derivados a partir de microorganismos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, entre outros. Logo, é importante que as plantas e seus produtos sejam livres de contaminantes, ou pelo menos, sejam controlados para prevenir seu uso em níveis não seguros (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006; TRIPATHY et al., 2015; KOSALEC, CVEK e TOMIĆ, 2005; ŁOZOWICKA et al., 2014).

2.3.1 Presença de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais

As plantas medicinais, equivalentemente comparadas a outros tipos de culturas vegetais, sofrem ataques de diversos tipos de pragas, como insetos e ervas daninhas. Portanto, os agrotóxicos são largamente empregados durante sua produção. São aplicados com a finalidade de garantir a produção da cultura, minimizar as perdas e proteger frente a ação de pragas. São encontrados a nível de resíduos em plantas medicinais frescas e secas (TRIPATHY et al., 2015).

Os agrotóxicos, conforme sua intenção de uso, podem ser classificados como inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, nematicidas, entre outros. Além disso, também podem ser classificados de acordo com sua classe química, como por exemplo, organoclorados, organofosforados, piretróides, neonicotinóides, carbamatos, triazinas, etc. Estes compostos químicos podem contaminar e acumular-se por longo período de tempo em frações bióticas e abióticas, podendo assim, atingir a espécie humana. A persistência está relacionada com a característica lipofílica que alguns destes compostos apresentam, além de serem lentamente degradados no meio ambiente (KOSALEC et al., 2009).

De acordo com ANVISA (2016), os resíduos de agrotóxicos são um dos principais contaminantes em plantas medicinais e fitoterápicos, sendo necessário seu controle com o propósito de obter produtos de origem vegetal de qualidade. Os artigos 13 e 15 da RDC nº 26/2014, mencionam a exigência de apresentação dos resultados de análise de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais empregadas na produção de fitoterápicos, de modo a proteger a saúde do consumidor destes produtos no Brasil. A RDC nº 105, de 31 de agosto de 2016 cita que a análise deve ser apresentada para os medicamentos fitoterápicos devidamente registrados na ANVISA. Além disso, esta resolução traz a lista dos 250 agrotóxicos que devem ser analisados. Nesta lista encontram-se agrotóxicos de diferentes classes químicas. Portanto, o desenvolvimento de método multirresíduo é um grande desafio na área analítica.

A determinação de resíduos de agrotóxicos em fitoterápicos é importante no controle de qualidade, assim como testes de teor e identificação. As análises e emissão de laudos devem ser realizados a cada lote de produto. Segundo a RDC nº 105/2016, a partir de 1º de janeiro de 2018, deve-se incluir os resultados destes ensaios nos laudos de controle de qualidade, prazo este, revogado através da RDC nº 196, de 22 de dezembro de 2017. Apenas serão isentos desta regulamentação, os fitoterápicos cujas plantas foram produzidas sob cultivo orgânico, por meio de certificação das etapas envolvidas durante a produção (BRASIL, 2016; BRASIL, 2017).

Os resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais usadas para a produção de medicamentos fitoterápicos, geralmente estão presentes em baixas concentrações. No entanto, o acúmulo destes compostos em plantas medicinais, provocam efeitos

nocivos ao vegetal e também à saúde humana. A exposição humana a estes compostos pode acarretar efeitos aditivos ou sinérgicos ao organismo, possibilitando convulsões, irritações na pele, desmaios, paralisia muscular, e em casos de exposições prolongadas, lesões hepáticas e cerebrais, ruptura endócrina, infertilidade, como também, provocar efeitos carcinogênicos e teratogênicos. Além disso, a presença destas substâncias químicas pode afetar o desenvolvimento, produção e, conseqüentemente, a qualidade dos medicamentos fitoterápicos (RAO; KUMARMEENA e GALIB, 2011; TRIPATHY et al., 2015; SELVI e PARAMASIVAM, 2017).

Com o propósito de assegurar a saúde do consumidor de plantas medicinais e de preparações fitoterápicas, autoridades internacionais estabelecem limites máximos de resíduos (LMRs) para determinados agrotóxicos, conforme a Tabela 1 abaixo. O Brasil, atualmente, adota as normas propostas pelas Farmacopéias Europeia, Americana ou Argentina, uma vez que, não define LMRs e nem apresenta métodos analíticos de análise para plantas medicinais. Entretanto, o fato da legislação e/ou a Farmacopéia Brasileira não apresentar métodos analíticos e não determinar LMRs de agrotóxicos em plantas medicinais e seus produtos, não significa que a presença destes compostos seja tolerada no país (ŁOZOWICKA et al., 2014; ZUIN e VILEGAS, 2000).

Tabela 1 - Quadro comparativo dos LMRs entre as Farmacopeias Europeia, Americana e Argentina com a lista do anexo V da RDC nº 105/2016 (BRASIL, 2016).

Composto^a	Farm. Europeia (mg kg⁻¹)	Farm. Americana (mg kg⁻¹)^b	Farm. Argentina (mg kg⁻¹)^c	Está no anexo V (RDC nº 105/2016)?
Alacloro	0,02	0,05	0,02	Sim
Aldrin e Dieldrin (soma)	0,05	0,05	0,05	Sim
Azinfós-metil	1,00	1,00	1,00	Sim

Composto^a	Farm. Europeia (mg kg⁻¹)	Farm. Americana (mg kg⁻¹)^b	Farm. Argentina (mg kg⁻¹)^c	Está no anexo V (RDC n° 105/2016)?
Bromopropilato	3,00	3,00	3,00	Sim
Clordano (soma cis, trans e oxi)	0,05	0,05	0,05	Sim
Clorfenvinfós	0,50	0,50	0,50	Sim
Clorpirifós	0,20	0,20	0,20	Sim
Clorpirifós-metil	0,10	0,10	0,10	Sim
Cipermetrina (e isômeros)	1,00	1,00	1,00	Sim
DDT (soma p,p; o,p; p,p DDE)	1,00	1,00	1,00	Sim
Deltametrina	0,50	0,50	0,50	Sim
Diazinona	0,50	0,50	0,50	Sim
Diclorvós	1,00	1,00	1,00	Sim
Ditiocarbamatos	2,00	2,00	2,00	Sim
Endossulfan (soma dos isômeros e sulfato)	3,00	3,00	3,00	Sim
Endrin	0,05	0,05	0,05	Sim
Etiona	2,00	2,00	2,00	Sim
Fenitrotiona	0,50	0,50	0,50	Sim
Fenvalerato	1,50	1,50	1,50	Sim
Fonofós	0,05	0,05	0,05	Não
Heptacloro (soma de heptacloro e epóxido)	0,05	0,05	0,05	Sim
Hexaclorobenzeno	0,10	0,10	0,10	Sim
Hexaclorociclohexano isômeros (exceto gama)	0,30	0,30	0,30	Sim
Lindano	0,60	0,60	0,60	Sim
Malationa	1,00	1,00	1,00	Sim
Metidationa	0,20	0,20	0,20	Sim
Parationa	0,50	0,50	0,50	Sim
Parationa metílica	0,20	0,20	0,20	Sim

Composto^a	Farm. Europeia (mg kg⁻¹)	Farm. Americana (mg kg⁻¹)^b	Farm. Argentina (mg kg⁻¹)^c	Está no anexo V (RDC nº 105/2016)?
Permetrina	1,00	1,00	1,00	Sim
Fosalona	0,10	0,10	0,10	Sim
Piperonil butóxido	3,00	3,00	3,00	Não
Pirimifós metílico	4,00	4,00	4,00	Sim
Piretrinas (soma)	3,00	3,00	3,00	Não
Quintozeno	1,00	0,05	1,00	Sim

FONTE: USP 40—NF 35, 2016; EP, 2017; ANMAT, 2013.

^a A lista está baseada nos compostos presentes na Farmacopeia Europeia.

^b Há outros compostos na lista.

^c Segue a lista da Farmacopeia Europeia.

O avanço tecnológico e científico dos procedimentos analíticos possibilitou a realização de monitoramento multirresíduo de agrotóxicos em uma ampla gama de matrizes vegetais medicinais (TRIPATHY et al., 2015). Em sua grande maioria, os métodos desenvolvidos são originários de países orientais, onde a medicina natural tradicional permanece como escolha para tratamento de doenças.

Por outro lado, no Brasil há carência de pesquisas analíticas focadas na flora brasileira. Em consequência disso, não há muitos estudos detalhados sobre a segurança, potência medicamentosa, aplicabilidade e também, registro de plantas como medicamento fitoterápico. Este parecer reflete-se à inevitabilidade de desenvolvimento de métodos analíticos adequados envolvendo não somente a análise da presença de compostos tóxicos endógenos, mas também análise de resíduos de agrotóxicos nas espécies vegetais (ZUIN, YARIWAKE e LANÇAS, 2003).

A determinação analítica de resíduos de agrotóxicos possui grande importância, pois envolve a identificação e quantificação destes compostos em matrizes complexas, como as plantas medicinais e os medicamentos fitoterápicos. Além disso, o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais usadas na fabricação de fitoterápicos, tem importância a nível de saúde pública. Esta avaliação tem a finalidade de proteger e prevenir o acesso da população a estes compostos, quando apresentam-se em concentrações que podem colocar em risco à saúde do consumidor (ŁOZOWICKA et al., 2014).

2.3.2 Determinação de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais empregando métodos cromatográficos

A cromatografia é um método físico-químico que promove a separação de componentes presentes em amostras complexas. Dentre as diversas técnicas de separação empregadas para a determinação de compostos orgânicos, como os resíduos de agrotóxicos, em diferentes tipos de matrizes, destacam-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) e a Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*).

Em GC, a separação dos componentes da amostra baseia-se na diferença de distribuição destes entre uma fase estacionária (líquida ou sólida) e uma fase móvel (FM) gasosa. Dessa forma, a amostra é eluída através de um fluxo de gás inerte (geralmente He, N₂), promovendo a separação dos analitos de interesse com base em seu tempo de retenção. Esta técnica é aplicável para compostos orgânicos voláteis ou volatizáveis que apresentam estabilidade térmica, sendo amplamente empregada para análise e determinação de resíduos de agrotóxicos em inúmeras matrizes (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2009).

Diferentemente da GC, a separação dos componentes na HPLC ocorre de acordo com a sua solubilidade e afinidade pela fase móvel líquida. Compostos que apresentam características polares e baixa volatilidade, podem ser determinados por este tipo de cromatografia (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2009).

Ambas as modalidades, apresentam a possibilidade de combinar-se a diversos tipos de sistemas de detecção que permitem a realização das análises. Exemplos disso são o detector de ionização em chama (FID, do inglês *flame ionization detector*), detector por condutividade térmica (TCD, do inglês *thermal conductivity detector*), detector fotométrico de chama (FPD, do inglês *flame photometric detector*) e detector por captura de elétrons (ECD, do inglês *electron capture detector*) – para cromatografia à gás – detector de ultravioleta e visível (UV-vis), detector por arranjo de diodos (DAD, do inglês *diode array detector*) e detector por fluorescência (FD, do inglês *fluorescence detector*) – para cromatografia líquida (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2009).

Além disso, ambas as técnicas podem ser acopladas à espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*). A MS apresenta-se como uma técnica

rápida, sensível e eficiente, na qual permite a detecção de moléculas a partir da medida da razão sinal/ruído (S/N, do inglês *signal/noise*) de seus íons. Também, esta técnica pode ser usada em análises quantitativas para a avaliação de baixas concentrações de compostos orgânicos, como os resíduos de agrotóxicos (WONG; SO e YAO, 2016). Dessa forma, a MS tornou-se uma das ferramentas analíticas mais empregadas para a determinação de resíduos de agrotóxicos em níveis inferiores a $\mu\text{g L}^{-1}$, proporcionando alta sensibilidade, seletividade e especificidade em análises químicas de matrizes complexas (MASIÁ; BLASCO e PICÓ, 2014).

Nos últimos anos, diversos avanços tecnológicos na área de cromatografia foram desenvolvidos, buscando obter determinações cromatográficas mais rápidas, seletivas e eficientes. Na área de GC, houve progressos no desenvolvimento de novos métodos, buscando diminuir o custo das análises em relação aos sistemas de GC convencional. O uso de colunas reduzidas (≤ 20 m de comprimento e $\leq 0,2$ mm de diâmetro interno), taxas de aquecimento no forno mais rápidas ou velocidades lineares de gás carreador mais elevadas, contribuem para o aumento da sensibilidade do equipamento, quando avaliadas e otimizadas frente ao método proposto de análise. Além disso, o aquecimento da coluna cromatográfica pode ser realizado de modo direto e usam-se colunas planares, diferentemente do que ocorre em GC convencionais, em que o forno de aquecimento promove o aumento da temperatura do ar, para então, proporcionar o aquecimento da coluna. A necessidade de realizar mudanças nos tempos de retenção dos compostos em GC convencionais, atualmente, é contornada com o uso de “pré-colunas” em que podem ser facilmente trocadas, evitando a exigência de cortar a coluna cromatográfica (HAKME et al., 2017).

A Tabela 2 mostra os métodos cromatográficos e os detectores empregados na análise de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais.

Em relação aos detectores clássicos, nota-se maior número de trabalhos realizados em GC-ECD para plantas medicinais. A partir disso, pode-se dizer que há grande presença de organoclorados nas plantas medicinais, uma vez que, estes compostos são detectados por este tipo de detector. Além disso, o uso do MS têm crescido na última década, devido às suas vantagens de detecção inequívoca e quantificação simultânea de compostos orgânicos de diferentes classes químicas.

Tabela 2 - Métodos cromatográficos acoplados a detectores clássicos (ECD, NPD, FID, FPD) e a espectrometria de massas para a determinação de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais, com seus respectivos limites de quantificação (LOQ) e classe química dos compostos analisados.

Matriz	Equipamento	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Classe química	Referência
<i>Morinda officinalis</i>	GC-ECD	0,05 – 8,00	OCs e PRT	Liu et al., 2015.
<i>Radix astragali</i> , <i>Radix glycyrrhizae</i> , <i>Radix Rehmanniae</i> , <i>Flos chrysanthemi</i> , <i>Fructus crataegi</i> , <i>Fructus gardeniae</i> , <i>Fructus lycii</i> , <i>Cortex phellodendri</i> , Gênero <i>Gingko</i> , <i>Herba Leonuri</i>	GC-ECD	-	OCs	Sun et al., 2007. ^a
<i>Panax ginseng</i>	GC-ECD	0,33 – 1,33	CIAr, DCX	Qi, 2010.
80 espécies vegetais	GC-ECD	1,33 – 6,99	OCs	Xu et al., 2011.
<i>Withania somnifera</i> (L.) Dunal, <i>Ocimum sanctum</i> L. e <i>Achyranthes aspera</i> L.	GC-ECD	2 – 6 $\mu\text{g/mL}$	OCs	Abhilash e Singh, 2008
<i>Mentha piperita</i> L.	GC-ECD/NPD	4 – 53	M	Słowik-Borowiec, 2015.
<i>Panax ginseng</i> (C. A. Meyer)	GC-ECD/NPD	3 – 200	M	Park et al., 2007.
<i>Matricaria chamomilla</i> L., Gênero <i>Tilia</i> , <i>Pulmonaria</i> L., <i>Melissa</i> L., <i>Mentha piperita</i> L., <i>Thymus vulgaris</i> L.	GC- μ ECD/NPD	5 - 40	M	Łozowicka et al., 2014.
<i>Anethum graveolens</i> , <i>Cassia obovata</i> , <i>Carum carvi</i> , <i>Foeniculum vulgare</i> , <i>Mentha arvensis</i> , <i>Mentha longifolia</i>	GC-FID	180 – 240 $\mu\text{g/mL}$	OPs	Mosaddegh, Emami e Asghari, 2014.
<i>Flos chrysanthemi</i> , <i>Semen armeniacae amarum</i> , <i>Semen sinapis</i> e <i>Radix astragali</i>	GC-FPD	3 – 31	OPs	Wan et al., 2010.

Matriz	Equipamento	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Classe química	Referência
<i>Pogostemon cablin</i>	GC-FPD	0,01 – 0,04	OPs	Yang et al., 2015.
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	GC-MS	0,06 – 13,05	OCs e PRT	Zhang et al., 2010.
<i>Radix astragali</i>	GC-MS	0,3 – 10	OCs, OPs, PRT e CB	Mao et al., 2012.
<i>Zataria multiflora</i> , <i>Matricaria recutita</i> , <i>Borage officinalis</i> , <i>Mentha spicata</i> e <i>Cuminum cyminum</i>	GC-MS	-	OPs	Sarkhail et al., 2012. ^a
<i>Zataria multiflora</i> , <i>Matricaria recutita</i> , <i>Borage officinalis</i> e <i>Mentha spicata</i>	GC-MS	0,9 – 1,5	OPs	Ahmadkhaniha et al., 2012.
<i>Hyptis pectinata</i>	GC-MS	0,05 – 0,10 $\mu\text{g/g}$	AnP, TZ, SAm, T e E	Aquino et al., 2010.
<i>Hyptis pectinata</i>	GC-MS	0,05 – 0,10 $\mu\text{g/g}$	AnP, TZ, SAm, T e E	Aquino et al., 2011.
<i>Acanthopanax senticosus</i> , <i>Morus alba</i> L., <i>Hovenia dulcis</i>	GC-MS	5 – 75	M	Nguyen et al., 2010.
<i>Pueraria thomsonii</i> Benth, <i>Panax</i> <i>notoginseng</i> (Burk.) F.H. Chen, <i>Astragalus</i> <i>mongholicus</i> (Fisch.) Bge., <i>Salvia</i> <i>miltiorrhiza</i> Bge.	GC-MS	10 – 52	M	Du, Song e Wang, 2011.
<i>Cynara cardunculus</i> L.	GC-MS	15 – 75	M	Machado et al., 2017.

Matriz	Equipamento	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Classe química	Referência
<i>Withania somnifera</i> , <i>Cassia angustifolia</i> , <i>Plantago ovata</i> e <i>Andrographis paniculata</i>	GC-MS	10 – 69	OCs, OPs, E e DN	Tripathy, Saha e Kumar, 2017.
<i>Radix Gentianae</i> , <i>Cortex Phellodendri</i> , <i>Fritillariae ussuriensis</i>	GC-MS	0,33 – 10,10	OCs, OPs e PRT	Dai et al., 2011
<i>Panax quinquefolius</i> , <i>Panax ginseng</i>	GC-MS	0,16 – 1,66	OPs	Wong et al., 2007
	GC-FPD	0,08 – 0,16 $\mu\text{g/g}$		
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	GC-MS	< 20	OCs, OPs, CIAr, PRT e SAm	Shoeibi et al., 2013.
<i>Cordia salicifolia</i>	GC-MS	150 – 250	OPs, CB, PRTe DF	Carvalho et al., 2010.
<i>Lonicera japonica</i> Thunb.	GC-MS	0,20 – 166,7	M	Li et al., 2017.
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	GC-MS	3 – 80	OCs, OPs e PRT	Huo et al., 2016.
<i>Mikania laevigata</i> , <i>Maytenus ilicifolia</i> e <i>Cordia verbenacea</i>	GC-MS	3 – 30	OCs	Rodrigues et al., 2007
<i>Rhei rhizoma</i> , <i>Puerariae radix</i> , e <i>Cassiae</i> <i>semen</i>	GC-MS	< 50	OCs, OPs e PRT	Tagami et al., 2008.
<i>Herba epimedii</i>	GC-MS	0,16 – 17,93	OCs	Guo et al., 2010
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	GC-MS	0,99 – 1198	M	Yang et al., 2009
<i>Corydalis Rhizoma</i> , <i>Chuanxiong Rhizoma</i> e <i>Angelicae sinensis Radix</i>	LC-MS	1 – 5	M	Liu et al., 2016.

^a Limites de quantificação e de detecção não informados pelos autores. / OCs: organoclorados; OPs: organofosforados; PRT: piretróides; ClAr: cloroaromáticos; DCX: dicarboximida; CB: carbamatos; AnP: anilinopirimidina; TZ: triazina; SAm: sulfamida; T: triazol; E: estrobilurina; DN: dinitroanilina; DF: difenil éter; M: multiclasse (mais de 5 classes químicas).

2.3.2.1 Cromatografia líquida e gasosa acopladas à Espectrometria de Massas para determinação de resíduos de agrotóxicos

Conforme anteriormente citado, a espectrometria de massas destaca-se dentre os sistemas de detecção, devido à versatilidade de seu uso em ambas as técnicas cromatográficas, permitindo assim, a hifenização de técnicas (GC-MS, do inglês *Gas chromatography coupled to mass spectrometry* e LC-MS, do inglês *Liquid chromatography coupled to mass spectrometry*). Chiaradia e colaboradores (2008) destacam que estas ferramentas de análise favorecem a determinação seletiva e sensível de compostos orgânicos em diferentes matrizes complexas, como as plantas medicinais.

Em síntese, o espectrômetro de massas é composto de uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector. Basicamente, a fonte de ionização gera íons de compostos orgânicos ou inorgânicos. A separação destes ocorre de acordo com a sua respectiva razão massa/carga (m/z) no analisador de massas, seguida por sua detecção qualitativa, quantitativa e abundância. A confiabilidade na detecção de moléculas a partir da medição da m/z dos íons faz da MS uma técnica adequada para a avaliação de um grande número de analitos em uma mesma matriz (WONG, SO e YAO, 2016; GROSS, 2004).

Recentemente, o uso da GC-MS em análises de plantas medicinais tem aumentado, por esta técnica demonstrar ser aplicável para a determinação de compostos voláteis, compostos apolares e polares (AL-RUBAYE; HAMEED e KADHIM, 2017). Outra característica que a MS apresenta, é a espectrometria de massas em série (MS/MS, do inglês *tandem mass spectrometry*). Comumente, usa-se a MS/MS com analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (QqQ). Os analitos são ionizados seletivamente e seus íons são separados no primeiro espectrômetro de massas. Estes íons são selecionados e então fragmentados em uma célula de colisão (pseudo-quadrupolo). Os íons gerados são quantificados pelo terceiro quadrupolo. Esse acoplamento aumenta a seletividade dos analitos, além de promover menor interferência de co-eluição de compostos e de matriz (VESSECCHI et al., 2011; ALMULLA, 2016).

A Tabela 3 apresenta alguns trabalhos realizados em plantas medicinais, utilizando GC acoplada ao espectrômetro de massas em série.

Tabela 3 - Métodos de cromatografia à gás acoplados à espectrometria de massas em série (MS/MS) para a análise de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais.

Matriz	Equipamento	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Classe química	Referência
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	GC-MS/MS	0,09 – 38,74	OCs, OPs, PRTe HCCI	Feng et al., 2013.
<i>Bupleurum chinense</i> , <i>Panax ginseng</i> , <i>Atractylodes macrocephala</i> , <i>Poria</i> <i>cocos</i> , e <i>Leonurus japonicus</i>	GC-MS/MS	0,04 – 1,39 ng L ⁻¹	OPs	Ho, Tsoi e Leung, 2013.
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	GC-MS/MS	10 – 250	M	Taha, 2016.
<i>Matricaria chamomilla</i> L., <i>Thymus</i> <i>vulgaris</i> e <i>Origanum majorana</i>	GC-MS/MS	10 – 250	M	Taha e Gadalla, 2017.
<i>Angelica sinensis</i> , <i>Angelica dahurica</i> , <i>Leonurus heterophyllus</i> Sweet, <i>Pogostemon cablin</i> , e <i>Lonicera</i> <i>japonica</i> Thunb	GC-MS/MS	1 – 50	M	Nie et al., 2015.
<i>Panax quinquefolius</i> e <i>Panax ginseng</i>	GC-MS/MS	5 - 75	M	Wong et al., 2010.
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	GC-MS/MS	1,11 – 23,33	M	Hou et al., 2016.
90 espécies vegetais	GC-MS/MS	0,03 – 11,88	M	Tong et al., 2014.
<i>Flos chrysanthemi</i>	GC-MS/MS	0,03 – 11,88	M	Tong, Xue e Wu, 2013.

OCs: organoclorados; OPs: organofosforados; PRT: piretróides; HCCI: hidrocarboneto clorado; M: multiclasse (mais de 5 classes químicas).

2.3.3 Métodos de preparo de amostra para determinação de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais

O preparo de amostra apresenta grande importância no âmbito das determinações químicas. Em matrizes complexas, como as plantas medicinais, permite o isolamento e concentração dos compostos de interesse. Além disso, esta etapa possibilita a eliminação de interferentes presentes na amostra e contribui para minimizar o aparecimento de efeito matriz nas análises cromatográficas (CHENG et al., 2013).

Há procedimentos descritos em farmacopéias oficiais indicando os métodos de preparo de amostra para plantas medicinais, com a finalidade de determinar resíduos de agrotóxicos. A Farmacopéia Européia e a Farmacopéia Americana, trazem em suas monografias, a realização da extração por solvente (acetona), concentrando-se o extrato em rotaevaporador e redissolução com tolueno. (USP 40-NF 35, 2016; EP, 2017). Estas monografias são usadas, atualmente, em farmácias magistrais e em indústrias farmacêuticas. Porém, estes métodos tradicionais dispostos nas farmacopéias, apresentam o uso de grandes quantidades de solventes, como também o uso de solventes tóxicos em humanos. Assim, há uma tendência para que os métodos de preparo de amostra reduzam os volumes de solventes empregados, minimizem a geração de resíduos tóxicos, como também reduzam o tempo de execução, minimize o manuseio da amostra e simplifiquem as etapas.

Desde então, uma ampla variedade de métodos de preparo de amostra foram propostos e empregados para a determinação de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais, com o objetivo de determinar níveis cada vez menores de concentração. Muitas destas plantas são usadas para a produção de medicamentos fitoterápicos (SELVI e PARAMASIVAM, 2017). A Tabela 4 traz os métodos de preparo comumente empregados para a determinação de agrotóxicos em plantas medicinais.

Tabela 4 - Métodos de preparo de amostra empregados na determinação de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais, com valores de recuperação (Rec) e classe química dos compostos analisados.

Matriz	Preparo de amostra	Número de agrotóxicos	Rec (%)	Classe química	Referência
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	d-SPE ^a	32 39	71 – 111 71 – 112	OCs e PRT	Zhang et al., 2010.
<i>Radix astragali</i> , <i>Radix glycyrrhizae</i> , <i>Radix Rehmanniae</i> , <i>Flos chrysanthemi</i> , <i>Fructus crataegi</i> , <i>Fructus gardeniae</i> , <i>Fructus lycii</i> , <i>Cortex phellodendri</i> , Gênero <i>Gingko</i> , <i>Herba Leonuri</i>	LLE	18	72,9 – 114,5	OCs	Sun et al., 2007
<i>Panax ginseng</i> (C. A. Mayer)	LLE	29	70 – 120	M	Kuang et al., 2013.
<i>Hyptis pectinata</i>	MSPD	7	73-97	AnP, TZ, SAm, T e E	Aquino et al., 2010.
<i>Panax ginseng</i>	MSPD	4	83,5 – 97,4	CIAr e DCX	Qi, 2010.
<i>Matricaria chamomilla</i> L., Gênero <i>Tilia</i> , <i>Pulmonaria</i> L., <i>Melissa</i> L., <i>Mentha piperita</i> L., <i>Thymus vulgaris</i> L.	MSPD	163	70 - 119	M	Łozowicka et al., 2014.
<i>Withania somnifera</i> (L.) Dunal, <i>Ocimum sanctum</i> L. e <i>Achyranthes aspera</i> L.	MSPD	4	88 – 98	OCs	Abhilash e Singh, 2008.
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	MSPD	16	87,7 – 99,6	OPs, CB e PRT	Cao et al., 2015

Matriz	Preparo de amostra	Número de agrotóxicos	Rec (%)	Classe química	Referência
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	QuEChERS	212	70 - 120	M	Taha, 2016.
<i>Acanthopanax senticosus</i> , <i>Morus alba</i> L., <i>Hovenia dulcis</i>	QuEChERS	234	62 – 119	M	Nguyen et al., 2010.
<i>Cannabis sativa</i> L.	QuEChERS	61	70 – 120	M	Pérez-Parada et al., 2016.
<i>Panax ginseng</i>	QuEChERS	27	62,8 – 108,5	M	Wu et al., 2015.
<i>Pueraria thomsonii</i> Benth, <i>Panax notoginseng</i> (Burk.) F.H. Chen, <i>Astragalus mongholicus</i> (Fisch.) Bge., <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	QuEChERS	55	80 – 118	M	Du, Song e Wang, 2011.
<i>Matricaria chamomilla</i> L., <i>Thymus vulgaris</i> e <i>Origanum majorana</i>	QuEChERS	160	70 – 100	M	Taha e Gadalla, 2017.
<i>Withania somnifera</i> , <i>Cassia angustifolia</i> , <i>Plantago ovata</i> e <i>Andrographis paniculata</i>	QuEChERS	11	70 - 120	OCs, OPs, E e DN	Tripathy, Saha e Kumar, 2017.
<i>Mentha piperita</i> L.	QuEChERS	46	70 – 120	M	Słowik-Borowiec, 2015.
<i>Angelica sinensis</i> , <i>Angelica dahurica</i> , <i>Leonurus heterophyllus</i> Sweet, <i>Pogostemon cablin</i> , e <i>Lonicera japonica</i> Thunb	QuEChERS	107	80 – 110	M	Nie et al., 2015.

Matriz	Preparo de amostra	Número de agrotóxicos	Rec (%)	Classe química	Referência
<i>Matricaria chamomilla</i> , <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze, <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Valeriana officinalis</i> , <i>Tilia europaea</i>	QuEChERS	33	74 – 101	CB	Moreno-González et al., 2015.
<i>Pistacia lentiscus</i> L. var. Chia	QuEChERS	21	49,7 – 127	OPs, TZ, CB e AnP	Psoma et al., 2015.
<i>Pogostemon cablin</i>	QuEChERS	44	76,6 – 113,7	OPs	Yang et al., 2015.
<i>Panax ginseng</i> , <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch, <i>Lonicera japonica</i> , <i>Lophatherum gracile</i> , <i>Cornus kousa</i>	QuEChERS	116	70 – 120	M	Chen et al., 2012.
<i>Radix Gentianae</i> , <i>Cortex Phellodendri</i> , <i>Fritillariae ussuriensis</i>	QuEChERS	23	78,4 – 119,2	OCs, OPs e PRT	Dai et al., 2011.
80 espécies vegetais	QuEChERS	15	76 – 114	OCs	Xu et al., 2011.
<i>Panax quinquefolius</i> , <i>Panax ginseng</i>	QuEChERS	117	70 – 120	OPs	Wong et al., 2007
<i>Hedyotis diffusa</i> , Semifluid extract of deer foetus ^b	QuEChERS	5	80,2 – 105,4	Neo	Qin et al., 2015.
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	QuEChERS	20	79,5 – 111,4	OCs, OPs, ClAr, PRT e SF	Shoeibi et al., 2013.
<i>Cynara cardunculus</i> L.	QuEChERS ^a	35 63	70,9 – 119,5 70,8 – 119,5	M	Machado et al., 2017.
<i>Corydalis Rhizoma</i> , <i>Chuanxiong Rhizomae Angelicae sinensis Radix</i>	QuEChERS	135	71,3 – 117,9	M	Liu et al., 2016.
<i>Panax quinquefolius</i> e <i>Panax ginseng</i>	SPE	168	62 – 119	M	Wong et al., 2010.

Matriz	Preparo de amostra	Número de agrotóxicos	Rec (%)	Classe química	Referência
<i>Cordia salicifolia</i>	SPE	6	64 – 118	OPs, CB, PRT e DF	Carvalho et al., 2010.
<i>Lonicera japonica</i> Thunb.	SPE	107	70 – 120	M	Li et al., 2017.
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	SPE	15	71,1 – 119	OCs, OPs e PRT	Huo et al., 2016.
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	SPE	101	70 – 120	M	Hou et al., 2016.
90 espécies vegetais	SPE	103	70 – 120	M	Tong et al., 2014.
<i>Flos chrysanthemi</i>	SPE	100	65,3 – 124,7	M	Tong, Xue e Wu, 2013.
<i>Mikania laevigata</i> , <i>Maytenus ilicifolia</i> e <i>Cordia verbenacea</i>	SPE	9	70 – 124	OCs	Rodrigues et al., 2007
<i>Panax ginseng</i> (C. A. Meyer)	SPE	18	72,3 – 117,2	M	Park et al., 2007.
<i>Rhei rhizoma</i> , <i>Puerariae radix</i> , e <i>Cassiae semen</i>	SPE	56	70 – 111	OCs, OPs e PRT	Tagami et al., 2008.
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	SPE	118	61 – 121	M	Yang et al., 2009.
<i>Herba epimedii</i>	SPE	20	75,4 – 90,7	OCs	Guo et al., 2010.
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	SPE	6	76,1 – 101,8	PR	Lu et al., 2010

^aOs autores realizaram 2 métodos cromatográficos para a(s) mesma(s) matriz(es). / ^b Mistura de ervas com placenta de cervo./ OCs: organoclorados; OPs: organofosforados; PRT: piretróides; AnP: anilopirimidina; TZ: triazina; SAm: sulfamida; T: triazol; E: estrobilurina; ClAr: cloroaromático; DCX: dicarboximida; CB: carbamato; DN: dinitroanilina; SF: sulfato; DF: difenil éter; PR: piretrinas; M: multiclasse (mais de 5 classes químicas).

Vários trabalhos foram desenvolvidos aplicando-se diferentes métodos de preparo de amostra, como a extração Líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-liquid extraction*), Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD, do inglês *Matrix Solid-Phase Dispersion*), Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*), Extração em Fase Sólida Dispersiva (d-SPE, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*) e QuEChERS (do acrônimo inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). Estes métodos são comumente empregados em plantas medicinais no campo das análises de resíduos de agrotóxicos.

A LLE foi empregada com a finalidade de extrair 18 agrotóxicos organoclorados por GC-ECD em 10 espécies vegetais, de acordo com o trabalho de SUN e colaboradores (2007). Os autores testaram 3 solventes orgânicos: acetato de etila, acetona:éter de petróleo (50:50, v/v) e acetona:cloro de metileno (50:50, v/v). Obtiveram recuperações acima de 70% para a mistura de solventes acetona:éter de petróleo (50:50, v/v), sendo esta utilizada para a execução do método. KUANG e colaboradores. (2013) desenvolveram um método de análise para micotoxinas e agrotóxicos em *Panax ginseng* (C. A. Meyer) empregando LLE e UHPLC-MS/MS. Neste trabalho, os autores propuseram uma etapa única de extração, sem etapa de limpeza e pré-concentração, utilizando 20 mL de acetonitrila:água:ácido fórmico (99:33:1, v/v/v) com agitação contínua de 30 minutos. As recuperações foram satisfatórias para a maioria dos compostos determinados (70-120%), com valores de limites de detecção (LOD) de 0,01 a 0,25 ng/mL.

Outro método aplicado para plantas medicinais e seus produtos, é a MSPD, criada por Barker e colaboradores (1989), na qual adiciona-se amostra a um recipiente contendo um adsorvente dispersante para a realização da ruptura da estrutura física da amostra, o que permite a extração dos compostos orgânicos. Após a homogeneização da amostra e do adsorvente, o material é transferido para uma coluna ou tubo e elui-se os compostos com solvente orgânico adequado. AQUINO e colaboradores (2010) desenvolveram um método para a extração de pirimetanil, ametrina, diclofluanida, tetraconazol, flumetralina, cresoxim-metílico e tebuconazol em *Hyptis pectinata* utilizando um novo adsorvente dispersante ($[Zn(BDC)(H_2O)_2]_n$). Este sorvente foi comparado a um adsorvente comercial (octadecilsilano, conhecido como C₁₈) e apresentou recuperações com variação de 73-97% e valores de RSD de 5 a 12%. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,02 a 0,07 µg g⁻¹ e 0,05 a 0,1

$\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. A determinação destes compostos foi realizada por GC-MS e o método de preparo de amostra demonstrou boa aplicabilidade deste adsorvente proposto pelos autores. ABHILASH e SINGH (2008) realizaram um estudo para a determinação de 7 agrotóxicos organoclorados (aldrin, endrin, dieldrin, HCH alfa, HCH beta, HCH delta e HCH gama) em *Withania somnifera* (L.) Dunal, *Ocimum sanctum* L. e *Achyranthes aspera* L. Os autores compararam o método MSPD proposto com o método descrito na Farmacopéia Européia, porém com algumas modificações. Segundo os autores, o método MSPD proposto obteve melhores resultados, pois apresentou menor tempo de extração, uso de menores quantidades de solventes orgânicos e maiores recuperações dos compostos. No trabalho de CAO e colaboradores (2015), desenvolveu-se um sistema de limpeza do extrato de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, utilizando MSPD para determinar resíduos de 16 agrotóxicos. O sistema de limpeza consiste em uma mistura de carbono grafitizado (GCB, do inglês *graphitized carbon black*), polímero polivinilpirrolidona (PVPP), amina primária secundária (PSA, do inglês *primary secondary amine*) e areia do mar. O PVPP auxilia na remoção de polifenóis, compostos presentes em grandes quantidades em *Camellia sinensis* (L.) Kuntze. O PSA atua na remoção de ácidos orgânicos polares e o GCB na remoção de pigmentos. QI (2010) desenvolveu um estudo para a determinação de pentacloronitrobenzeno, pentacloroanilina, metil penta cloro fenilsulfeto e procimidona por GC-MS em *Panax ginseng*, utilizando florisil e mistura de acetato de etila:hexano (70:30, v/v) como solvente de eluição, em conjunto com banho ultrassônico à temperatura ambiente, a fim de obter maior eficiência da extração dos compostos.

A extração em fase sólida (SPE) pode ser empregada para as etapas de extração, limpeza e concentração dos analitos de interesse em diferentes tipos de matrizes. O método pode ser usado para a execução das três finalidades, como também atuar somente como uma etapa de limpeza do extrato, quando usado em conjunto a outros métodos de preparo de amostra. Esta técnica baseia-se em percolar uma solução em um cartucho contendo uma fase sólida. Esta fase sólida é ativada com o uso de solventes orgânicos para proporcionar maior eficiência e interação dos analitos de interesse. Além disso, promove a redução da interação dos compostos indesejáveis (ANDRADE-EIROA et al., 2015). No trabalho de Lu e colaboradores (2010), 5 g de chá verde e chá preto (*Camellia sinensis* (L.)) foram extraídos com 30 mL de acetonitrila e, após etapa de centrifugação, o sobrenadante foi evaporado em

rotaevaporador até atingir um volume de 3 mL. O extrato foi transferido para diferentes cartuchos contendo C₁₈, florisil, amino, e cartuchos comerciais Pesticarb e TPT[®] para realizar a etapa de limpeza. Os melhores resultados obtidos foram com o cartucho TPT[®]. O cartucho TPT[®] contém uma combinação de GCB, sílica poliamino e amida. O GCB auxilia na remoção de pigmentos presentes na matriz; a sílica poliamino remove ácidos orgânicos e a amida contribui para a remoção de pigmentos que não possuem anel aromático em sua estrutura química. RODRIGUES e colaboradores (2007) determinaram compostos organoclorados em folhas de *Mikania laevigata*, *Maytenus ilicifolia* e *Cordia verbenacea* empregando GC-MS e extração sólido-líquido (SLE), com posterior limpeza e concentração dos analitos por SPE. O cartucho utilizado continha 2 g sílica gel (0,063 – 0,200 mm), 1,5 g de florisil (silicato de magnésio) e 0,65 g de sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄). PARK e colaboradores (2007) realizaram a determinação multirresíduo de 18 agrotóxicos por GC-ECD e GC-NPD em *Panax ginseng* (C. A. Meyer), com extração por acetonitrila e limpeza por SPE. Para análise por GC-ECD, o extrato foi percolado em cartucho com florisil. Este sorvente apresenta grande polaridade e adsorve compostos polares irreversivelmente.

A técnica de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) foi desenvolvida juntamente com o método QuEChERS. Uma vantagem desta técnica é que, ao contrário do SPE, o adsorvente interage uniformemente com o extrato da matriz. Dessa forma, tem-se a obtenção de um extrato final com baixa quantidade de coextrativos. Outras características vantajosas da técnica são o uso de quantidades menores e a utilização de misturas de sorventes, tendo em vista quais interferentes da matriz desejam-se remover, permitindo inúmeras combinações entre estes (CABRERA et al., 2012). Esta técnica foi escolhida para a realização dos métodos executados por Zhang e colaboradores (2010). Neste trabalho, a planta *Camellia sinensis* foi extraída por 2 métodos de extração com diferentes solventes, um método para GC-MS e outro para UHPLC-MS/MS – e, para a limpeza do extrato, utilizou-se MgSO₄, GCB e PSA.

Entre os materiais amplamente utilizados nesta técnica, o sulfato de magnésio (MgSO₄) apresenta uma propriedade dessecante, como também melhora e acelera a extração dos compostos em análise (PRESTES et al., 2009). Outros secantes são utilizados em matrizes complexas, tais como sulfato de sódio (Na₂SO₄) e cloreto de

cálcio (CaCl_2), os quais como o MgSO_4 , são capazes de promover a remoção de água em extratos aquosos (PRESTES et al., 2009; SŁOWIK-BOROWIEC, SZPYRKA e WALORCZYK, 2012).

Um sorvente comumente utilizado é o etilenodiamino-N-propil, também conhecido como PSA. Este sorvente apresenta-se com estrutura bidentada e possui um efeito quelante devido à influência de grupamentos amino primário e secundário. Além disso, possui atuação de um trocador aniônico fraco, podendo interagir com outros compostos através de pontes de hidrogênio ou ligações dipolo-dipolo. Estas características resultam na capacidade do PSA em reter ácidos graxos livres, açúcares e outros componentes polares (CABRERA et al., 2012). O C_{18} também contribui na minimização de coextrativos da matriz, atuando mais efetivamente em matrizes que apresentam interferentes apolares, como os lipídios e ácidos graxos (BURZZONITI et al., 2014; CABRERA et al., 2012).

Em relação às plantas que apresentam alto teor de pigmentos, como a clorofila, o GCB é comumente empregado. Este material apresenta grupamentos polares em sua estrutura com grande potencial de formação de ligações de pontes de hidrogênio, levando a uma forte interação de compostos químicos com estruturas planares. Conseqüentemente, esta interação leva a menores recuperações de compostos planares. Exemplos de agrotóxicos com estruturas planares podem-se destacar o ciprodinil, terbufós, hexaclorobenzeno, clorotalonil, folpete, entre outros (ZHAO e STEVENES, 2012; CABRERA et al., 2012).

O Z-sep[®], é um sorvente que se caracteriza pela mistura de C_{18} com sílica revestida com óxido de zircônio (ZrO_2) é um material empregado para a remoção de ácidos graxos e pigmentos. O EMR-Lipid[®] (do inglês, *enhanced matrix removal of lipids*) possui uma estrutura química ainda não conhecida, a qual possui sítios ativos para ligar longas cadeias carbônicas, como os ácidos graxos. Este sorvente tem se apresentado com boa capacidade de remoção de ácidos graxos em matrizes gordurosas. Além disso, foi avaliado quanto à eficiência de remoção de pigmentos em matrizes vegetais, como a couve (HAN et al., 2016).

O método QuEChERS é amplamente utilizado como método de preparo de amostra para a determinação multirresíduo em matrizes complexas, e usado em análises cromatográficas por GC ou LC-MS/MS (TRIPATHY; SAHA e KUMAR, 2017).

Foi introduzido por ANASTASSIADES e colaboradores (2003) com a finalidade de determinar agrotóxicos em amostras não gordurosas, como frutas e vegetais. Além disso, pode servir como alternativa à métodos de extração convencionais. Este método propõe uma extração simples de três etapas. Inicialmente, realiza-se uma extração líquido-líquido com solvente orgânico, usualmente, acetonitrila (ACN). A ACN é miscível com a água e apresenta capacidade de realizar uma extração em etapa única quando em contato com a matriz. Além disso, extrai menores quantidades de coextrativos da matriz, favorecendo então, a extração dos compostos de interesse (PRESTES et al., 2009). Em segundo lugar, adiciona-se sais, como sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e cloreto de sódio (NaCl) para a promoção da partição das fases aquosa e orgânica. O $MgSO_4$ possui a habilidade de acelerar o processo de extração, como também remover teores de água presentes na matriz. O NaCl auxilia na separação das fases, além de aumentar as recuperações de compostos polares. Por último, há uma etapa de limpeza empregando extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) para que ocorra uma interação uniforme dos sorventes com o extrato da matriz.

Porém, alguns compostos apresentam sensibilidade quanto à variação de pH do meio de extração, podendo ocorrer degradação destes. Em geral, os agrotóxicos apresentam estabilidade em pH ácidos. Para contornar esta situação, Lehotay e colaboradores (2005) adicionaram ácido acético em acetonitrila, proporcionando um meio acidificado para os compostos de interesse e, assim, permitir melhor eficiência de extração. Além disso, para a manutenção do pH, foi realizada a adição de acetato de sódio (CH_3COONa) no lugar de NaCl. Assim, o QuEChERS acetato foi desenvolvido (LEHOTAY et al., 2005; PRESTES et al., 2009).

Posteriormente, Anastassiades e colaboradores (2007) propuseram o método QuEChERS citrato, em que utiliza uma mistura de citrato de sódio dihidratado e hidrogenocitrato sesquihidratado, os quais são responsáveis em manter o pH do meio de extração em 5,0 a 5,5. Esta versão tem demonstrado melhoras em níveis de recuperação para compostos básicos e ácido sensíveis. O uso de PSA na etapa de limpeza, para o método QuEChERS citrato, proporciona boa eficiência de limpeza do extrato quando comparada ao método QuEChERS acetato, em que foi observado que sua eficiência de limpeza foi afetada (REJCZAK e TUZIMSKI, 2015).

Este método tem sido aplicado em determinação multirresíduo em plantas medicinais, como o trabalho de Tripathy e colaboradores (2017), em que

determinaram resíduos de 11 agrotóxicos por GC-MS em raízes de “ashwagandha” (*Withania somnifera* L.), folhas de sene (*Cassia angustifolia* L.), sementes com casca de plantago (*Plantago ovata*) e partes aéreas de *Andrographis paniculata*. A extração dos compostos foi realizada com 2 g de amostra, com adição de 13 mL de água ultrapura e 15 mL de ACN acidificada com 1% de ácido acético (v/v). Os sais de partição foram $MgSO_4$ e acetato de sódio. Para a limpeza do extrato, foram testados PSA e C_{18} em conjunto com $MgSO_4$. O PSA apresentou melhores recuperações dos compostos estudados quando comparado com C_{18} . Os limites de quantificação e detecção variaram entre 0,01 a 0,069 $mg\ kg^{-1}$ e 0,003 a 0,02 $mg\ kg^{-1}$, respectivamente.

Desenvolveu-se um método para a determinação de 71 agrotóxicos (organoclorados, organofosforados e piretróides) em alcarávia, camomila e hortelã seco por GC-ECD no trabalho de Attallah e colaboradores (2012). As amostras foram hidratadas com 15 mL de água ultrapura e extraídas com 15 mL de ACN. A etapa de partição foi realizada com $MgSO_4$ e NaCl e, a limpeza dispersiva do extrato com $MgSO_4$ e PSA. A análise foi realizada por GC-ECD e GC-NPD. As recuperações foram de 70 a 120%, com desvio padrão relativo (RSD) de 1 a 22%. Słowik-Borowiec, Szpyrka e Walorczyk (2012) realizaram estudo com hortelã (*Mentha piperita* L.) empregando QuEChERS e análise por GC-ECD e GC-NPD. O limite de quantificação foi de 0,01 $mg\ kg^{-1}$ para todos os agrotóxicos e o QuEChERS citrato foi usado. 150 mg PSA, 45 mg GCB e 900 de $MgSO_4$ foram usados para promover a limpeza do extrato. O extrato foi evaporado e reconstituído com éter de petróleo antes de ser injetado no sistema cromatográfico.

Analisou-se extrato de ginseng para a determinação 27 agrotóxicos por UHPLC-MS/MS no estudo de Wu e colaboradores (2015). Neste estudo, usou-se 1 g de NaCl, 0,5 de citrato de sódio e 0,2 g de hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado e pesou-se 2 g de amostra. Adiciona-se água e procede-se extração com ACN. Após agitação vigorosa por 1 minuto, 2 g de $MgSO_4$ anidro foi adicionado ao tubo. A limpeza do extrato foi efetuada com PSA, C_{18} , $MgSO_4$ e GCB.

Taha (2016) realizou um estudo em camomila (*Matricaria chamomilla*) para a determinação de 212 resíduos de agrotóxicos, com 25 minutos de corrida cromatográfica por GC-MS/MS. Neste estudo, 160 compostos apresentaram limites de quantificação no valor de 10 $\mu g\ kg^{-1}$. A extração da amostra foi realizada com adição de água e acetonitrila, com adição de sais empregados em QuEChERS citrato.

A limpeza foi feita com $MgSO_4$ e PSA e, o extrato foi evaporado e reconstituído com 2 mL de solução de hexano:acetona (9:1, v/v).

Um método multirresíduo foi desenvolvido por Hou e colaboradores (2016) para a determinação de 101 agrotóxicos em folhas de chá verde por GC-MS, com extração empregando método QuEChERS citrato e posterior limpeza e concentração dos analitos em cartuchos com GCB e PSA. Estes sorventes apresentaram melhor capacidade de limpeza em relação a outros materiais estudados, como TPT® e amino (NH_2). Além disso, avaliaram 2 proporções de GCB/PSA para verificar a eficiência de extração dos compostos – GCB/PSA (250/250 mg) e GCB/PSA (500/500 mg). A proporção de GCB/PSA 500/500 mg apresentou melhores resultados, com base no teste gravimétrico e na recuperação dos compostos (70-120%).

Machado e colaboradores (2017) compararam o método MSPD e QuEChERS para a extração multirresíduo de agrotóxicos em folhas e frutos de alcachofra. A alcachofra (*Cynara cardunculus* L.) é usada para reduzir níveis de colesterol (hipocolesteremia) e combater anemia. O método QuEChERS apresentou melhores resultados. Neste estudo, o método QuEChERS citrato foi usado e a modificação na etapa de limpeza com o uso de $CaCl_2$, demonstrou boa aplicabilidade para a determinação de 98 compostos por GC-MS/MS e LC-MS/MS. No estudo de Lozano e colaboradores (2012), avaliaram-se 86 agrotóxicos (inseticidas, herbicidas e fungicidas) em chá verde, chá preto, chá vermelho (*Camellia sinensis*) e camomila. As amostras seguiram o protocolo do QuEChERS citrato, porém, na etapa de limpeza, o $CaCl_2$ foi usado no lugar do $MgSO_4$. As determinações foram realizadas por LC-MS/MS e GC-MS/MS. Cerca de 85% dos compostos analisados pelo método proposto, estavam dentro dos LMRs permitidos pela União Européia.

2.4 VALIDAÇÃO

De acordo com o artigo 4 da RDC n° 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos, após o desenvolvimento de um método, deve-se demonstrar que este produz resultados confiáveis e apresenta adequabilidade a finalidade que se destina. No Brasil, há algumas agências reguladoras que possuem orientações sobre a validação de métodos e verificação de competência de laboratórios, como por exemplo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e

Qualidade Industrial). Há também órgãos competentes internacionais que dispõem de guias como a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*) e SANTE (Saúde e Proteção do Consumidor, do francês *Santé et protection des consommateurs*).

Conforme a RDC nº 166/2017, quando não forem utilizados documentos oficiais ou quando há criação de desenvolvimento de método analítico próprio, deve-se apresentar descrição detalhada do processo analítico e da metodologia empregada para a validação do método.

Durante o desenvolvimento de métodos analíticos e sua posterior validação, alguns parâmetros devem estar envolvidos no decorrer do processo, como a seletividade; linearidade e faixa de aplicação; exatidão; precisão; precisão intermediária; efeito matriz; limite de detecção e limite de quantificação.

2.4.1 Seletividade

A seletividade expressa a relevância da presença de outras substâncias na amostra em análise, que possam causar interferências para a determinação de analitos. (KRUIVE et al., 2015a).

2.4.2 Curva analítica e linearidade

A linearidade está associada aos resultados gerados pelo método analítico, sejam diretos ou proporcionais, à concentração do(s) analito(s) de interesse na amostra analisada, dentro de uma faixa de variação determinada. Para a construção da curva de calibração, deve-se usar no mínimo cinco valores de concentração dentro do intervalo definido (BRASIL, 2017). A linearidade é satisfatória quando o coeficiente de determinação da reta (r^2) apresenta valores maior que 0,990 (BRASIL, 2017; BRITO et al., 2003; VALENTINI; SOMMER e MATIOLI, 2007).

2.4.3 Exatidão

Este parâmetro define a proximidade dos resultados estimados com o valor real do(s) analito(s) na amostra (BRASIL, 2017). Existem quatro métodos propostos para o estudo da exatidão, porém, o uso de ensaios de fortificação/recuperação na matriz é o mais empregado na validação de métodos analíticos. Os valores aceitáveis estão na faixa de 70 a 120% (BRITO et al., 2003).

2.4.4 Precisão

Avalia o grau de concordância entre várias medidas executadas em uma mesma amostra sob condições específicas. Com base nos resultados obtidos, pode-se expressar a precisão calculando-se a média das recuperações (M), o desvio padrão das recuperações (s) e desvio padrão relativo (RSD) (BRITO et al., 2003; VALENTINI; SOMMER e MATIOLI, 2007; KRUIVE et al., 2015a). Para a determinação do desvio padrão relativo (RSD), utiliza-se a Equação 1 abaixo:

$$RSD (\%) = \frac{s}{M} \times 100$$

O valor do desvio padrão relativo aceitável, no âmbito das análises de resíduos de agrotóxicos, é de até 20% (BRITO et al., 2003).

A precisão pode ser considerada no nível de precisão intermediária, repetitividade, reprodutibilidade e robustez.

2.4.4.1 Precisão Intermediária

Expressa variações obtidas dentro de um mesmo laboratório em um intervalo de tempo, levando em consideração, mudanças que podem influenciar nos resultados, como: diferentes analistas, diferentes dias (variações de temperatura e umidade), lotes de reagentes, entre outros (BRITO et al, 2003; KRUIVE et al., 2015a).

2.4.4.2 Repetitividade

Indica pequenas variações obtidas em curto período de tempo (um dia), em mesmas condições de operação (mesmo equipamento, mesmos reagentes, mesmas condições ambientais), de modo que a análise é feita de forma independente a partir de uma amostra homogênea e realizada por um operador (KRUIVE et al., 2015a).

2.4.4.3 Reprodutibilidade

Refere-se ao uso de procedimentos analíticos e obtenção de resultados em diferentes laboratórios, com execução do método por diferentes analistas, em condições ambientais diferentes e em diferentes dias. Apresenta importância para a avaliação do método proposto, verificando seu possível emprego em outros laboratórios (KRUIVE et al., 2015a).

2.4.5 Robustez

Indica a capacidade em resistir a pequenas variações das condições analíticas. Em métodos quantitativos, a robustez deve ser avaliada com os mesmos critérios para a exatidão. O anexo III da RDC 166/2017 descreve alguns dos parâmetros que podem ser avaliados nas etapas do método proposto para a avaliação da robustez. Na etapa de preparo de amostra, por exemplo, pode-se avaliar a estabilidade das soluções analíticas, o tempo de extração e a compatibilidade de filtros. Na etapa de análise cromatográfica, pode-se avaliar a variação do pH e composição da fase móvel – para cromatografia líquida – e, avaliar diferentes lotes de colunas analíticas, variação de temperatura e velocidade do gás de arraste – para cromatografia à gás (BRASIL, 2017).

2.4.6 Efeito matriz

Este parâmetro está relacionado com a influência da matriz na resposta cromatográfica. O efeito matriz é determinado por meio da comparação entre as inclinações da reta obtidas com as curvas analíticas preparadas no solvente e na matriz (BRASIL, 2017). Dessa forma, pode-se avaliar quanto à supressão ou aumento de sinal cromatográfico dos compostos em estudo. Quando o valor obtido está entre -20 e +20%, considera-se que o efeito matriz não é significativo (TRIPATHY et al., 2017; MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2015).

2.4.7 Limite de Quantificação e Detecção

O limite de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*), de acordo com a RDC 166/2017 (BRASIL, 2017), é a menor concentração do analito que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis sob circunstâncias estabelecidas experimentalmente.

O limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) é a menor concentração do analito presente em que pode ser detectado pelo equipamento analítico. Para fins de cálculo, pode ser realizado por diversos métodos como método visual, pela relação do sinal/ruído, baseando-se pela determinação do branco ou através de parâmetros da curva de calibração. Em métodos instrumentais, o método mais utilizado é a relação sinal/ruído (BRASIL, 2017).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento do presente trabalho foi realizado no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos utilizados durante a elaboração deste trabalho estão listados abaixo:

- ❖ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3R (Millipore, EUA);
- ❖ Centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- ❖ Centrífuga (Centribio, Brasil);
- ❖ Agitador Vortex – Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ❖ Evaporador Turbovap® LV (Biotage, Suécia)
- ❖ Balança analítica de precisão AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- ❖ Balança analítica de precisão UX-420H (Shimadzu, Japão);
- ❖ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- ❖ Sistema de manifold SPE (Agilent Technologies, EUA);
- ❖ Sistema GC-MS/MS, modelo Agilent Intuvo 9000, contendo analisador de massas tipo triplo quadrupolo (QqQ) modelo Agilent 7010 GC-MS/MS e amostrador automático modelo Agilent 7693 (Agilent Technologies, EUA);
- ❖ Sistema de aquisição de dados MassHunter B.07.06.2704 (Agilent Technologies, EUA)
- ❖ Coluna analítica: coluna capilar planar HP-5 MS UI (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Agilent Technologies, EUA);
- ❖ Pré-coluna: “*guard chip*” P/N G4587-60565 (Agilent Technologies, EUA);
- ❖ Liner: Ultra-Inert liner (Agilent Technologies, EUA);
- ❖ Gás Nitrogênio grau de pureza 6.5 (Air Liquide, Brasil);
- ❖ Gás Hidrogênio grau de pureza 5.0 (Air Liquide, Brasil);
- ❖ Gás Hélio grau de pureza 6.0 (Air Liquide, Brasil).

3.2 REAGENTES, SOLVENTES, GASES E DEMAIS MATERIAIS UTILIZADOS

Os reagentes, solventes, gases e outros materiais utilizados durante o desenvolvimento deste trabalho estão listados abaixo:

- ❖ Acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- ❖ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3R (resistividade de 18,2 MΩ cm) (Millipore, EUA);
- ❖ Metanol grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- ❖ Tubos de polipropileno, com tampas de rosca com capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ❖ Microtubos tipo eppendorf, capacidade de 2 mL (Axygen Scientific, EUA);
- ❖ Frascos de vidro (vial), capacidade de 2 mL (Agilent Technologies, EUA);
- ❖ Extran® neutro e alcalino (Merck, Brasil);

- ❖ Acetona grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- ❖ Hexano (95% n-hexano) (J. T. Baker, EUA);
- ❖ Acetato de etila (Mallinckrodt, EUA);
- ❖ Filtros de nylon (PTFE) de 13 mm e porosidade de 0,2 µm (Vertical Chromatography, Tailândia);
- ❖ Filtros de nylon (PTFE) de 13 mm e porosidade de 0,2 µm (Agilent Technologies, EUA);
- ❖ Vidraria comum de laboratório;
- ❖ Citrato de sódio diidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ❖ Hidrogenocitrato de sódio sesquidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ❖ Sulfato de sódio (Merck, Brasil);
- ❖ Sulfato de magnésio anidro p.a. (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- ❖ Kits QuEChERS original (4 g MgSO₄ + 1 g NaCl - P/N 5982-7550), acetato (6 g MgSO₄ + 1,5 g CH₃COONa – P/N 5982-7755) e citrato (4 g MgSO₄ + 1 g NaCl + 1 g C₆H₅Na₃O₇.2H₂O + 0,5 g C₆H₆Na₂O₇.1,5H₂O – P/N 5982-7650) (Agilent Technologies, EUA);
- ❖ Kits de limpeza (P/N 5982-5022CH; 5982-5421; 5982-5222CH; 5982-5222) (Agilent Technologies, EUA);
- ❖ Cartuchos SPE Bond Elut NH₂ (500 mg/3 mL) (Agilent Technologies, EUA);
- ❖ Cartuchos SPE EMR-Captiva[®] (300 mg/3 mL) (Agilent Technologies, EUA);
- ❖ Cartuchos BeCarbon/PSA (250 mg/250 mg/3 mL) (Agilent Technologies, EUA);
- ❖ Sorvente Bondesil C₁₈ com diâmetro de partícula de 40 µm (Agilent Technologies, EUA);
- ❖ Sorvente Bondesil PSA com diâmetro de partícula de 40 µm (Agilent Technologies, EUA);
- ❖ Cloreto de cálcio (CaCl₂) ≤ 7,0 mm de espessura (Sigma-Aldrich, EUA);
- ❖ Sorvente carvão grafitizado (GCB) (Agilent Technologies, EUA);
- ❖ Sorvente EMR-Lipid[®] (Agilent Technologies, EUA);
- ❖ Padrões sólidos dos compostos em estudo (Tabela 5).

3.3 AMOSTRAS DE PLANTAS MEDICINAIS

As amostras “branco” de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.), guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) e camomila (*Matricaria chamomilla*) foram adquiridas em mercado local com certificação de produto orgânico.

As propriedades terapêuticas de *Maytenus ilicifolia*, *Ginkgo biloba* L. e *Mikania glomerata* Spreng. estão nas folhas, enquanto que em *Matricaria chamomilla* encontram-se nas flores. Dessa forma, foram obtidas folhas e flores secas destas amostras. As amostras foram analisadas para a verificação de presença de agrotóxicos e não foram encontrados resíduos dos agrotóxicos em estudo neste trabalho. A escolha das plantas para o presente trabalho foi com base do conhecimento popular mundial (plantas exóticas) e do conhecimento do uso de fitoterápicos presentes na lista do RENISUS e RENAME (plantas brasileiras).

As folhas de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) são empregadas no tratamento de dispepsia (má digestão), úlceras gástricas e em casos de azia e gastrite. A atividade broncodilatadora e expectorante das folhas do guaco (*Mikania glomerata* Spreng.), tem demonstrado cientificamente boa indicação no combate à tosse, asma e bronquite (DUTRA et al., 2016). Efeitos benéficos em doenças cognitivas, como por exemplo, Alzheimer, proporcionando melhora na cognição e neuroproteção vascular, têm sido reportado com o uso folhas de ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.) (SAKI et al., 2016; FERMINO et al., 2015). As flores de camomila (*Matricaria chamomilla*) têm sido relatadas em diversos estudos em atribuição às suas propriedades antiinflamatórias e antiespasmódicas (HAMEED, MOHAMMED e KAMAL, 2018).

3.4 COMPOSTOS SELECIONADOS E PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Os compostos selecionados para o presente estudo foram escolhidos de acordo com o anexo V da Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 105, de 31 de agosto de 2016 (BRASIL, 2016) e com base na relação de compostos disponíveis no laboratório e que podem ser determinados pela técnica de GC-MS. A Tabela 5 apresenta os agrotóxicos estudados juntamente com informações como o logaritmo negativo da constante de acidez (pKa), coeficiente de partição octanol/água (Log K_{ow}), fórmula molecular, classe química e ação agrônômica (UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE, 2018). Todos os padrões usados possuem pureza superior a 95%. Preparou-se 10 mL das soluções estoque individuais de cada composto, a partir do padrão sólido, na concentração de 1000 mg L⁻¹, considerando-se a pureza de cada padrão para o cálculo da massa a ser pesada e, subsequentemente, a diluição no solvente adequado (acetonitrila, metanol ou outro). Após, preparou-se uma solução mistura dos compostos em estudo na concentração de 10 mg L⁻¹ em acetonitrila, acondicionada em frasco âmbar sob temperatura de -4 °C. Esta solução foi utilizada

para a realização da etapa de fortificação das amostras “branco”, além de preparar as curvas analíticas no extrato da matriz e no solvente. As soluções de trabalho foram preparadas nas seguintes concentrações: 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, 2 $\mu\text{g L}^{-1}$, 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 5 - Relação dos agrotóxicos em estudo, determinados por GC-MS/MS, com informações sobre pKa, Log K_{ow}, fórmula molecular, classe química e ação agrônômica.

Composto	pKa ^a	Log K _{ow} ^b	Fórmula Molecular	Classe Química	Ação Agrônômica
Alacloro	16,6	3,5	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	Cloroacetanilida	Herbicida
Aldrin	-	6,5	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	Organoclorado	Inseticida
Ametrina	4,1	2,6	C ₉ H ₁₇ N ₅ S	Triazina	Herbicida
Atrazina	1,6	2,6	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	Triazina	Herbicida
Boscalida	-	4,0	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	Anilida	Fungicida
Bupirimate	4,4	3,6	C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₃ S	Pirimidinol	Fungicida
Buprofezina	-	4,3	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS	Tiadiazinona	Inseticida e acaricida
Cadusafós	-	3,8	C ₁₀ H ₂₃ O ₂ PS ₂	Organofosforado	Inseticida e nematocida
Ciprodinil	4,4	4,0	C ₁₄ H ₁₅ N ₂	Anilinopirimidina	Fungicida
Clordano-trans	-	2,7	C ₁₀ H ₆ Cl ₈	Organoclorado	Inseticida
Clorfenapir	-	4,8	C ₁₅ H ₁₁ BrClF ₃ N ₂ O	Pirazol (análogo de)	Inseticida e acaricida
Clorfenvinfós	-	3,8	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ O ₄ P	Organofosforado	Inseticida
Clorpirifós etílico	4,6	5,0	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	Organofosforado	Acaricida
Clorpirifós-metilico	-	4,3	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	Organofosforado	Inseticida, acaricida e formicida
Clorprofan	14,5	3,5	C ₁₀ H ₁₂ ClNO ₂	Carbamato	Herbicida
DDT o,p'	-	6,9	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	Organoclorado	Inseticida
DDT p,p'	-	6,9	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	Organoclorado	Inseticida
Diazinona	2,6	3,8	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	Organofosforado	Inseticida
Diclorana	-	2,8	C ₆ H ₄ Cl ₂ N ₂ O ₂	Clorofenila	Fungicida
Dissulfotom	-	3,9	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₃	Organofosforado	Inseticida e acaricida
Endossulfam alfa	-	4,7	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	Organoclorado	Inseticida e acaricida
Endossulfam beta	-	4,7	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	Organoclorado	Inseticida e acaricida
Endrin	-	3,2	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	Organoclorado	Inseticida
Epoconazol	-	3,3	C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O	Triazol	Fungicida
Espiromesifeno	-	4,5	C ₂₃ H ₃₀ O ₄	Cetoenol	Inseticida
Etoprofós	-	2,9	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₂	Organofosforado	Inseticida e nematocida
Etrinfós	-	2,9	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ OPS	Organofosforado	Inseticida
Fenamidona	-	2,8	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ OS	Imidazol	Fungicida
Fenarimol	-	3,6	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	Pirimidinilcarbinol	Fungicida
Fenitrotiona	-	3,3	C ₉ H ₁₂ NO ₅ PS	Organofosforado	Inseticida
Fipronil	-	3,7	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS	Pirazol	Inseticida, formicida e cupinicida

Composto	pKa ^a	Log K _{ow} ^b	Fórmula Molecular	Classe Química	Ação Agrônômica
Fluasifope-p-butílico	-	4,5	C ₁₉ H ₂₀ F ₃ NO ₄	Ácido arilfenoxipropiônico	Herbicida
Fluquinconazol	0,9	3,2	C ₁₆ H ₈ Cl ₂ FN ₅ O	Triazol	Fungicida
Flusilazol	2,5	3,8	C ₁₆ H ₁₅ F ₂ N ₃ Si	Organosilicado	Fungicida
Fostiazato	-	1,6	C ₉ H ₁₈ NO ₃ PS ₂	Organofosforado	Inseticida e nematocida
HCH alfa	-	3,8	C ₆ H ₆ Cl ₆	Organoclorado	Inseticida e rodenticida
HCH beta	-	3,8	C ₆ H ₆ Cl ₆	Organoclorado	Inseticida
HCH gama (Lindano)	-	3,5	C ₆ H ₆ Cl ₆	Organoclorado	Inseticida, acaricida e rodenticida
Heptacloro	-	5,4	C ₁₀ H ₅ Cl ₇	Organoclorado	Inseticida
Hexaclorobenzeno	-	3,9	C ₆ H ₆	Organoclorado	Fungicida
Indoxacarbe	-	4,6	C ₂₂ H ₁₇ ClF ₃ N ₃ O ₇	Oxadiazina	Inseticida, formicida e cupinicida
Iprodiona	12,7	3,0	C ₁₃ H ₁₃ Cl ₂ N ₃ O ₃	Dicarboximida	Fungicida
Malationa	-	2,7	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	Organofosforado	Inseticida e acaricida
Metconazol	11,4	3,8	C ₁₇ H ₂₂ ClN ₃ O	Triazol	Fungicida
Metidationa	-	2,5	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃	Organofosforado	Inseticida e acaricida
Metiocarbe	-	3,1	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S	Carbamato	Inseticida, moluscicida e repelente de pássaros
Metolacloro	-	3,4	C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂	Cloroacetamida	Herbicida
Metoxicloro p,p'	-	5,8	C ₁₆ H ₁₅ Cl ₃ O ₂	Organoclorado	Inseticida
Mevinfós	-	0,1	C ₇ H ₁₃ O ₆ P	Organofosforado	Inseticida e acaricida
Miclobutanil	2,3	2,9	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄	Triazol	Fungicida
Mirex	-	5,2	C ₁₀ Cl ₁₂	Organoclorado	Inseticida
Nuarimol	-	3,1	C ₁₇ H ₁₂ ClFN ₂ O	Pirimidina	Fungicida
Oxadixil	-	0,6	C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₄	Fenilamida	Fungicida
Parationa metílica	-	3,0	C ₈ H ₁₀ NO ₅ PS	Organofosforado	Inseticida
Penconazol	1,5	3,7	C ₁₃ H ₁₅ Cl ₂ N ₃	Triazol	Fungicida
Pendimetalina	2,8	5,2	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	Dinitroanilina	Herbicida
Permetrina cis	-	6,1	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	Piretróide	Inseticida e acaricida
Piraclostrobina	-	4,0	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	Estrobilurina	Fungicida
Pirazofós	-	3,8	C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₅ PS	Fosforotioato de heterociclo	Inseticida e fungicida

Composto	pKa^a	Log K_{ow}^b	Fórmula Molecular	Classe Química	Ação Agronômica
Pirimetanil	3,5	2,8	C ₁₂ H ₁₃ N ₃	Anilinpírimidina	Fungicida
Pirimicarbe	4,4	1,7	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	Dimetilcarbamato	Inseticida
Pirimifós-metílico	4,3	3,9	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	Organofosforado	Inseticida e acaricida
Profenofós	-	4,4	C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS	Organofosforado	Inseticida e acaricida
Prometrina	4,1	3,3	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	Triazina	Herbicida
Protiofós	-	5,6	C ₁₁ H ₁₅ Cl ₂ O ₂ PS ₂	Organofosforado	Inseticida
Quinalfós	-	4,4	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃ PS	Organofosforado	Inseticida e acaricida
Tebuconazol	5,0	3,7	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	Triazol	Fungicida
Tebufempirada	-	4,9	C ₁₈ H ₂₄ ClN ₃ O	Pirazol	Inseticida e acaricida
Tetraconazol	0,6	3,6	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ F ₄ N ₃ O	Triazol	Fungicida
Tolifluanida	-	3,9	C ₁₀ H ₁₃ Cl ₂ FN ₂ O ₂ S	Sulfamida	Fungicida
Triadimefom	-	3,7	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	Azol	Fungicida
Trifloxistrobina	-	4,5	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄	Estrobilurina	Fungicida
Trifluralina	-	5,2	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄	Dinitroanilina	Herbicida
Vinclozolina	-	3,0	C ₁₂ H ₉ Cl ₂ NO ₃	Oxazol	Fungicida

^a pKa: logaritmo negativo da constante de acidez do composto (Ka); ^b Log K_{ow}: coeficiente de partição octanol/água;

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

Em sistemas cromatográficos são necessários a adição de um Padrão Interno (PI) e um Padrão de Controle (PC), com o propósito de assegurar a execução correta do procedimento de extração e de análise nas amostras analisadas (SANTE, 2015). Dessa forma, pode-se minimizar fontes de erros e melhorar a eficiência de extração (PRESTES et al., 2009). Neste trabalho, foi empregado o trifenilfosfato como PI e atrazina-d5 como PC.

3.5 CONDIÇÕES DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO GC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM PLANTAS MEDICINAIS

As condições do sistema cromatográfico GC-MS/MS, modelo Agilent Intuvo 9000, foram sugeridas pelo fabricante do equipamento e estão descritas a seguir:

- ❖ Vazão/pressão: vazão constante 1,2 mL min⁻¹
- ❖ Gás carreador: hélio
- ❖ Temperatura do injetor: 280 °C
- ❖ Volume e modo de injeção: 1 µL - *splitless* pulsado
- ❖ Pressão: 12,4 psi
- ❖ Temperatura do forno: mantido por 1 min a 60°C, 40°C/min para 170 °C e 10°C/min para 310 °C.
- ❖ Coluna capilar planar HP-5 MS UI (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
- ❖ Temperatura do “*guard-chip*”: 150 °C
- ❖ Temperatura do “*bus temperature*”: 280 °C
- ❖ Temperatura do *transfer line*: 290 °C
- ❖ Temperatura da fonte: 300 °C
- ❖ Modo de ionização: impacto por elétrons (High Efficiency Source- HES)
- ❖ Modo de aquisição: monitoramento de reações múltiplas dinâmico (dMRM)
- ❖ Gás de colisão e vazão: nitrogênio - 1,5 mL min⁻¹
- ❖ Temperatura dos quadropolos MS1 e MS2: 150 °C

3.6 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM PLANTAS MEDICINAIS

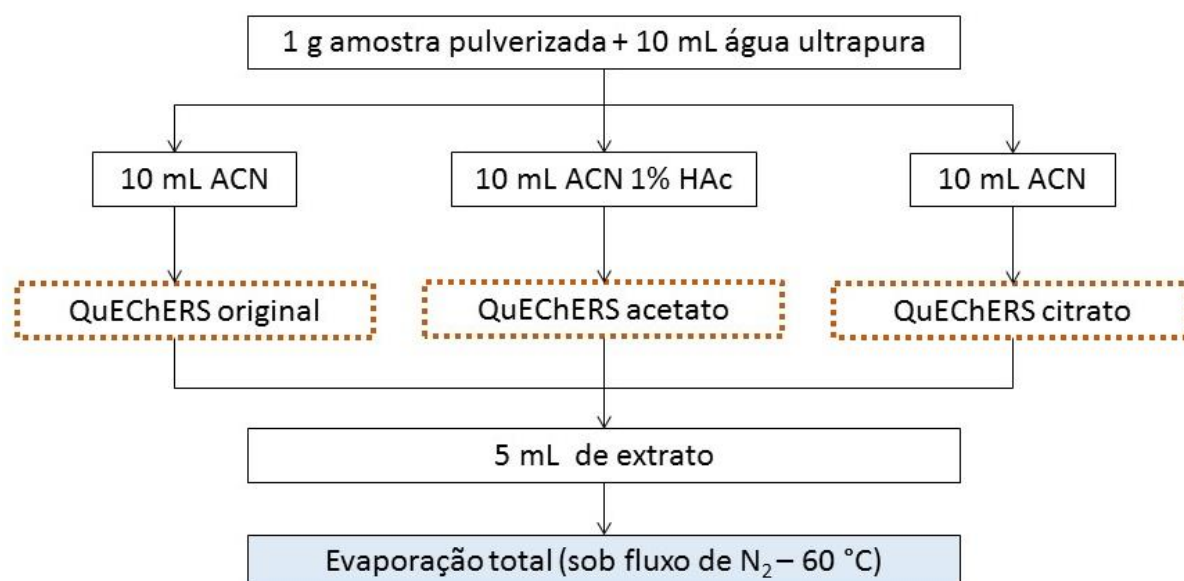
3.6.1 Avaliação do teste gravimétrico na etapa de partição/extração

Neste trabalho, avaliou-se as versões do método QuEChERS original (ANASTASSIADES et al., 2003), acetato (LEHOTAY et al., 2005) e citrato

(ANASTASSIADES et al., 2007) para escolher o melhor método de extração/partição. Os ensaios foram realizados em tubos de polipropileno de 50 mL contendo 1 g de amostra hidratada com 10 mL de água ultrapura, solvente de extração e os sais de partição. As amostras foram pulverizadas em moinho. A quantidade de amostra empregada neste método e a necessidade de adição de água na amostra foram com base nos trabalhos na literatura científica (MORENO-GONZÁLEZ et al., 2015; QIN, et al., 2015; PÉREZ-PARADA et al., 2016; TAHA, 2016; TREVISAN et al., 2017).

Inicialmente, para a verificação da eficiência dos métodos de extração, em relação à quantidade de coextrativos da matriz extraídos pelo método, empregou-se o teste gravimétrico para todas as matrizes. A avaliação foi realizada através da massa resultante da evaporação até a secura de 5 mL de extrato, por 30 minutos a uma temperatura em torno de 60 °C em TurboVap. A massa resultante foi calculada de acordo com a diferença da massa do tubo de vidro vazio e a massa do tubo de vidro após a adição do volume de extrato evaporado. A execução das extrações foi conforme as quantidades de sais de partição e volume de solvente de extração dos métodos originais (ANASTASSIADES et al., 2003; LEHOTAY et al., 2005; ANASTASSIADES et al., 2007). Foram usados os kits prontos de sais de partição para a realização da extração de 1 g de amostra com 10 mL de água ultrapura. O procedimento está representado no na Figura 1 abaixo:

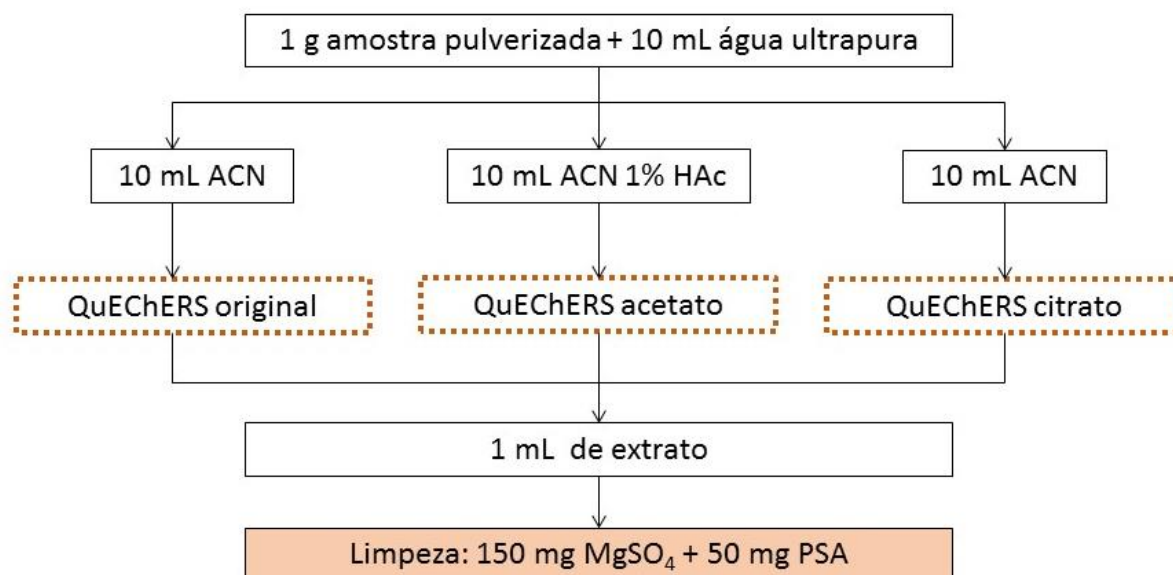
Figura 1 - Fluxograma representativo do procedimento realizado para a análise gravimétrica, avaliando-se a eficiência de extração de coextrativos nos métodos QuEChERS original, acetato e citrato.



3.6.2 Avaliação da eficiência de extração dos compostos selecionados para análise em plantas medicinais

Após a realização do teste gravimétrico, os extratos de *Ginkgo biloba* L. provenientes da etapa de extração/partição de cada um dos métodos avaliados (QuEChERS original, acetato e citrato), foram submetidos a uma etapa de limpeza dispersiva (kit de limpeza) contendo 150 mg de $MgSO_4$ e 50 mg de PSA (ANASTASSIADES et al., 2003; LEHOTAY et al., 2005; ANASTASSIADES et al., 2007). A eficiência de extração foi avaliada para cada método mediante injeção ao sistema cromatográfico GC-MS/MS, $n=3$, dos extratos obtidos de amostras “branco”, fortificadas no nível de $20 \mu g kg^{-1}$. O procedimento realizado está representado na Figura 2 a seguir.

Figura 2 - Fluxograma representativo para avaliação da eficiência de extração dos compostos selecionados em extrato de *Ginkgo biloba* L.



3.6.3 Avaliação da remoção de interferentes na etapa de limpeza (*clean up*) do método QuEChERS em plantas medicinais

Após a avaliação do procedimento de extração, avaliou-se diferentes combinações de sorventes comumente empregados na etapa de limpeza do método QuEChERS. Também foram avaliados diferentes sorventes empregando a técnica de SPE.

Os ensaios e as combinações dos sorventes avaliados estão descritos nas Tabelas 6 e 7. Utilizou-se 1 mL de extrato para a realização de cada um dos testes por d-SPE. Os testes T2, T3 e T5 foram realizados empregando kits de limpeza comerciais. Os testes T1, T4, T6, T7, T8, T9, T10 e T11 foram realizados pesando-se as massas dos sorventes (a granel). Dessa forma, as quantidades de sorventes dos testes realizados a granel seguiram de acordo com a massa dos sorventes contidos nos kits. Para os testes empregando SPE, utilizou-se 2 mL de extrato para procedimentos que empregaram um único cartucho e 3 mL de extrato para testes realizados com combinações de 2 cartuchos. Isto se fez necessário, a fim de obter um extrato final para injeção de aproximadamente 1 mL. Devido à presença de pigmentos nos extratos das plantas medicinais, os sorventes foram avaliados primeiramente quanto à eficiência de remoção destes coextrativos (pigmentação). Além disso, avaliou-se a eficiência de extração dos compostos de interesse.

Tabela 6 - Testes de limpeza empregando d-SPE realizados após a definição do método de extração.

Teste	Etapa de partição/extração	Etapa de limpeza
T1	1 g de amostra 10 mL água ultrapura 10 mL acetronitrila 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl + 1 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O + 0,5 g C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ .1,5H ₂ O Agitação manual (1 min) Centrifugação 6000 rpm/8 min	1 mL de extrato 150 mg MgSO ₄ + 50 mg C ₁₈ Agitação em vórtex (1 min) Centrifugação 10000 rpm/8 min
T2		1 mL de extrato 150 mg MgSO ₄ + 50 mg C ₁₈ + 50 mg PSA Agitação em vórtex (1 min) Centrifugação 10000 rpm/8 min
T3		1 mL de extrato 150 mg MgSO ₄ + 50 mg GCB + 50 mg PSA Agitação em vórtex (1 min) Centrifugação 10000 rpm/8 min
T4		1 mL de extrato 150 mg MgSO ₄ + 50 mg GCB + 50 mg C ₁₈ Agitação em vórtex (1 min) Centrifugação 10000 rpm/8 min
T5		1 mL de extrato 150 mg MgSO ₄ + 50 mg GCB + 50 mg C ₁₈ + 50 mg PSA Agitação em vórtex (1 min) Centrifugação 10000 rpm/8 min
T6		1 mL de extrato 150 mg CaCl ₂ + 50 mg PSA Agitação em vórtex (1 min) Centrifugação 10000 rpm/8 min
T7		1 mL de extrato 150 mg CaCl ₂ + 50 mg C ₁₈ Agitação em vórtex (1 min)

Teste	Etapa de partição/extração	Etapa de limpeza
		Centrifugação 10000 rpm/8 min
T8		1 mL de extrato 150 mg CaCl ₂ + 50 mg C ₁₈ + 50 mg PSA Agitação em vórtex (1 min) Centrifugação 10000 rpm/8 min
T9		1 mL de extrato 150 mg CaCl ₂ + 50 mg GCB + 50 mg PSA Agitação em vórtex (1 min) Centrifugação 10000 rpm/8 min
T10	1 g de amostra 10 mL água ultrapura 10 mL acetronitrila 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl + 1 g	1 mL de extrato 150 mg CaCl ₂ + 50 mg GCB + 50 mg C ₁₈ Agitação em vórtex (1 min) Centrifugação 10000 rpm/8 min
T11	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O + 0,5 g C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ .1,5H ₂ O Agitação manual (1 min) Centrifugação 6000 rpm/8 min	1 mL de extrato 150 mg CaCl ₂ + 50 mg GCB + 50 mg C ₁₈ + 50 mg PSA Agitação em vórtex (1 min) Centrifugação 10000 rpm/8 min
T12		1 mL de extrato + 1 mL água ultrapura 120 mg EMR-Lipid [®] + 100 mg PSA + 100 mg GCB Agitação em vórtex (1 min) Centrifugação 10000 rpm/8 min 1 mL sobrenadante 240 mg polish [®] Agitação em vórtex (1 min) Centrifugação 10000 rpm/8 min

Tabela 7 - Testes de limpeza em fase sólida (SPE) realizados após a definição do método de extração.

Teste	Etapa de partição/extração	Etapa de limpeza
T13	<p>1 g de amostra 10 mL água ultrapura 10 mL acetronitrila 4 g MgSO₄ + 1 g NaCl + 1 g C₆H₅Na₃O₇.2H₂O + 0,5 g C₆H₆Na₂O₇.1,5H₂O Agitação manual (1 min) Centrifugação 6000 rpm/8 min</p>	2 mL extrato EMR Captiva® (300 mg/3 mL)
T14		2 mL de extrato BeCarbon/PSA (250 mg/250 mg/3 mL)
T15		3 mL de extrato EMR Captiva® (300 mg/3 mL) e 100 mg Bond Elut NH ₂
T16		3 mL de extrato EMR Captiva® (300 mg/3 mL) + Bond Elut NH ₂ (500 mg/3 mL)
T17		3 mL de extrato EMR Captiva® (300 mg/3 mL) + 100 mg Bond Elut NH ₂ + 100 mg Na ₂ SO ₄
T18		3 mL de extrato EMR Captiva® (300 mg/3 mL) + Bond Elut NH ₂ (500 mg/3 mL) + 100 mg Na ₂ SO ₄
T19		3 mL de extrato EMR Captiva® (300 mg/3 mL) + BeCarbon/PSA (250 mg/250 mg/3 mL)
T20		3 mL de extrato EMR Captiva® (300 mg/3 mL) + BeCarbon/PSA (250 mg/250 mg/3 mL) + 100 mg Na ₂ SO ₄

3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM PLANTAS MEDICINAIS POR GC-MS/MS

3.7.1 Método QuEChERS citrato modificado validado neste trabalho

O método QuEChERS citrato avaliado neste trabalho foi validado de acordo com os parâmetros descritos na Tabela 8.

Tabela 8 - Parâmetros avaliados na etapa de validação dos métodos descritos neste trabalho.

Parâmetro	Aplicação	Referência
Seletividade	Comparação dos cromatogramas obtidos com as injeções no sistema GC-MS/MS de extratos “branco”, ou seja, ausente dos compostos em estudo, e da amostra fortificada com estes compostos.	BRASIL, 2017
Curva analítica e faixa linear	Avaliação da linearidade das curvas analíticas do tipo $y=ax+b$ obtidas pela correlação entre a resposta analítica e a concentração de cada composto injetado no equipamento. A faixa linear foi de 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.	BRASIL, 2017
Efeito matriz	Comparação entre as inclinações das retas obtidas com as curvas analíticas preparadas no solvente (acetonitrila) e na matriz (extrato “branco” de <i>Ginkgo biloba</i> L.) através da fórmula: $EM = \frac{x_1 - x_2}{x_2} \times 100$ x_1 = coeficiente angular da inclinação da reta da curva analítica preparada no extrato da matriz; x_2 = coeficiente angular da inclinação da reta da curva preparada no solvente	BRASIL, 2017
Limite de quantificação e detecção	O LOQ e LOD foram calculados conforme a relação sinal/ruído calculada pelo software do equipamento, considerando no mínimo 3 e 10 vezes a razão do sinal pela linha de base (ruído), respectivamente.	BRASIL, 2017

Parâmetro	Aplicação	Referência
Exatidão	Foi avaliada através de ensaios de fortificação em extrato “branco” de <i>Ginkgo biloba</i> L. em quatro níveis de concentração (5, 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) em replicatas (n=6).	BRASIL, 2017
Precisão e Precisão intermediária	Para a precisão do método, em termos de repetitividade, foi avaliada através da fórmula de desvio padrão relativo (RSD) para as 6 replicatas injetadas uma única vez nos níveis de fortificação 5, 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para a precisão intermediária (RSD _{pi}) do método, foi avaliada executando-se a mesma metodologia em dias diferentes e com diferentes analistas, porém nos níveis de fortificação 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=6).	BRASIL, 2017
Robustez	Foram aplicadas algumas modificações no método QuEChERS citrato, com a finalidade de avaliar a capacidade do método em resistir a estas variações. As modificações foram: 1) utilização de sais de partição de outros fornecedores e pesagem dos sais em tubos de polipropileno de 50 mL no lugar de pacotes de sais de partição; 2) em todas as etapas de agitação, foram realizadas de modo manual, ao invés de agitação em vórtex; 3) adição de homogeneizadores de cerâmica nos tubos com os sorventes de limpeza; 4) utilização de filtros de nylon de 0,2 μm de outro fornecedor.	BRASIL, 2017

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO GC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM PLANTAS MEDICINAIS

Apesar de ter alguns compostos com tempos de retenção próximos, a espectrometria de massas permitiu a identificação inequívoca de 74 compostos, através da escolha de diferentes transições. A Tabela 9 apresenta todos os agrotóxicos analisados por GC-MS/MS, utilizando o modo de ionização EI, modo de aquisição SRM, com seus respectivos tempos de retenção (t_R), íons precursores e íons produtos selecionados para as etapas de quantificação e identificação de cada composto em estudo.

Tabela 9 - Agrotóxicos analisados por GC-MS/MS, utilizando modo de aquisição SRM, com seus respectivos tempos de retenção (t_R), íons precursores e produtos para quantificação e identificação e energias de colisão (EC).

t_R (min)	Compostos	1ª Transição Quantificação	EC (V)	2ª Transição Identificação	EC (V)
9,0528	Alacloro	188→160	10	188→132	20
9,7058	Aldrin	262→192	35	262→190	35
9,0364	Ametrina	227→170	10	227→58	10
7,7643	Atrazina	214→200	5	214→58	5
7,7100	Atrazina-d5 (PC)	205→127	5	205→105	10
16,2015	Boscalida	140→122	10	140→76	25
11,5149	Bupirimato	272→193	5	272→108	15
7,3467	Cadusafós	158→131	5	158→97	15
10,1420	Ciprodinil	226→225	10	225→224	10
10,7568	Clordano-trans	374→265	15	372→265	15
11,7412	Clorfenapir	328→247	20	247→227	20
10,4029	Clorfenvinfós	295→267	5	267→159	20
9,7152	Clorpirifós	314→258	15	199→171	15
8,9445	Clorpirifós-metílico	286→93	25	125→47	15
7,0329	Clorprofam	153→125	10	153→90	25
12,1277	DDT-o,p'	237→165	20	235→199	15
12,7011	DDT-p,p'	237→165	20	235→199	15
8,1377	Diazinona	199→93	15	137→84	10

t_R (min)	Compostos	1ª Transição Quantificação	EC (V)	2ª Transição Identificação	EC (V)
7,6771	Diclorana	206→176	10	160→124	10
8,2702	Dissulfoton	142→109	5	142→80	15
10,9822	Endossulfan alfa	194→160	5	194→159	5
11,9635	Endossulfan beta	207→172	15	195→159	10
11,4249	Endrin	317→281	5	263→193	35
13,2354	Epoxiconazol	192→138	10	192→111	25
13,3827	Espiromesifeno	273→255	5	272→254	5
12,1155	Etiona	231→175	10	153→97	10
6,9630	Etoprofós	158→114	5	158→97	15
8,3760	Etrinfos	292→181	5	181→153	10
13,8054	Fenamidona	268→180	20	238→237	10
14,7213	Fenarimol	251→139	10	219→107	10
9,3689	Fenitrotiona	277→260	5	125→79	5
10,3804	Fipronil	367→213	25	351→255	15
11,6787	Fluazifop-p-butílico	383→282	10	282→238	15
15,4825	Fluquinconazol	340→298	15	340→108	40
11,4769	Flusilazol	315→233	10	233→165	15
10,0402	Fostiazato	199→102	5	195→103	5
8,0080	HCH-gama (Lindano)	219→183	5	217→181	5
7,5395	HCH-alfa	219→183	5	219→181	5
7,8924	HCH-beta	219→183	5	217→181	5
9,1363	Heptacloro	274→239	15	274→237	15
7,6610	Hexaclorobenzeno	284→249	15	284→214	30
17,6402	Indoxacarbe	203→134	15	203→106	25
13,3606	Iprodiona	314→56	20	244→187	5
9,5093	Malationa	173→99	15	158→125	5
13,8812	Metconazol	138→69	10	125→99	20
10,7237	Metidationa	145→85	5	145→58	15
9,3589	Metiocarbe	168→153	10	168→109	15
9,6670	Metolacloro	240→162	10	238→162	10
13,6839	Metoxicloro	227→212	15	227→169	25

t_R (min)	Compostos	1ª Transição Quantificação	EC (V)	2ª Transição Identificação	EC (V)
5,6417	Mevinfós	127→109	10	127→95	15
11,4346	Miclobutanil	179→125	10	179→90	30
14,5092	Mirex	272→237	20	237→143	30
12,9611	Nuarimol	235→139	15	203→107	10
12,1296	Oxadixil	163→132	5	163→117	25
8,9445	Parationa metílica	263→109	10	125→79	5
10,2927	Penconazol	248→192	15	248→157	25
10,2631	Pendimetalina	252→162	10	252→161	15
15,2466	Permetrina cis	183→168	10	183→153	15
17,0597	Piraclostrobina	164→132	10	132→104	15
14,7751	Pirazofós	232→204	10	221→193	10
8,1347	Pirimetanil	198→183	15	198→158	20
8,5634	Pirimicarbe	238→166	10	166→96	15
9,3629	Pirimifós metílico	290→125	20	233→125	5
11,2556	Profenofós	339→268	15	297→268	5
9,0870	Prometrina	241→184	10	226→184	10
11,2077	Protiofós	309→239	15	267→239	5
10,4654	Quinalfós	157→129	15	146→118	10
12,9366	Tebuconazol	250→125	20	125→99	20
13,7618	Tebufenpirad	333→171	15	318→131	15
9,8169	Tetraconazol	336→218	20	336→204	30
11,2629	Tolifluanida	238→137	15	137→91	20
9,7723	Triadimefom	208→181	5	208→111	20
13,0080	Trifenilfosfato (PI)	325→169	20	325→77	40
12,6257	Trifloxistrobina	172→145	15	116→89	15
7,1591	Trifluralina	306→264	5	264→206	5
8,9146	Vinclozolina	212→172	15	197→145	15

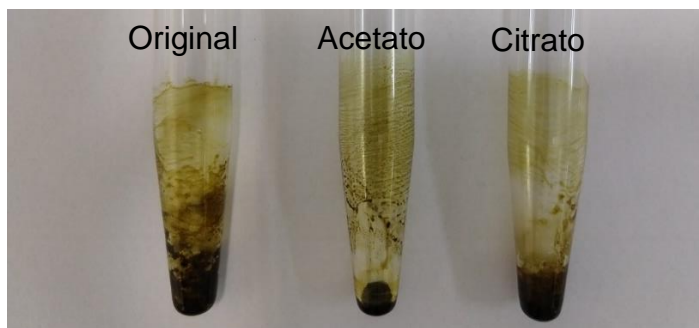
4.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM PLANTAS MEDICINAIS

4.2.1 Avaliação do teste gravimétrico na etapa de extração/partição

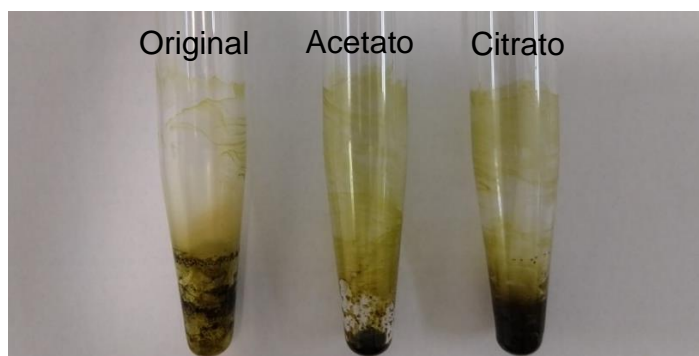
A etapa de preparo de amostra é extremamente importante no desenvolvimento de métodos multirresíduo, principalmente, devido aos diferentes compostos presentes na matriz estudada e às propriedades físico-químicas dos compostos a serem extraídos. As plantas medicinais apresentam uma grande complexidade de substâncias químicas, tais como ácidos orgânicos, compostos fenólicos, vitaminas, pigmentos, entre outros. A presença destes compostos no extrato onde estão presentes os analitos pode interferir na resposta cromatográfica. Dessa forma, avaliou-se através da análise gravimétrica, a eficiência de extração de interferentes da matriz. As três versões do método QuEChERS (original, acetato e citrato) foram avaliadas em relação à extração de coextrativos na etapa de extração/partição (Figura 3) para todas as plantas medicinais em estudo. Os resultados foram obtidos a partir da massa resultante da evaporação total sob fluxo de N₂ de 5 mL de extrato. A Figura 4 mostra os resultados obtidos, em quantidade de massa residual pesada, da evaporação total dos extratos das matrizes estudadas.

Figura 3 - Avaliação visual dos extratos obtidos para cada uma das amostras de planta avaliadas (ginkgo, espinheira-santa, guaco e camomila) pelos métodos QuEChERS original, acetato e citrato, respectivamente.

A) *Ginkgo biloba* L.



B) *Maytenus ilicifolia*



C) *Mikania glomerata* Spreng

D) *Matricaria chamomilla*

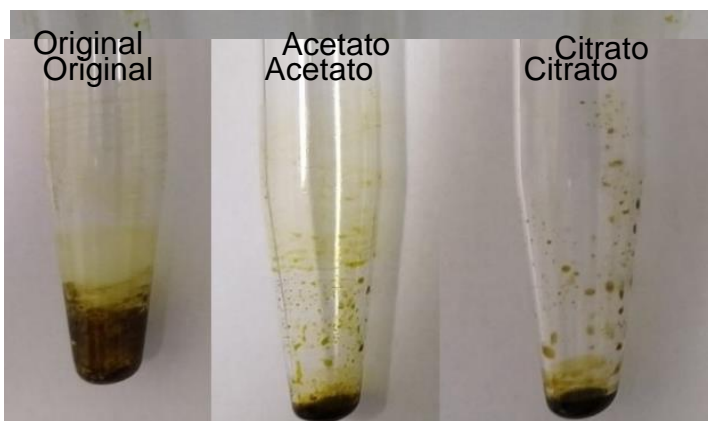
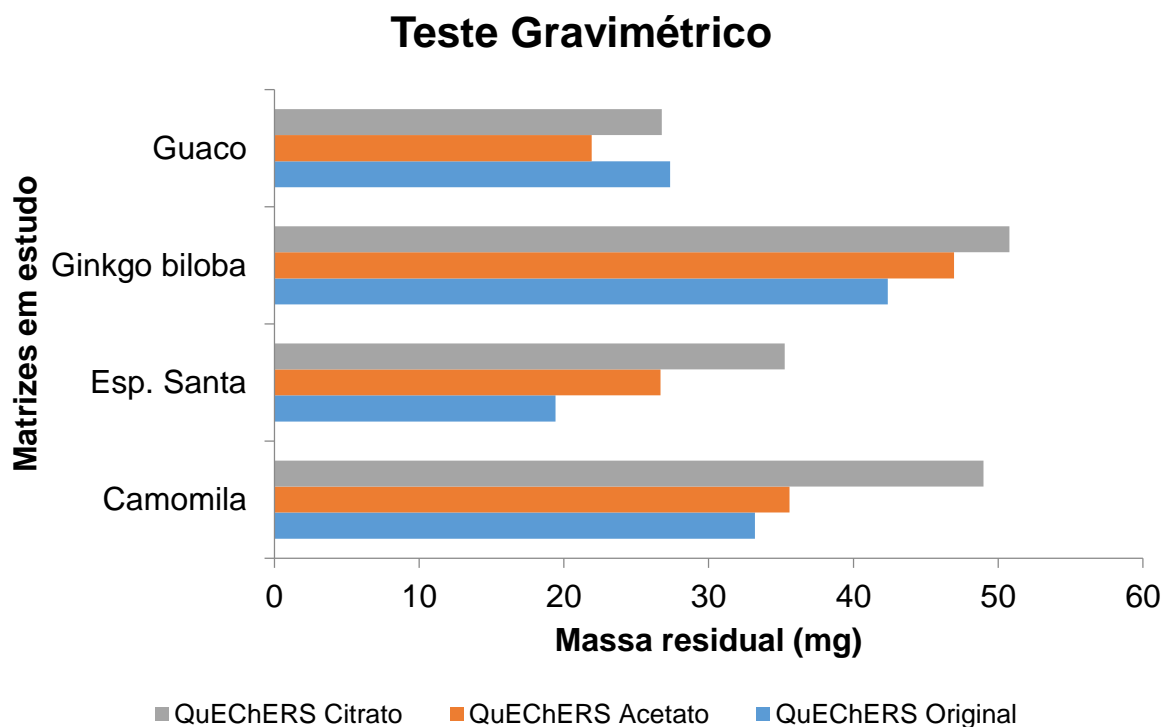


Figura 4 - Avaliação dos QuEChERS citrato, acetato e original nas matrizes em estudo, quanto à eficiência de extração de interferentes através do teste gravimétrico.

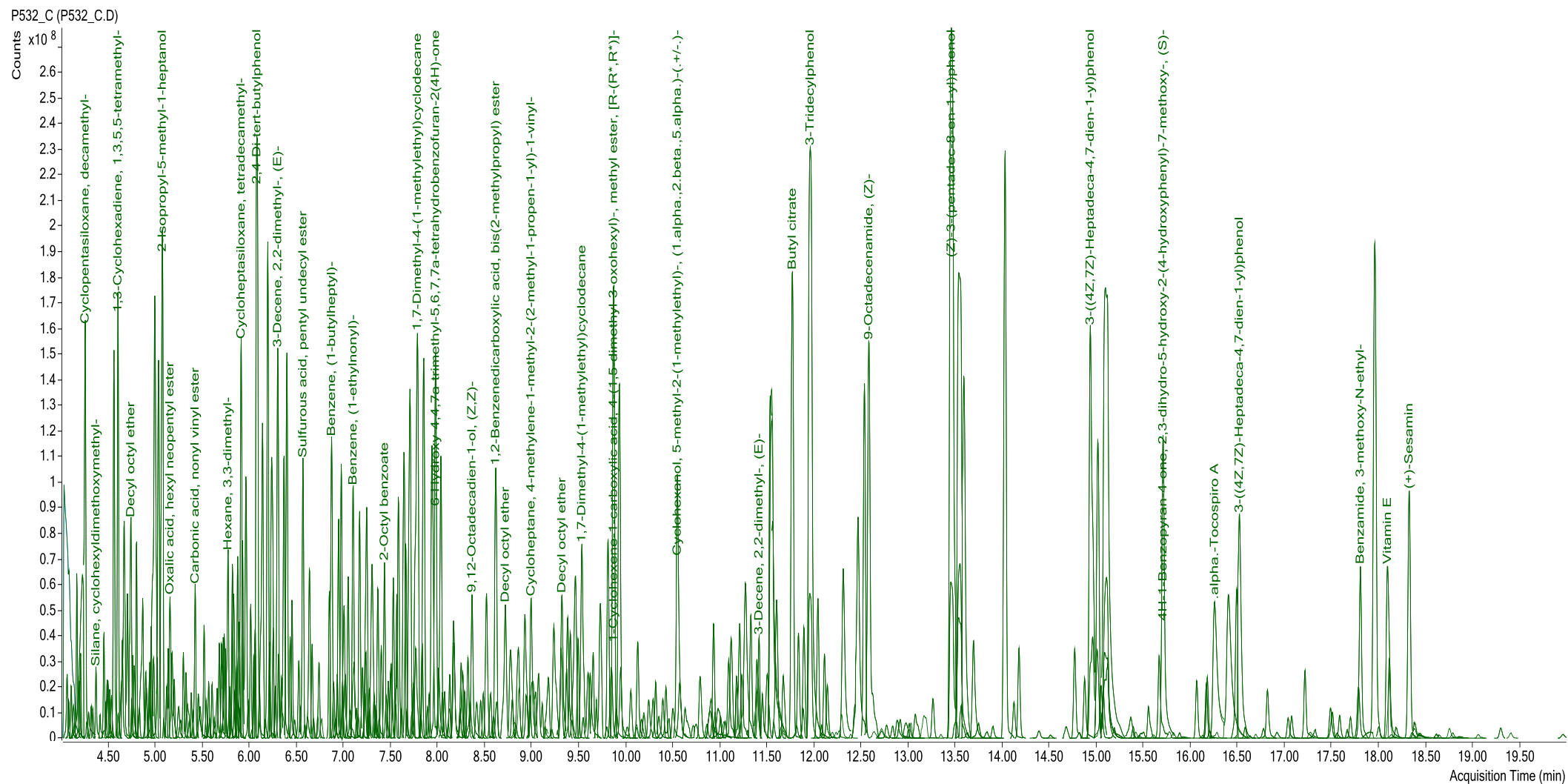


De acordo com a Figura 4, é possível observar que para a maioria das matrizes estudadas, o método QuEChERS citrato foi o que extraiu maior quantidade, em massa, de coextrativos das amostras avaliadas. Além disso, dentre as matrizes avaliadas, percebe-se que os extratos provenientes de *Ginkgo biloba* L., apresentaram maior quantidade de coextrativos em relação às outras matrizes (Figuras 3 e 4). O *Ginkgo biloba* L. é constituído por flavonoides, terpenoides, biflavonas e ácidos orgânicos (Figura 5) (FERMINO et al., 2015). A *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) apresenta terpenos, flavonoides, óleos essenciais e compostos aromáticos (ALMEIDA et al., 2015). Entre os constituintes de *Mikania glomerata* Spreng. (guaco), encontram-se flavonoides, taninos, saponinas sesquiterpenos e diterpenos, como também ácidos orgânicos (LOPES, 2015). A *Matricaria chamomilla* (camomila) apresenta terpenos, óleos essenciais, flavonoides e ácidos orgânicos (PACÍFICO et al., 2018). Percebe-se que o extrato da amostra de *Ginkgo biloba* L., apresenta uma complexidade de componentes químicos, demonstrando ser uma matriz heterogênea no âmbito das análises químicas, conforme a Figura 5 a seguir. De acordo com a literatura, dentre os métodos de preparo de amostra mais empregados para posterior determinação de resíduos de agrotóxicos em plantas

medicinais, está o método QuEChERS citrato (LOZANO et al., 2012; WU et al., 2015; TAHA, 2016; MACHADO et al., 2017).

A partir disso, os testes seguintes foram realizados em extrato de *Ginkgo biloba* L. para a avaliação da eficiência de extração dos agrotóxicos selecionados neste trabalho. Posteriormente, realizou-se uma extensão do escopo para as demais plantas (camomila, espinheira-santa e guaco) em estudo.

Figura 5 - Cromatograma obtido por GC-MS em modo scan referente ao extrato do método QuEChERS citrato de *Ginkgo biloba L.*



4.2.2 Avaliação da eficiência de extração do método QuEChERS em plantas medicinais para posterior determinação de agrotóxicos

Após a realização do teste gravimétrico, as três versões do método QuEChERS foram avaliadas quanto à eficiência de extração dos agrotóxicos em estudo. Os testes realizados seguiram o protocolo de cada um dos métodos, mantendo-se as quantidades de sais de partição. Porém, empregou-se 1 g de amostra e realizou-se a adição de água antes da adição do solvente de extração. A adição de água se fez necessária devido a baixa concentração de umidade nas amostras. Desta forma, promove melhor extração de compostos polares (PSOMA et al., 2015). O $MgSO_4$ e o PSA foram empregados como teste preliminar na etapa de limpeza dos extratos para cada uma das versões do método QuEChERS. A avaliação da eficiência de extração foi realizada através de ensaios de fortificação na amostra “branco” de ginkgo no nível de $20 \mu g kg^{-1}$ (n=3) e posterior injeção no sistema GC-MS/MS.

De acordo com os resultados obtidos, foi observado que o maior número de compostos recuperados, dentro da faixa adequada (70-120%), foram obtidos através do método QuEChERS citrato. No método QuEChERS citrato, emprega-se a ACN como solvente de extração. A ACN apresenta a habilidade de extrair mais compostos polares naturais das plantas (TAHA, 2016). Isto pode ser explicado pelo fato de que no teste gravimétrico, houve maior quantidade de coextrativos extraídos no *Ginkgo biloba* L.. Além disso, a ACN é amplamente empregada em processos de extração em inúmeras matrizes, devido a sua capacidade de extrair uma variedade de compostos orgânicos de diferentes polaridades (ANASTASSIADES et al., 2003; LEE et al., 2017). A boa eficiência de extração usando este método para determinação de resíduos em plantas medicinais tem sido reportada em diversos trabalhos acadêmicos (LOZANO et al., 2012; WU et al., 2015; MACHADO et al., 2017). Além disso, os sais tamponantes de citrato permitem a constância de pH em torno de 5,0 a 5,5 durante o processo de extração em plantas medicinais, mantendo a estabilidade dos compostos básico sensíveis (RUTKOWSKA, ŁOZOWICKA. e KACZYŃSKI, 2018). Isto ocorre no caso da tolifluanida, a qual possui dependência do pH para sua estabilidade e, nas extrações realizadas, demonstrou valores de recuperações de 112%, 68% e 169% para os métodos QuEChERS citrato, acetato e original, respectivamente.

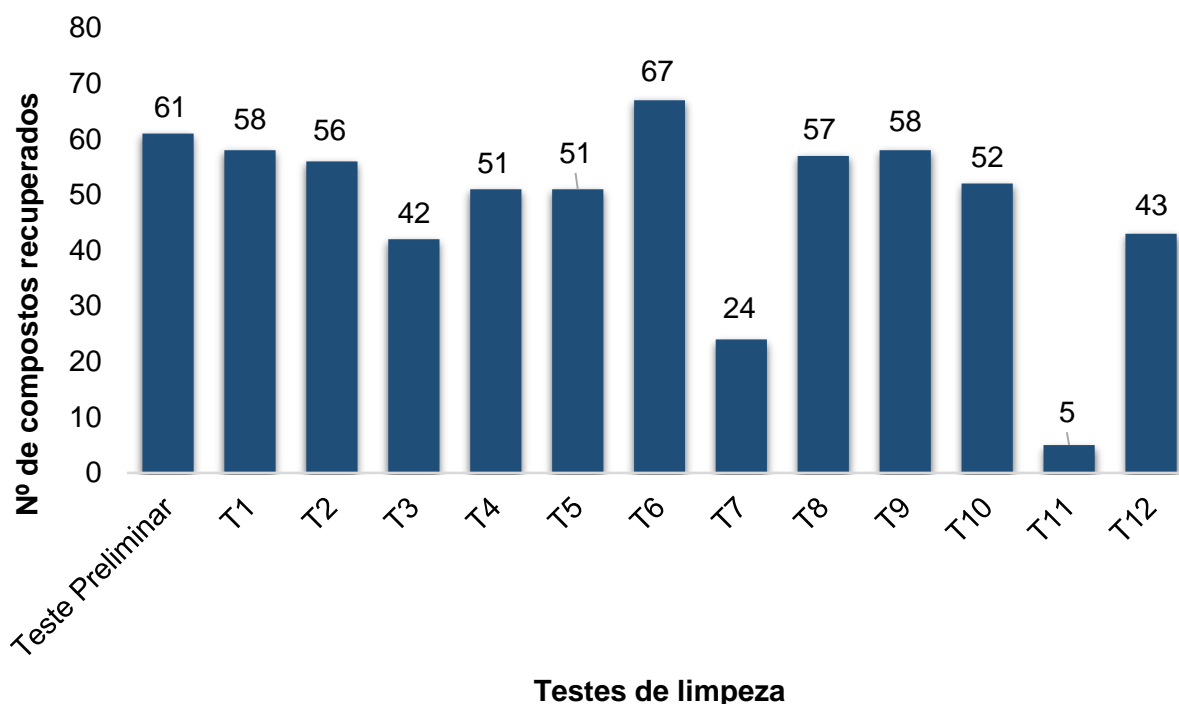
No método QuEChERS acetato, houve recuperações entre 50 a 60% para a maioria dos compostos. Nesta versão de QuEChERS, o meio de extração apresenta

pH em torno de 4,8 (PRESTES et al., 2009). Além disso, devido ao forte tamponamento existente, a eficiência de limpeza do PSA é afetada. O desempenho de limpeza pelo PSA em método QuEChERS acetato é visivelmente pior que no método QuEChERS original, o qual não apresenta procedimento de tamponamento (REJCZAK e TUZIMSKI, 2015). A baixa resposta cromatográfica, também pode ser um dos motivos pelas baixas recuperações obtidas neste método em nível de 20 µg kg⁻¹ de fortificação (CHEN et al., 2016).

4.2.3 Avaliação da remoção de interferentes na etapa de limpeza (*clean up*) do método QuEChERS em plantas medicinais

A etapa de limpeza apresenta grande importância em relação aos métodos analíticos de determinação de compostos orgânicos em matrizes complexas. Dessa forma, esta etapa torna-se um grande desafio em métodos multirresíduo. Além disso, em métodos para a determinação de resíduos de agrotóxicos em plantas medicinais, deve-se considerar que cada planta analisada apresenta uma complexidade de constituintes, devido à falta de padronização dos extratos vegetais (SOUZA-MOREIRA et al., 2008). Com isso, avaliou-se diferentes sorventes descritos no item 3.6.3, visando a obtenção de um método com o maior número de compostos recuperados dentro da faixa aceitável (70-120% com RSD ≤ 20%). Os testes foram executados com amostra branco de *Ginkgo biloba* L. fortificadas no nível de 20 µg kg⁻¹ e posterior determinação no sistema GC-MS/MS. Os testes para avaliação dos sorventes foram realizados utilizando-se kits de limpeza dispersiva (d-SPE) e material a granel, que possibilitou diferentes variações de sorventes, mantendo-se a mesma proporção de massa empregada nos kits. A Figura 6 mostra a quantidade de compostos recuperados dentro da faixa aceitável para cada um dos testes de limpeza (d-SPE) executados. O teste preliminar descrito na Figura 6, refere-se ao teste realizado no item 4.2.2.

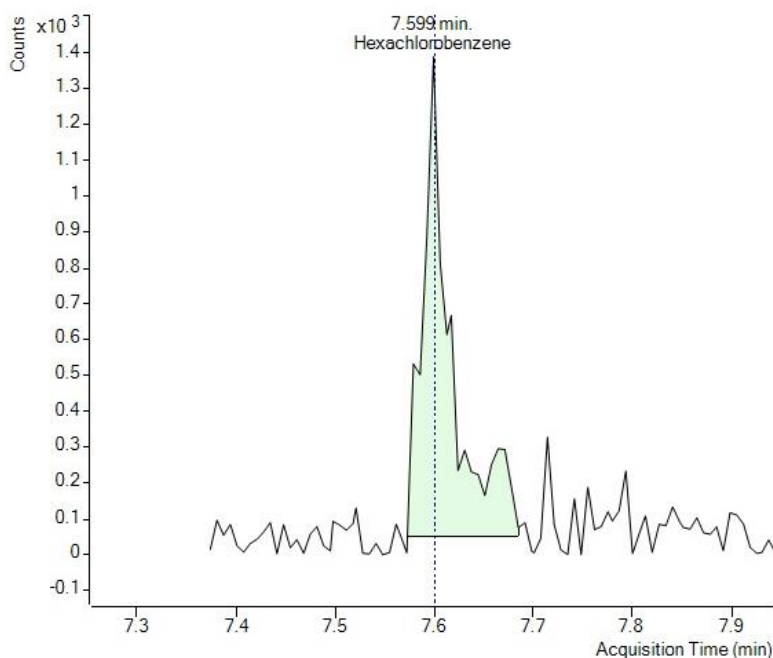
Figura 6 - Número de compostos recuperados na faixa de 70 a 120% para os testes de limpeza por d-SPE, avaliados no nível de fortificação de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$.



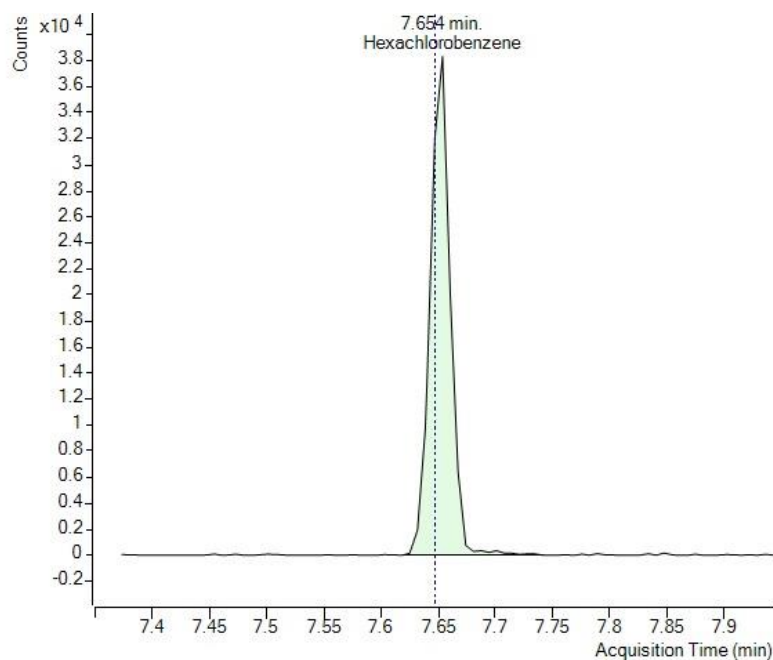
Comumente, o uso de d-SPE na etapa de limpeza tem-se mostrado útil na melhora das percentagens de recuperação e precisão de compostos orgânicos (MARTINEZ-DOMINGUEZ et al., 2014). Conforme a Figura 6 pode-se observar que os resultados obtidos com GCB nos testes (T3, T4, T5, T9, T10 e T12) foram satisfatórios, porém, este sorvente apresenta como característica a forte retenção de compostos planares (MARTÍNEZ-DOMINGUEZ et al., 2016). Por outro lado, no T11, houve recuperações satisfatórias para apenas 5 compostos (boscalida, ciprodinil, aldrin, pirimetanil e clorprofan). No presente trabalho, pode-se perceber que a utilização de GCB para compostos como hexaclorobenzeno, apresentaram baixas recuperações (< 40%) ou não apresentaram picos cromatográficos (Figura 7). Isto pode ser explicado pelo uso de grandes quantidades de GCB (50 mg), o qual favoreceu a retenção destes compostos, conforme avaliado no trabalho de Rutkowska, Łozowicka e Kaczyński (2018).

Figura 7 - Sinal cromatográfico do composto hexaclorobenzeno com seu respectivo tempo de retenção A) referente ao teste T12 e B) solução padrão $2 \mu\text{g L}^{-1}$ em solvente (acetonitrila), demonstrando que o pico determinado em A) não corresponde ao B).

A)



B)



As plantas medicinais possuem ácidos orgânicos, flavonoides, compostos fenólicos, entre outros, em sua composição (LOZANO et al., 2012). Os ensaios realizados com PSA demonstraram bons resultados, como é o caso dos testes T2,

T3, T5, T6, T8, T9, T11 e T12. Porém, a combinação de sorventes PSA e CaCl_2 (T6) proporcionou a recuperação de um maior número de compostos na faixa de 70 a 120%. O PSA tem capacidade de remover ácidos graxos, açúcares e ácidos orgânicos. Estes interferentes podem afetar a resposta cromatográfica (RUTKOWSKA, ŁOZOWICKA. e KACZYŃSKI, 2018). O bom desempenho do CaCl_2 em conjunto com PSA, não foi somente devido a sua habilidade de remoção de água da matriz, como também proporcionou a formação de sais de cálcio insolúveis com as hidroxilas dos componentes polifenólicos presentes na matriz. Além disso, o emprego desta mistura de sorventes em conjunto com ACN, promove a remoção de compostos não polares, como ceras e ácidos graxos, que são precipitados como “sabões de cálcio”, favorecendo a remoção de constituintes complexos da matriz (MACHADO et al., 2017). Em comparação com MgSO_4 , o CaCl_2 extrai menos coextrativos da matriz, como também diminui o efeito matriz (REJCZAK e TUZIMSKI, 2015).

O C_{18} tem sido reportado na etapa de limpeza de métodos multirresíduo de plantas medicinais (MORENO-GONZÁLEZ et al., 2015; PSOMA et al., 2015; QIN et al., 2015). Este sorvente retém compostos não polares, como lipídios e pigmentos. Porém, pode apresentar forte interação de agrotóxicos apolares (RUTKOWSKA, ŁOZOWICKA. e KACZYŃSKI, 2018). De acordo com a Figura 6, nota-se que, nos testes com C_{18} (T1, T2, T4, T5, T7, T8, T10 e T11), há uma diminuição no número de compostos. Lindano, clorpirifós e pendimetalina apresentaram menores valores de recuperação em testes realizados com este sorvente. Os testes de C_{18} e PSA, quando comparados, mostram que o PSA apresentou uma melhor eficiência na etapa de limpeza. Tripathy e colaboradores (2017) demonstram que durante a determinação de 11 resíduos de agrotóxicos em 4 matrizes vegetais por GC-MS, o sorvente PSA apresentou melhores resultados que o C_{18} . Além disso, observaram uma queda na recuperação de alguns compostos apolares, como HCH alfa, HCH beta, clorpirifós, pendimetalina e profenofós. Devido à natureza apolar destes compostos, há uma forte interação do sorvente C_{18} com estes (TRIPATHY et al., 2017).

O T12 apresentou 43 compostos recuperados dentro da faixa aceitável de 70-120%. Com base no trabalho de Han e colaboradores (2016), foi observado o uso do EMR-Lipid® para a remoção de pigmento em matrizes vegetais. Este sorvente apresentou a capacidade de promover recuperações de compostos com $\log K_{ow}$ entre 1 a 6, como o hexaclorobenzeno. Para compostos apolares ($\log K_{ow} > 6$), a eficiência

do EMR-Lipid[®] foi baixa (HAN et al., 2016). Porém, em comparação aos demais ensaios, este teste somente apresentou maior número de compostos recuperados que nos testes T3, T7 e T11.

Além dos testes efetuados na etapa de limpeza por d-SPE, testes de limpeza empregando cartuchos de SPE foram avaliados. Inicialmente, os extratos “branco” de *Ginkgo biloba* L. foram adicionados nos cartuchos e percolados sob atuação da gravidade. Após, os extratos obtidos foram injetados no sistema cromatográfico GC-MS, em modo *scan*, para a avaliação da remoção de interferentes da matriz. Os cromatogramas dos ensaios estão representados na Figura 8.

Conforme anteriormente citado, o uso do sorvente EMR-Lipid[®] tem sido avaliado quanto à remoção de pigmentos, em especial clorofila, em matrizes vegetais (HAN et al., 2016). Com a disponibilidade deste sorvente em cartucho, avaliou-se o EMR Captiva[®] quanto à remoção de pigmentos e eficiência de extração. Este cartucho foi testado em conjunto à outros sorventes, como NH₂ e Na₂SO₄. Nota-se, de acordo com a Figura 8, que o cromatograma referente ao teste T19, foi o melhor teste na remoção de interferentes da matriz. A partir disso, avaliou-se os cartuchos EMR Captiva e BeCarbon/PSA (T13, T14, T19 e T20) quanto à eficiência de extração dos resíduos de agrotóxicos em estudo. O cartucho BeCarbon/PSA apresenta em sua composição 250 mg de GCB e 250 mg de PSA. O GCB é amplamente empregado em matrizes vegetais devido a sua habilidade de remoção de pigmentos. Dessa forma, os extratos “branco” de *Ginkgo biloba* L. foram fortificados na concentração de 20 µg kg⁻¹ e avaliados quanto ao número de compostos recuperados com o uso destes cartuchos na etapa de limpeza. O T13 apresentou 19 compostos com recuperações entre 71 a 104%. Dentre os compostos recuperados (Figura 9), estão clordano-trans, clorfenvinfós, endrin, flusilazol, heptacloro, malationa, metidationa, metolacloro, miclobutanil, mirex e vinclozolina. Compostos organoclorados, provavelmente, ficaram retidos no cartucho como os compostos HCH alfa e beta (C₆H₆Cl₆), ou apresentaram baixas recuperações (mirex). Esta diferença de percentuais de recuperação obtidos nos testes com d-SPE e SPE possivelmente pode ser explicado devido às diferenças existentes entre os sorventes avaliados. Além disso, o d-SPE proporciona uma interação mais homogênea com o extrato da matriz, diferentemente do que ocorre em SPE.

Figura 8 - Cromatogramas obtidos a partir de injeções no sistema GC-MS/MS em modo *scan*, do extrato "branco" de *Ginkgo biloba* L. após etapa de limpeza com EMR Captiva e 100 mg Bond Elut NH₂ (T15); EMR Captiva, 100 mg Bond Elut NH₂ e 100 mg Na₂SO₄ (T17); EMR Captiva e 500 mg Bond Elut NH₂ (T16); BeCarbon/PSA (T14); EMR Captiva, 500 mg Bond Elut NH₂ e 100 mg Na₂SO₄ (T18) e EMR Captiva e BeCarbon/PSA (T19).

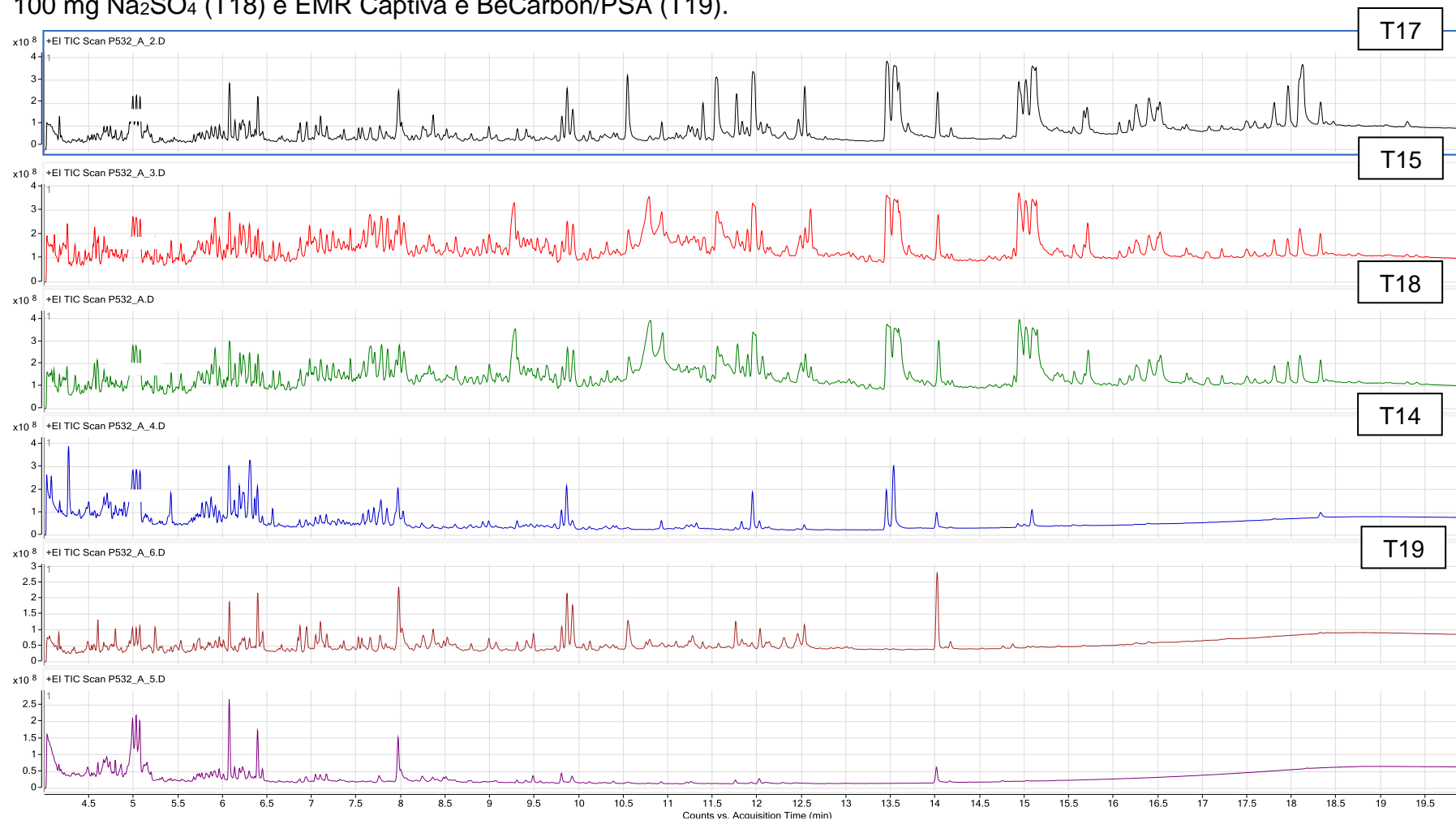
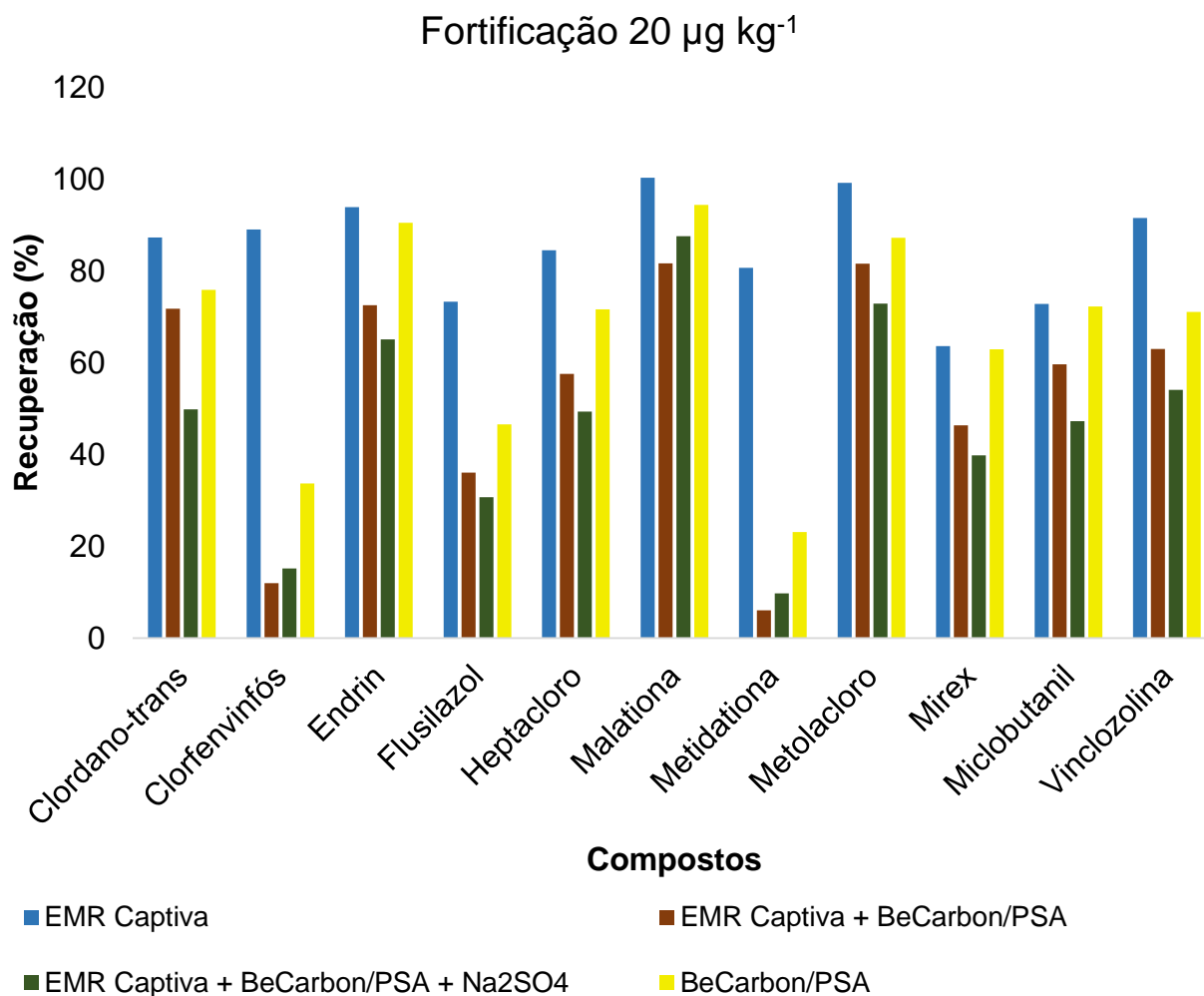


Figura 9 - Recuperação (%) para os compostos Clordano-Trans, Clorfenvinfós, Endrin, Flusilazol, Heptacloro, Malationa, Metidationa, Metolacloro, Miclobutanil, Mirex e Vinclozolina, após realização dos ensaios de limpeza com cartuchos de SPE.



Com base nos testes realizados com os cartuchos de SPE, os resultados não foram satisfatórios, pois apresentaram a habilidade de recuperar um baixo número de compostos. Portanto, para a escolha da validação de método, utilizou-se o teste T6 dos ensaios por limpeza dispersiva, o qual apresentou a recuperação de 67 compostos dentro da faixa de 70-120%.

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM PLANTAS MEDICINAIS

A validação do método QuEChERS utilizado neste estudo foi realizada com *Ginkgo biloba* L., utilizando o sistema GC-MS/MS nas condições descritas no item 3.5. As soluções analíticas para o preparo da curva e fortificações foram realizadas em solvente (acetonitrila) e na matriz (extrato branco). A partir disso, pode-se avaliar os parâmetros de validação do método analítico para os 74 compostos em estudo, com base na RDC 166/2017 (BRASIL, 2017).

4.3.1 Seletividade

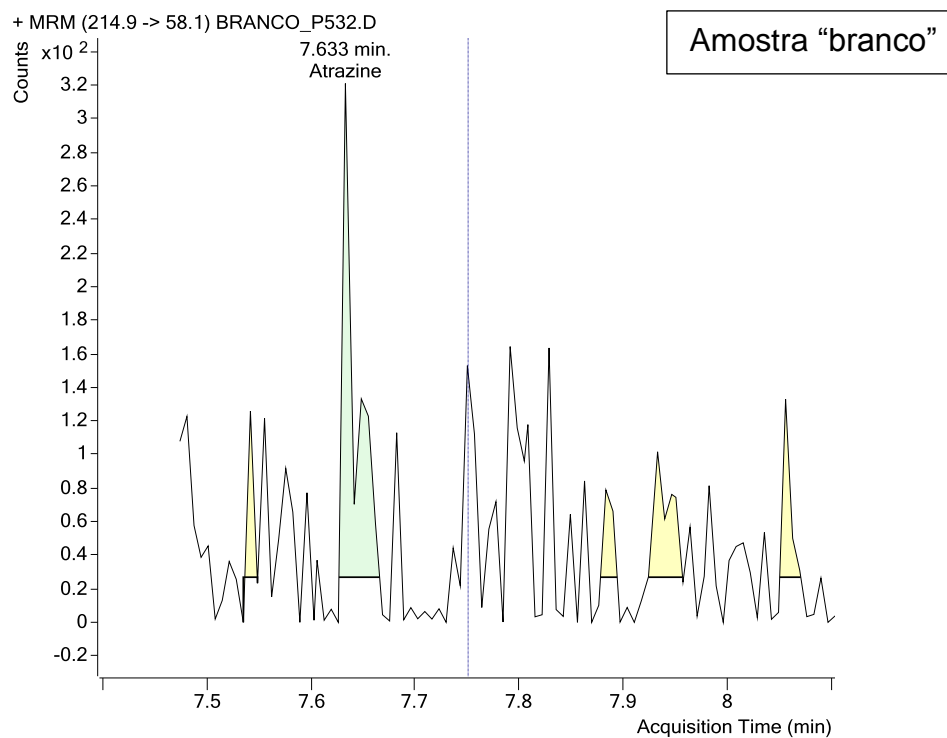
Para este parâmetro descrito no artigo 19 da RDC 166/2017 (BRASIL, 2017), analisou-se os extratos “branco” de *Ginkgo biloba* L. quanto à presença de sinal analítico dos compostos em estudo. O extrato “branco” desta amostra não apresentou resposta cromatográfica para os agrotóxicos em estudo. Exemplo disso é o composto atrazina, conforme a Figura 10, em que o cromatograma do extrato da amostra *Ginkgo biloba* L. não apresentou sinal analítico para este analito em comparação à amostra fortificada no nível de 50 µg L⁻¹. Apesar da matriz apresentar uma complexidade de constituintes, esta avaliação foi assegurada com base nos tempos de retenção dos compostos analisados, como também, a partir dos íons de quantificação e identificação selecionados. Sendo assim, os extratos “branco” de *Ginkgo biloba* L. foram utilizados para a construção da curva analítica e para os ensaios de fortificação.

4.3.2 Linearidade

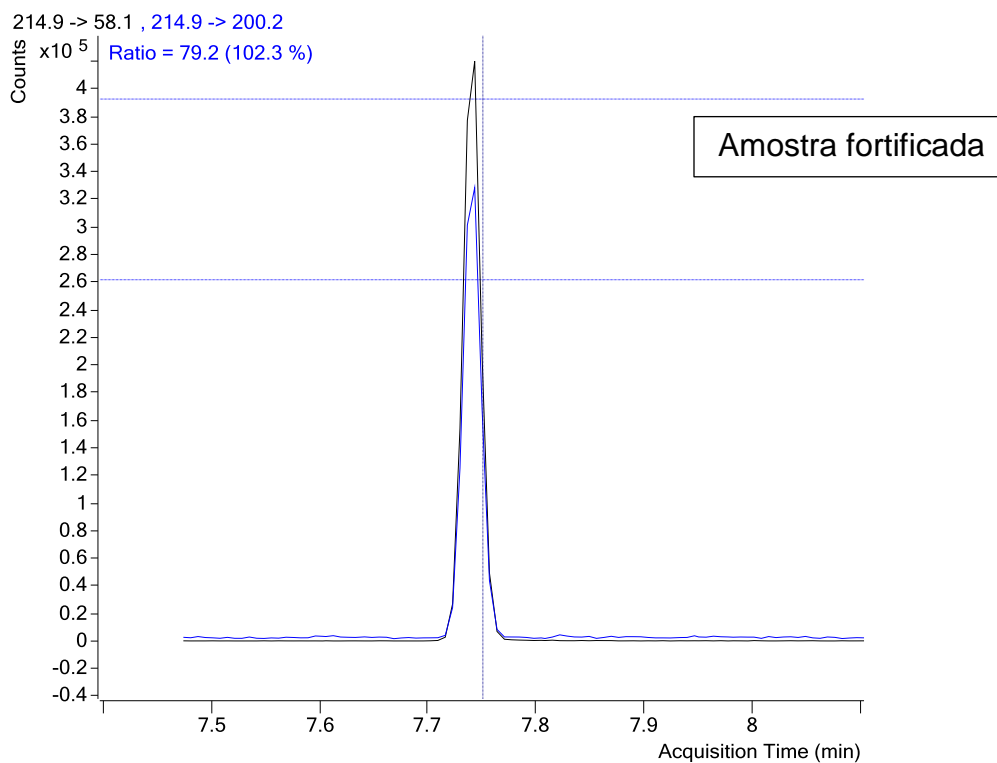
Em relação à linearidade do método proposto, avaliou-se este parâmetro pela aplicação da regressão linear dos pontos da curva analítica e a obtenção do coeficiente de determinação (r^2). Foram realizados 7 pontos em diferentes concentrações, n=3, obtendo-se uma faixa linear de 0,5 a 50 µg L⁻¹, com $r^2 \geq 0,99$ para a maioria dos compostos (Tabela 10), exceto para buprofezina, DDT p,p', indoxacarbe, metiocarbe, piraclostrobina que obtiveram $r^2 < 0,990$.

Figura 10 - Cromatogramas obtidos por GC-MS/MS, modo SRM, para o composto atrazina em A) amostra branco e B) ponto da curva no nível de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ no extrato branco da amostra *Ginkgo biloba* L.

A)



.B)



4.3.3 Efeito matriz

A avaliação do efeito matriz (EM) é necessária em estudos de amostras complexas, como as plantas medicinais. Esta avaliação foi realizada a partir da comparação das inclinações das curvas de calibração obtidas no solvente e no extrato da matriz (ginkgo) para os compostos em estudo. Os valores obtidos de EM estão representados na Figura 11. Em análises cromatográficas por GC, coextrativos da matriz podem aumentar a resposta cromatográfica, resultando em uma quantificação inapropriada dos compostos (RUTKOWSKA, ŁOZOWICKA. e KACZYŃSKI, 2018).

Conforme a Figura 11 nota-se que para a maioria dos compostos em estudo ocorreu aumento de sinal. Este aumento de sinal, para a maioria dos compostos, foi observado nos trabalhos de Lee e colaboradores (2017), Páleníková e colaboradores (2015). No presente estudo, somente o composto diclorana apresentou supressão de sinal. A supressão de sinal é menos comum em cromatografia gasosa, em relação à cromatografia líquida (RUTKOWSKA, ŁOZOWICKA. e KACZYŃSKI, 2018).

Devido à variação de comportamento de cada composto, adotou-se a calibração da curva na matriz para a execução da validação e ampliação de escopo, com a finalidade de obter resultados mais exatos (SLOWIK-BOROWIEC, 2015).

4.3.4 Exatidão, Precisão e Precisão Intermediária

A exatidão e precisão do método foram avaliadas em termos de recuperação e RSD dos compostos nos níveis de 5, 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=6) e estão representados na Tabela 10. Para a aceitação do método, as recuperações devem apresentar valores de 70 a 120% e RSD \leq 20%. Pode-se observar que com o aumento do nível de fortificação, aumentou o número de compostos com recuperações e RSD dentro da faixa aceitável (Tabela 10 e Figura 12).

Figura 11 - Efeito matriz dos resíduos de agrotóxicos avaliados no sistema GC-MS/MS, a partir de soluções preparadas em acetonitrila e na matriz *Ginkgo biloba L.*

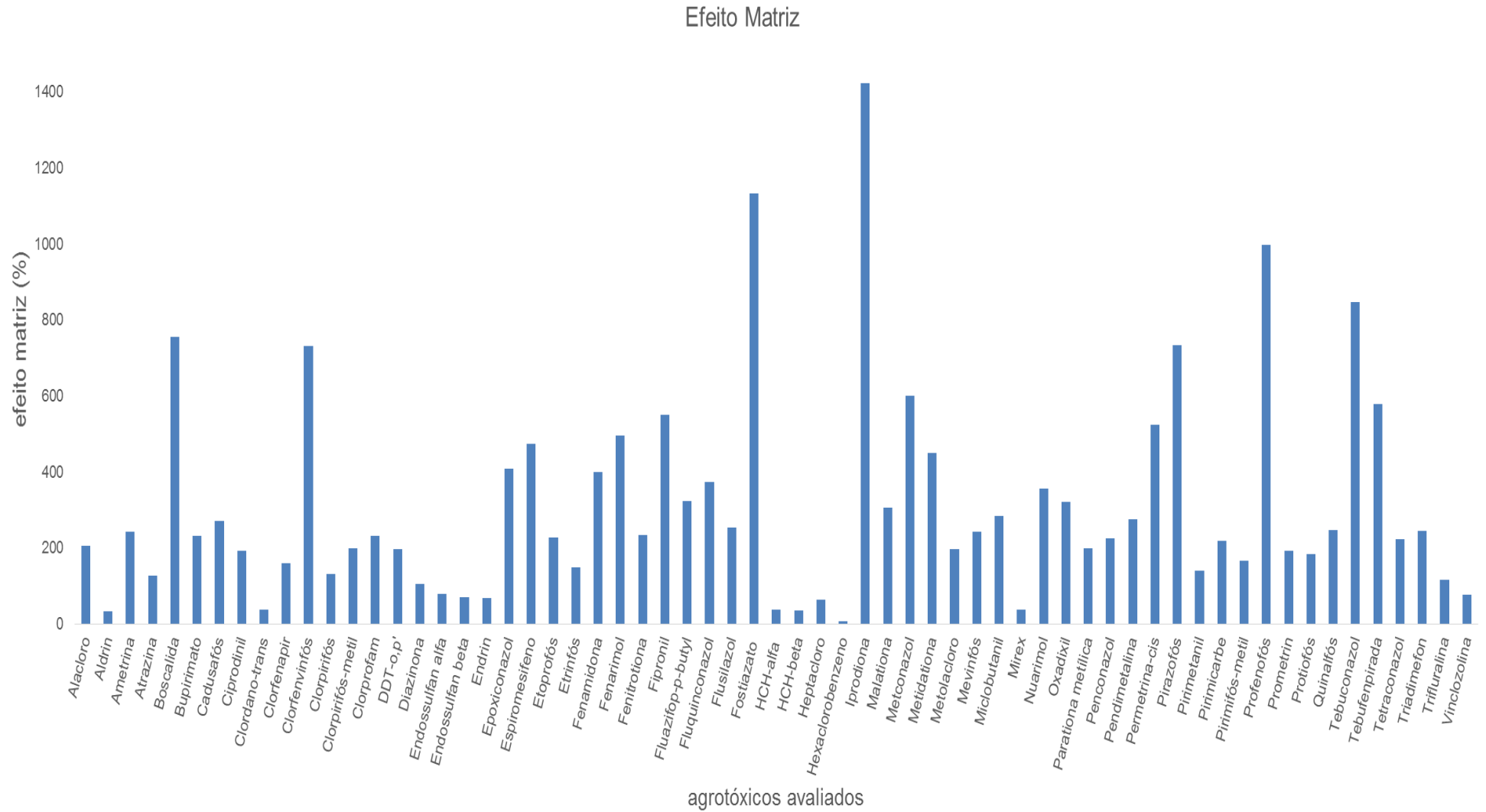
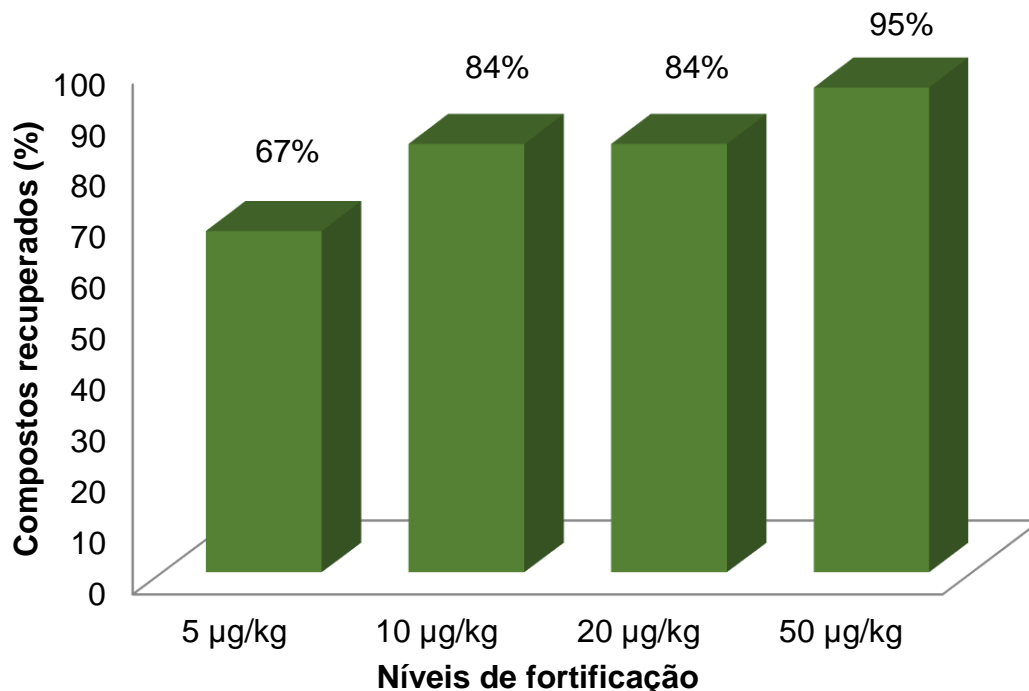


Figura 12 - Percentagem de compostos com recuperações e RSD dentro da faixa de 70 a 120% e $\leq 20\%$, respectivamente, para os níveis de fortificação 5, 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=6) na etapa de validação.



Alguns compostos foram excluídos na etapa de validação, como é o caso dos compostos buprofezina, DDT p,p', diclorana, dissulfotom, HCH gama (lindano), indoxacarbe, metiocarbe, metoxicloro, piraclostrobina, tolifluanida e trifloxistrobina, em razão de não terem atendido os critérios de aceitação para recuperação (70 a 120%) e RSD ($\leq 20\%$). O composto dissulfotom apresentou valores de recuperação $< 70\%$ e valores de RSD entre 7 a 19%. Devido aos valores aceitáveis de RSD, este composto pode ser analisado qualitativamente pelo método proposto (TAHA, 2016). O composto metiocarbe apresentou valores de recuperação satisfatórios (70 a 89%), os valores de RSD ficaram entre 11 a 70% e, portanto, não foi considerado para a validação pelo método. HCH gama (lindano), buprofezina, DDT p,p', indoxacarbe, piraclostrobina e tolifluanida não foram incluídos no escopo do método devido aos resultados insatisfatórios de recuperação e RSD nos níveis avaliados. Recuperações fora da faixa aceitável para o composto HCH gama (lindano) também foi observado no trabalho de Tong e colaboradores (2014). Os resultados obtidos para o composto tolifluanida (valores de RSD com variação de 26 a 245% para todos os níveis de fortificação e valor de recuperação $< 70\%$ no nível mais baixo de fortificação) podem estar relacionados com o pH do extrato após a realização da etapa de limpeza com

PSA. Este composto apresenta estabilidade em pH ácido e, se ocorrer a acidificação da ACN, a atividade do sorvente pode diminuir para os demais compostos (WONG et al., 2010). Resultados de RSD insatisfatórios para o DDT p,p' pode ser explicado pela atuação do efeito matriz. No trabalho de Huo e colaboradores. (2016), observaram recuperações > 120% deste composto, como também o efeito matriz foi positivo, provocando interferências nos percentuais de recuperações. O composto piraclostrobina foi excluído do método devido à grande variação nos valores de recuperação para todos os níveis de fortificação, como também nos valores de RSD. Isto pode ser explicado devido à interferência da matriz durante a análise cromatográfica para este composto (CHEN et al., 2016). Os resultados obtidos para os compostos buprofezina e indoxacarbe também podem ser explicados devido à atuação de efeito matriz (CHO et al., 2016; ASENSIO-RAMOS et al., 2010).

Nos níveis de fortificação de 5 e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foi observado que os compostos clordano-trans, clorprofam, clorpirifós, endrin, fenamidona, HCH beta, penconazol, permetrina cis, pirazofós, protiofós e pirimetanil (Tabela 10), apresentaram valores de recuperação ou de RSD ou ambos, fora da faixa aceitável. Nestes níveis, a dificuldade em obter recuperações razoáveis é maior em virtude destes compostos serem altamente polares ($\log K_{ow} < 6$) (TAHA, 2016). Porém, todos estes compostos apresentaram boa linearidade ($r^2 > 0,990$), como também apresentaram resultados de recuperação e RSD adequados nos níveis de fortificação 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Dessa forma, todos estes compostos foram validados e avaliados na etapa de precisão intermediária.

Na avaliação da precisão intermediária, os compostos clorpirifós, DDT o,p', endrin, heptacloro e mirex apresentaram resultados fora da faixa satisfatória de recuperação (70 a 120%) e RSD ($\leq 20\%$) somente no nível de fortificação (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (Tabela 10). Para o composto clorpirifós, este comportamento foi similar na etapa de precisão. Os compostos DDT o,p' e endrin apresentaram considerável efeito matriz (197% e 68%, respectivamente) (Figura 11) e portanto, na etapa de precisão intermediária, sua resposta cromatográfica pode ter sido afetada, como foi observado no trabalho de Łozowicka, Rutkowska e Jankowska (2017). Além disso, no trabalho de Taha e Gadalla (2017) obteve-se percentuais de recuperação entre 60-70% para DDT o,p', com valor aceitável de RSD ($\leq 20\%$). Heptacloro apresentou valor de recuperação de 191%, porém com valor de RSD dentro da faixa satisfatória (6%),

demonstrando que as condições laboratoriais de repetitividade e reprodutibilidade estão adequadas (MAESTRONI et al., 2018). No estudo de Nie e colaboradores (2015), os autores também observaram recuperações < 80% para o composto mirex, assim como neste estudo.

4.3.5 Limite de Quantificação e de Detecção

A variação para o LOQ foi de 5 a 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto que o LOD variou de 1,5 a 6 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O método apresentou valores de LOD de 1,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e LOQ 5,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a maioria dos compostos analisados, exceto para clordano-trans, clorprofam, etrinfós, fenamidona, HCH beta, permetrina-cis, pirazofós, protiofós que apresentaram LOD de 3,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e LOQ de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabela 10). Além disso, os compostos clorpirifós etílico, DDT-o,p, heptacloro, mirex, penconazol apresentaram LOD de 6,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e LOQ de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Estes valores estão abaixo dos LMRs de alguns compostos definidos pela Farmacopeia Europeia, a qual apresenta valores que variam de 20 a 4000 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Dessa forma, mostra que o método proposto apresenta boa aplicabilidade em rotinas laboratoriais, como também demonstra a habilidade de realizar determinações a níveis traço.

4.3.6. Robustez

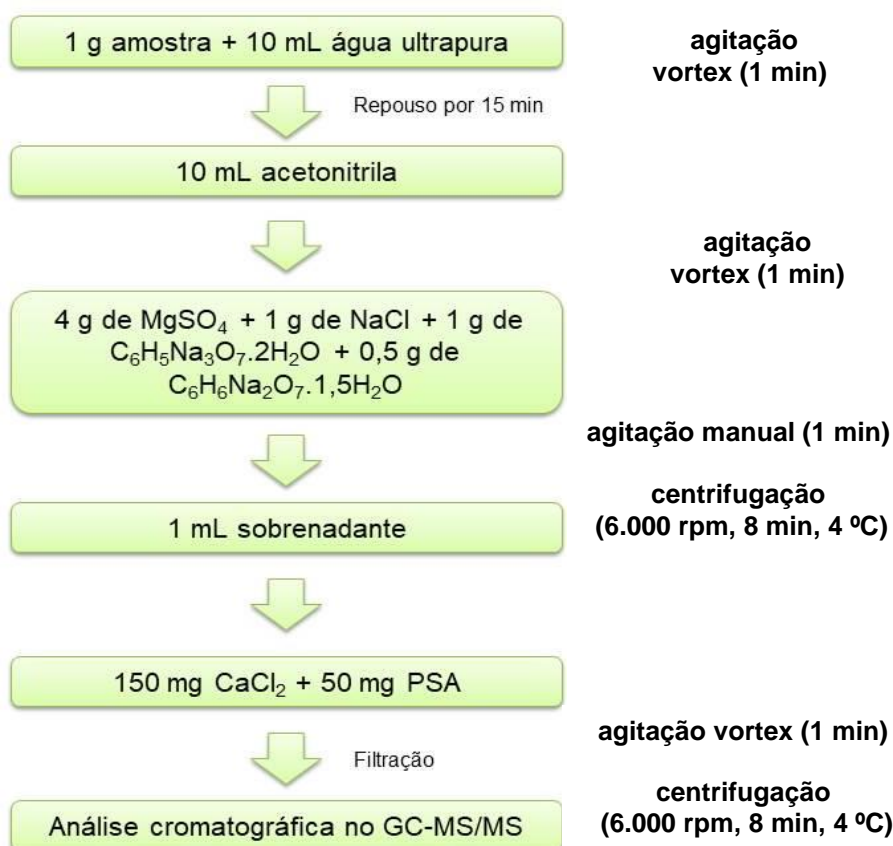
Para a avaliação da robustez, algumas mudanças foram realizadas no decorrer do processo de extração, conforme descrito no item 4.3.7. Para avaliação das recuperações e RSD, foi realizada uma etapa de fortificação no extrato “branco” de *Ginkgo biloba* L. no nível de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=3). Os resultados estão descritos na Tabela 10.

Somente os compostos endrin e quinalfós apresentaram valores de recuperação < 70% (24 e 28%, respectivamente) e valores de RSD fora da faixa satisfatória (55 e 16%, respectivamente), porém com boa linearidade ($r^2 \geq 0,990$). Além disso, nas etapas de precisão, exatidão e precisão intermediária, no nível de fortificação de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, estes compostos apresentaram resultados aceitáveis de recuperação e RSD. Os compostos restantes, todos apresentaram bons resultados de linearidade, exatidão e precisão.

4.3.7 Método QuEChERS citrato modificado validado neste trabalho

O método de extração validado neste trabalho está descrito na Figura 13. A metodologia consiste em pesar 1 g de amostra em um tubo de polipropileno de 50 mL e adicionar 10 mL de água ultrapura para hidratar a amostra. O tubo é agitado em vórtex por 1 min e após 15 min, adiciona-se 10 mL de acetonitrila (ACN). O tubo é agitado vigorosamente em vórtex durante 1 min. Adiciona-se 4 g de sulfato de magnésio anidro (MgSO_4), 1 g de cloreto de sódio (NaCl), 1 g de citrato de sódio diidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 0,5 g de hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado ($\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$). O tubo é agitado manualmente durante 1 min e depois centrifuga-se a 6000 rpm (8 min/ 4°C) a fim de obter a separação das fases orgânica e aquosa. Transfere-se 1 mL do sobrenadante, o qual é colocado em um tubo de eppendorf contendo 150 mg CaCl_2 e 50 mg PSA. O tubo é centrifugado a 10000 rpm (8 min, 4°C) e, após, o extrato é filtrado com filtro de nylon (0,2 μm). Após a filtração, adiciona-se o PI (20 $\mu\text{g L}^{-1}$) antes da injeção no sistema GC-MS/MS.

Figura 13 - Fluxograma do método QuEChERS citrato utilizado neste estudo.



Com base nos parâmetros de validação de métodos analíticos descritos na RDC 166/2017, dos 74 compostos inicialmente propostos neste trabalho, 63 agrotóxicos foram validados para a amostra *Ginkgo biloba* L. A partir disso, foi sugerido uma extensão do método validado para outras plantas medicinais (*Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa), *Mikania glomerata* Spreng. (guaco) e *Matricaria chamomilla* (camomila)).

Tabela 10 - Resultados obtidos na etapa de validação do método QuEChERS para os parâmetros de validação exatidão, precisão, precisão intermediária e robustez.

Compostos	r ²	LOQ	LOD	Validação					Precisão Intermediária			Robustez
				R e RSD (%)								
				µg kg ⁻¹	5 µg kg ⁻¹	10 µg kg ⁻¹	20 µg kg ⁻¹	50 µg kg ⁻¹	10 µg kg ⁻¹	20 µg kg ⁻¹	50 µg kg ⁻¹	20 µg kg ⁻¹
Alacloro	0,991	5	1,5	74 (12)	78 (9)	77 (12)	95 (7)	81 (18)	86 (7)	105 (6)	90 (5)	
Aldrin	0,991	5	1,5	76 (16)	79 (17)	72 (16)	76 (13)	77 (17)	83 (7)	87 (7)	78 (7)	
Ametrina	0,993	5	1,5	77 (14)	79 (9)	78 (13)	86 (3)	86 (11)	94 (9)	96 (5)	87 (3)	
Atrazina	0,992	5	1,5	81 (8)	84 (5)	81 (13)	91 (7)	84 (13)	94 (7)	96 (4)	89 (4)	
Boscalida	0,995	5	1,5	107 (11)	98 (11)	83 (13)	91 (4)	71 (8)	92 (12)	86 (15)	92 (11)	
Bupirimato	0,995	5	1,5	85 (9)	82 (7)	81 (12)	90 (6)	93 (9)	96 (6)	98 (4)	89 (4)	
Cadusafós	0,996	5	1,5	96 (7)	90 (8)	83 (12)	88 (13)	104 (10)	102 (3)	97 (7)	93 (5)	
Ciprodinil	0,991	5	1,5	74 (6)	75 (5)	72 (11)	81 (9)	81 (10)	86 (9)	89 (5)	81 (6)	
Clordano-trans	0,991	10	3,0	67 (22)	71 (2)	78 (8)	91 (13)	80 (19)	83 (10)	90 (5)	77 (16)	
Clorfenapir	0,991	5	1,5	90 (16)	79 (17)	75 (13)	92 (14)	87 (19)	109 (10)	94 (12)	94 (10)	
Clorfenvinfós	0,998	5	1,5	91 (10)	91 (4)	89 (10)	104 (13)	105 (19)	103 (10)	100 (7)	96 (3)	
Clorpirifós	0,992	20	6,1	85 (29)	67 (17)	84 (19)	88 (10)	60 (22)	77 (12)	84 (4)	82 (15)	
Clorpirifós-metil	0,995	5	1,5	88 (9)	87 (6)	83 (10)	88 (9)	100 (6)	102 (4)	99 (5)	96 (4)	
Clorprofam	0,994	10	3,0	43 (31)	95 (4)	82 (16)	92 (13)	100 (15)	104 (5)	101 (7)	95 (6)	
DDT-o,p'	0,992	20	6,1	87 (15)	71 (15)	72 (11)	75 (18)	52 (11)	70 (10)	72 (15)	87 (14)	
Diazinona	0,994	5	1,5	79 (8)	84 (7)	81 (11)	89 (10)	100 (9)	96 (4)	89 (6)	89 (6)	
Endossulfan alfa	0,994	5	1,5	87(9)	105 (12)	89 (19)	92 (10)	103 (5)	90 (19)	94 (12)	70 (2)	
Endossulfan beta	0,991	5	1,5	83 (16)	87 (7)	83 (16)	90 (4)	71 (12)	85 (12)	94 (6)	84 (5)	
Endrin	0,992	20	6,1	114 (34)	91 (15)	100 (12)	85 (12)	105 (36)	95 (17)	87 (12)	24 (55)	
Epoxiconazol	0,998	5	1,5	92 (10)	88 (4)	80 (9)	97 (19)	77 (9)	90 (8)	92 (4)	93 (6)	
Espiromesifeno	0,997	5	1,5	88 (16)	81 (5)	78 (9)	92 (13)	81 (7)	93 (11)	94 (5)	88 (5)	
Etoprofós	0,996	5	1,5	100 (7)	98 (5)	87 (13)	92 (14)	110 (6)	110 (3)	102 (6)	95 (3)	
Etrinfós	0,993	10	3,0	102 (11)	85 (11)	77 (9)	93 (11)	101 (18)	109 (10)	99 (8)	87 (16)	
Fenamidona	0,994	10	3,0	64 (16)	72 (11)	80 (13)	93 (15)	97 (14)	101 (5)	100 (2)	83 (3)	

Compostos	r ²	LOQ	LOD	Validação				Precisão Intermediária			Robustez
				R e RSD (%)							
				µg kg ⁻¹	5 µg kg ⁻¹	10 µg kg ⁻¹	20 µg kg ⁻¹	50 µg kg ⁻¹	10 µg kg ⁻¹	20 µg kg ⁻¹	
Fenarimol	0,998	5	1,5	101 (10)	95 (5)	83 (10)	100 (14)	70 (3)	85 (8)	90 (8)	94 (5)
Fenitrotiona	0,996	5	1,5	83 (9)	84 (5)	82 (11)	90 (3)	110 (9)	103 (3)	100 (4)	92(2)
Fipronil	0,996	5	1,5	107 (12)	101 (9)	88 (8)	98 (4)	80 (12)	99 (9)	95 (6)	96 (8)
Fluazifop-p-butyl	0,997	5	1,5	97 (7)	92 (5)	86 (13)	97 (12)	83 (9)	95 (9)	97 (5)	94 (2)
Fluquinconazol	0,996	5	1,5	96 (7)	93 (5)	82 (13)	98 (19)	76 (9)	87 (6)	91 (8)	82 (8)
Flusilazol	0,996	5	1,5	88 (10)	87 (2)	85 (12)	98 (18)	89 (11)	92 (6)	100 (2)	85(5)
Fostiazato	0,993	5	1,5	101 (13)	80 (14)	70 (5)	81 (20)	93 (19)	97 (14)	99 (18)	112 (7)
HCH-alfa	0,993	5	1,5	85 (7)	79 (5)	77 (12)	83 (13)	120 (7)	109 (7)	94 (8)	86 (7)
HCH-beta	0,992	10	3,0	54 (18)	74 (7)	77 (15)	88 (6)	88 (11)	89 (5)	89 (6)	82 (7)
Heptacloro	0,992	20	6,1	81 (10)	80 (12)	71(14)	78 (17)	191 (6)	120 (11)	101(10)	82 (14)
Hexaclorobenzeno	0,990	5	1,5	71 (13)	71 (12)	70 (8)	70 (19)	78 (14)	79 (10)	79 (12)	70 (6)
Iprodiona	0,992	5	1,5	92 (20)	82 (6)	74 (17)	89 (19)	70 (5)	79 (14)	92 (15)	94 (15)
Malationa	0,995	5	1,5	72 (19)	83 (14)	84 (9)	96 (6)	98 (15)	108 (11)	102 (5)	103 (8)
Metconazol	0,997	5	1,5	87 (19)	84 (9)	84 (10)	97 (19)	72 (12)	82 (8)	88 (5)	79 (9)
Metidationa	0,995	5	1,5	84(14)	87 (5)	84 (8)	96 (9)	100 (7)	101 (4)	100 (4)	89 (5)
Metolacoloro	0,994	5	1,5	90 (18)	88 (19)	92 (12)	99 (6)	101 (8)	95 (5)	98 (4)	86 (7)
Mevinfós	0,996	5	1,5	109 (14)	90 (14)	72 (14)	83 (16)	82 (16)	99 (13)	90 (19)	89 (20)
Miclobutanil	0,994	5	1,5	89 (12)	87 (3)	84 (13)	96 (17)	74 (9)	84 (4)	95 (3)	70 (5)
Mirex	0,996	20	6,1	76 (5)	73 (6)	70 (10)	72 (6)	61 (8)	71 (13)	75 (7)	83 (6)
Nuarimol	0,998	5	1,5	89 (15)	91 (6)	86 (12)	96 (17)	81 (12)	86 (3)	94 (3)	86 (5)
Oxadixil	0,997	5	1,5	89 (7)	87 (6)	83 (13)	89 (3)	71 (13)	83 (5)	93 (3)	83 (6)
Parationa metílica	0,995	5	1,5	88 (9)	87 (6)	83 (10)	88 (9)	100 (6)	102 (4)	99 (5)	96 (4)
Penconazol	0,994	20	6,1	107 (18)	94 (30)	70 (5)	101 (14)	89(16)	88 (3)	94 (4)	99 (15)
Pendimetalina	0,996	5	1,5	83 (14)	78 (10)	77 (13)	89 (8)	98 (5)	100 (10)	96 (6)	97 (7)
Permetrina-cis	0,993	10	3,0	120 (44)	90 (14)	90 (13)	82 (11)	74 (19)	82 (14)	79 (7)	84 (19)
Pirazofós	0,996	10	3,0	254 (88)	108 (13)	91 (8)	101 (13)	95 (18)	95 (8)	96 (13)	80 (3)
Pirimetaniil	0,990	5	1,5	80 (15)	94 (17)	89 (21)	91 (11)	77 (20)	80 (7)	88 (8)	82 (8)

Compostos	r ²	LOQ	LOD	Validação					Precisão Intermediária			Robustez
				R e RSD (%)								
				µg kg ⁻¹	5 µg kg ⁻¹	10 µg kg ⁻¹	20 µg kg ⁻¹	50 µg kg ⁻¹	10 µg kg ⁻¹	20 µg kg ⁻¹	50 µg kg ⁻¹	
Pirimicarbe	0,994	5	1,5	77 (8)	84 (5)	81 (11)	84 (8)	95 (7)	96 (2)	97 (4)	84(4)	
Pirimifós-metil	0,995	5	1,5	87 (11)	86 (4)	88 (15)	93 (4)	93 (7)	97 (6)	96 (4)	90 (3)	
Profenofós	0,995	5	1,5	85 (17)	78 (8)	75 (5)	94 (9)	110 (15)	101 (10)	99 (11)	93 (12)	
Prometrin	0,993	5	1,5	73 (13)	82 (11)	80 (15)	87 (4)	90 (9)	92 (3)	95 (4)	86 (5)	
Protiofós	0,994	10	3,0	114 (42)	105 (19)	87 (10)	96 (9)	79 (2)	89 (20)	91 (8)	88 (13)	
Quinalfós	0,990	5	1,5	106 (13)	94 (12)	96 (11)	93 (10)	110 (17)	95 (9)	99 (6)	28 (16)	
Tebuconazol	0,998	5	1,5	82 (18)	76 (19)	75 (19)	97 (16)	102 (13)	102 (4)	97 (5)	106 (11)	
Tebufenpirada	0,994	5	1,5	82 (8)	86 (3)	84 (12)	94 (15)	72 (12)	85 (4)	96 (2)	84 (6)	
Tetraconazol	0,996	5	1,5	93 (12)	92 (8)	85 (11)	102 (19)	74 (11)	91 (12)	93 (6)	90 (5)	
Triadimefon	0,994	5	1,5	84 (8)	85 (6)	86 (9)	99 (11)	102 (10)	97 (4)	99 (6)	93 (5)	
Trifluralina	0,994	5	1,5	93 (11)	91 (8)	80 (11)	88 (16)	120 (8)	112 (4)	98 (9)	93 (5)	
Vinclozolina	0,991	5	1,5	77 (10)	82 (4)	87 (15)	91 (4)	94 (10)	95 (4)	98 (4)	84 (6)	

4.4 EXTENSÃO DO ESCOPO VALIDADO PARA OUTRAS PLANTAS MEDICINAIS

A fim de verificar a aplicabilidade do método validado para outras amostras de plantas medicinais (*Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa), *Mikania glomerata* Spreng. (guaco) e *Matricaria chamomilla* (camomila)), avaliou-se a possibilidade de uma extensão do escopo (SANTE, 2017). Para todas as matrizes, construiu-se uma curva analítica com 7 concentrações de 0,5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ no solvente (acetonitrila) e no extrato “branco” da matriz. Para a avaliação da exatidão, foi realizada etapa de fortificação no nível de fortificação de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Este nível foi escolhido com base no menor valor de LMR contido na Farmacopeia Europeia. Também, foram avaliados linearidade, precisão e efeito matriz. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 11. A extensão de escopo para outras matrizes também foi realizada no trabalho de Taha e Gadalla (2017). Usou-se camomila para o processo de validação e o método proposto foi aplicado em tomilho e manjerona.

Foram considerados validados 39 compostos para camomila, 57 compostos para espinheira-santa e 48 compostos para o guaco. Apesar da complexidade de constituintes em que cada amostra estudada apresenta, foi possível validar para cada uma das amostras, um número considerável de agrotóxicos. Dessa forma, pode-se afirmar que o método validado para *Ginkgo biloba* L. teve boa aplicabilidade para as demais matrizes.

Tabela 11 - Resultados obtidos na extensão do escopo do método QuEChERS para as demais plantas medicinais em estudo, com respectivas recuperações (Rec), RSD, coeficiente de determinação (r^2) e efeito matriz (EM).

Compostos	Camomila			Espinheira-santa			Guaco		
	Nível de fortificação 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=3)								
	r^2	Rec e RSD (%)	EM (%)	r^2	Rec e RSD (%)	EM (%)	r^2	Rec e RSD (%)	EM (%)
Alacloro	-	-	-	0,999	85,23 (14)	180	0,999	75,49 (9)	291
Aldrin	0,997	75 (16)	69	0,994	79,80 (14)	38	-	-	-
Ametrina	0,996	56 (10)	257	0,999	106,29 (8)	207	1,000	81,42 (5)	358
Atrazina	0,999	73 (3)	183	0,997	98,01 (8)	116	1,000	86,55 (5)	184
Boscalida	0,999	97 (15)	76	0,991	86,81 (18)	47	0,996	108,36 (5)	56
Bupirinato	0,998	95 (2)	31	0,998	108,78 (7)	43	0,998	92,26 (4)	47
Cadusafós	-	-	-	0,995	95,92 (7)	566	-	-	-
Clorfenapir	0,999	88(4)	438	0,998	111,39 (6)	233	0,999	84,10 (7)	324
Clorpirifós	-	-	-	0,998	96,32 (9)	88	0,998	74,83 (8)	301
Clorpirifós-metil	0,992	86(40)	481	0,996	94,50 (7)	275	0,999	86,14 (6)	281
Ciprodinil	-	-	-	0,999	96,02 (10)	51	-	-	-
Clordano-trans	-	-	-	0,995	100,56 (14)	153	0,997	76,20 (5)	258
Clorfenvinfós	0,998	98 (13)	956	0,996	96,20 (12)	523	0,999	106,85 (11)	997
Clorprofam	0,999	100 (12)	69	0,995	95,25 (9)	13	-	-	-
DDT-o,p'									
Diazinona	0,999	94 (13)	179	0,996	95 (7)	144	0,999	79 (8)	285
Endossulfan alfa	-	-	-	0,995	104 (10)	121	-	-	-
Endossulfan beta	0,996	91 (14)	147	0,997	102 (12)	134	0,999	85 (5)	180
Endrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epoxiconazol	1,000	100 (8)	119	0,995	94 (7)	78	0,999	94 (6)	127
Espiromesifeno	0,999	86 (4)	108	0,994	86 (3)	92	0,998	98 (13)	171
Etoprofós	0,999	101 (12)	71	0,993	94 (7)	89	0,996	91 (7)	143
Etrinós	0,999	72 (6)	725	0,998	93(18)	337	0,998	74 (6)	539

Compostos	Camomila			Espinheira-santa			Guaco		
	Nível de fortificação 20 µg kg ⁻¹ (n=3)								
	r ²	Rec e RSD (%)	EM (%)	r ²	Rec e RSD (%)	EM (%)	r ²	Rec e RSD (%)	EM (%)
Fenamidona	0,997	96 (3)	384	0,997	89 (10)	223	0,998	95 (13)	307
Fenarimol	1,000	103 (11)	216	-	-	-	0,998	117 (4)	184
Fenitrotiona	-	-	-	0,998	98 (8)	303	-	-	-
Fipronil	0,999	107(12)	918	0,995	108 (10)	407	0,996	115 (1)	666
Fluazifop-p-butil	0,993	102 (7)	227	0,998	102 (4)	170	0,999	98 (9)	358
Fluquinconazol	1,000	91 (17)	1195	0,996	89 (10)	467	0,997	101 (6)	668
Flusilazol	0,999	102 (6)	524	0,998	101 (7)	271	0,998	91 (7)	459
Fosthiazate	-	-	-	-	-	-	0,994	113 (9)	409
HCH alfa	-	-	-	0,991	93 (12)	909	0,994	75 (1)	1332
HCH beta	-	-	-	0,995	95 (12)	601	0,996	71 (6)	872
Heptacloro	-	-	-	0,995	78 (9)	18	1,000	74 (20)	18
Hexaclorobenzeno	-	-	-	0,990	74 (4)	380	-	-	-
Iprodiona	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malationa	-	-	-	0,998	92 (5)	410	-	-	-
Metconazol	1,000	94 (9)	450	0,997	101 (12)	339	0,997	105 (7)	497
Metidationa	0,998	105 (6)	476	0,997	100 (7)	451	0,999	95 (6)	419
Metolacloro	-	-	-	0,998	103 (7)	231	0,995	78 (34)	256
Mevinfós	0,995	97 (15)	348	-	-	-	0,992	79 (10)	256
Miclobutanil	0,999	97 (8)	506	0,998	108 (7)	236	0,999	88 (5)	342
Mirex	-	-	-	0,997	76 (9)	313	-	-	-
Nuarimol	0,999	107 (14)	488	0,997	109 (4)	210	0,999	104 (6)	476
Oxadixil	0,999	98 (11)	226	0,997	103 (3)	148	-	-	-
Parationa metílica	-	-	-	0,996	94 (7)	194	0,999	86 (6)	363
Penconazol	0,997	114 (3)	256	0,998	104 (3)	183	0,999	89 (9)	304
Pendimetalina	0,998	75 (12)	125	0,998	107 (3)	308	0,999	96 (9)	588
Permetrina-cis	-	-	-	0,995	103 (12)	200	-	-	-

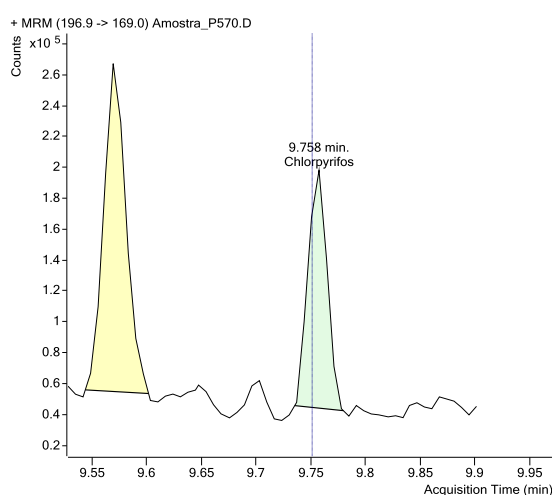
Compostos	Camomila			Espinheira-santa			Guaco		
	Nível de fortificação 20 µg kg ⁻¹ (n=3)								
	r ²	Rec e RSD (%)	EM (%)	r ²	Rec e RSD (%)	EM (%)	r ²	Rec e RSD (%)	EM (%)
Pirazofós	0,999	109 (1)	1127	0,993	91 (16)	704	0,994	101 (8)	1028
Pirimethanil	0,999	80 (17)	14897	0,997	96 (7)	163	0,999	75 (10)	312
Pirimicarbe	-	-	-	0,996	99 (8)	170	0,999	79 (7)	269
Pirimifós metil	0,994	78 (6)	90	0,998	99 (10)	2343	1,000	78 (5)	1570
Profenofós	0,997	107 (18)	1290	0,996	84 (12)	532	0,997	102 (12)	727
Prometrina	-	-	-	0,998	104 (8)	136	0,999	82 (4)	226
Protiofós	-	-	-	0,999	104 (11)	199	0,999	81 (1)	349
Quinalfós	-	-	--	0,999	112 (4)	395	-	-	-
Tebuconazol	0,999	105 (6)	775	0,997	100 (4)	299	0,999	91 (13)	559
Tebufenpirada	0,997	97 (1)	950	0,999	97 (9)	395	0,999	98 (10)	641
Tetraconazol	0,997	96 (2)	365	0,999	100 (5)	181	1,000	88 (7)	329
Triadimefon	0,991	79 (5)	236	0,998	110 (6)	203	0,999	91 (8)	373
Trifluralina	0,996	83 (9)	6	0,994	101 (8)	92	0,997	87 (5)	117
Vinclozolina	0,998	78(5)	21	0,997	93 (10)	66	1,000	72 (1)	127

4.5 ANÁLISE EM AMOSTRAS REAIS

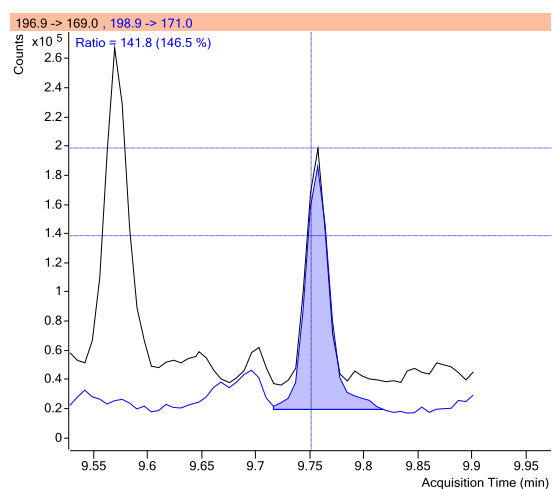
A análise em amostras reais foi realizada com adição de padrão de controle (atrazina deuterada) na concentração de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$. Foram analisadas 11 amostras no total (4 amostras de guaco, 2 amostras de espinheira-santa, 3 amostras de ginkgo e 2 amostras de camomila), coletadas em diferentes lojas de produtos naturais na cidade de Santa Maria, RS. Foi encontrado o composto (clorpirifós) em uma amostra real de guaco, com concentração abaixo do LMR determinado pela Farmacopeia Europeia ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$). O composto está representado na Figura 14. Nas demais amostras não foram encontrados resíduos de agrotóxicos em estudo.

Figura 14 - Composto A) clorpirifós obtido por GC-MS/MS em amostra real de guaco, com seu B) pico de confirmação e identificação.

A)



B)



5 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou o uso de diferentes sorventes na etapa de limpeza do método QuEChERS para a remoção de coextrativos, presentes em extratos de amostras de plantas medicinais. O sorvente PSA (amina primária e secundária), juntamente com cloreto de cálcio, apresentaram excelente eficiência na limpeza dos extratos, com redução satisfatória dos teores de co-extrativos sem perdas significativas de analitos, tendo em vista que a obtenção de extratos limpos é fundamental para o alcance de resultados confiáveis e para a preservação do sistema cromatográfico.

Para isto, foram realizados diversos testes com diferentes proporções e combinações de sorventes empregando metodologias distintas para o preparo das amostras e avaliação dos extratos através de técnicas auxiliares, como testes gravimétricos e avaliação da eficiência de extração, para fins de otimização do método desenvolvido e posterior validação do mesmo empregando GC-MS/MS para a determinação dos agrotóxicos selecionados. As técnicas complementares utilizadas se mostraram adequadas para o monitoramento de testes no desenvolvimento de novas metodologias analíticas.

O método QuEChERS citrato associado à limpeza do extrato por d-SPE demonstrou ser eficiente para a extração e determinação de resíduos de 63 agrotóxicos em amostras de ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.) por GC-MS/MS. Os resultados de recuperação obtidos foram satisfatórios, na faixa entre 70 a 120% para 63 dos 74 agrotóxicos inicialmente avaliados, com valores de RSD \leq 20%. Este método apresentou valores de LOD de $1,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ e LOQ $5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a maioria dos compostos analisados. Além disso, o método teve seu escopo de matriz estendido para camomila (*Matricaria chamomilla*), espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) e guaco (*Mikania glomerata* Spreng).

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

O método validado foi aplicado para a determinação de resíduos dos 63 agrotóxicos estudados em 11 amostras de plantas medicinais adquiridas em comércio local, dos quais 1 agrotóxico foi detectado (clorpirifós) estando dentro do limite estabelecido ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$) pela Farmacopeia Europeia, sendo que as demais amostras não apresentaram resíduos dos compostos estudados, nos níveis avaliados neste estudo.

O método QuEChERS citrato utilizado neste estudo apresenta como vantagens em relação aos métodos tradicionais de extração, ser um procedimento simples e rápido, com um menor número de etapas analíticas, o que diminui a probabilidade de erros e perdas, além de ser relativamente barato e ambientalmente correto, devido ao baixo consumo de solventes orgânicos.

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

6 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

Durante o desenvolvimento deste trabalho, os resíduos gerados foram armazenados em recipientes adequados e encaminhados para o almoxarifado do Departamento de Química (DQ) da UFSM, o qual é responsável pela destinação correta dos resíduos gerados, os quais serão posteriormente tratados por uma empresa capacitada nesta área..

7 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- ❖ Ampliação do escopo de resíduos de agrotóxicos a serem analisados, presentes no Anexo V da RDC 105/2016, visando atender a legislação brasileira;
- ❖ Desenvolver um método de análise cromatográfica por UHPLC-MS/MS para expandir o escopo para analitos que somente atendem a esta modalidade cromatográfica;
- ❖ Avaliar a aplicação do método QuEChERS modificado para a determinação de outros contaminantes orgânicos, como micotoxinas;
- ❖ Avaliar o uso de cartuchos de SPE para a realização de pré-concentração dos analitos, como também, avaliar diferentes solventes de eluição para melhorar a extração dos compostos;
- ❖ Aplicação do método QuEChERS modificado em outras espécies vegetais empregadas na produção de fitoterápicos;
- ❖ Realizar monitoramento da matéria-prima vegetal ativa, desde o cultivo até o preparo de medicamentos fitoterápicos, a fim de avaliar a persistência de resíduos de agrotóxicos e outros contaminantes.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHILASH, P. C.; SINGH, N. Multiple Residue Extraction for Organochlorine Pesticides in Medicinal Plants. **Bull Environ Contam Toxicol**. 81:604–607, 2008.

AHMADKHANIHA, R. et al. Simultaneous Determination of Parathion, Malathion, Diazinon, and Pirimiphos Methyl in Dried Medicinal Plants Using Solid-Phase Microextraction Fibre Coated with Single-Walled Carbon Nanotubes. **The Scientific World Journal Volume**, p.1-8, 2012.

ALMEIDA, C.; BARBIERI, R. L.; RIBEIRO, M. V. Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.): saber de erveiros e feirantes em Pelotas (RS). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 722-729, 2015.

ALMULLA, S. A. M. H. Determination of multiple pesticides residues in imported tea in UAE using liquid and gas chromatography and tandem mass spectrometry. **Dissertação de Mestrado**, Universidade dos Emirados Árabes Unidos. Disponível em: <https://scholarworks.uaeu.ac.ae/cgi/viewcontent.cgi?article=1328&context=all_theses>. Acessado em: 23 jan 2018.

AL-RUBAYE, A. F.; HAMEED, I. H.; KADHIM, M. J. A Review: Uses of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Technique for Analysis of Bioactive Natural Compounds of Some Plants. **International Journal of Toxicological and Pharmacological Research**, v. 9, n. 1, p. 81-85, 2017.

ANMAT – Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Farmacopea Argentina, 7 ed, **Ministerio de Salud de la Nación**. Secretaría de Políticas, Regulación y Institutos, 2013.

ANASTASSIADES M, SCHERBAUM E, TASDELEN B, STAJNBAHER D. Crop protection, public health, environmental safety. Weinheim, Germany: **Wiley-VCH**; 2007.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Análise de resíduos de agrotóxicos em fitoterápicos**. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/2501251/FAQ_Agrotoxicos_Fito.pdf/c2bcd8cb-a9d4-47ff-aeaa-29ad5203afae>. Acessado em: 15 set 2017.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/definicao.htm>>. Acessado em: 28 abr 2017.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Poster Fitoterápicos**. Disponível em:< <https://www.passeidireto.com/arquivo/32398559/poster-fitoterapicos---anvisa>>. Acessado em: 15 set 2017.

AQUINO, A.; SOUZA, M. R. R.; MACIEL, S. T. A.; ALEXANDRE, M. R.; NAVICKIENE, S. Multiclass MSPD Method for Pesticide Determination in Dehydrated Hyptis pectinata (Sambacaitá) Medicinal Plant by GC-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**., Vol. 22, No. 8, 1525-1530, 2011.

AQUINO, A.; WANDERLEY, K. A.; PAIVA-SANTOS, C. O.; SÁ, G. F.; ALEXANDRE, M. R.; JÚNIOR, S. A.; NAVICKIENE, S. Coordination polymer adsorbent for matrix solid-phase dispersion extraction of pesticides during analysis of dehydrated Hyptis pectinata medicinal plant by GC/MS. **Talanta**, v. 83, p.631-636, 2010.

ASENSIO-RAMOS, M.; HERNANDEZ-BORGES, J.; RAVELO-PEREZ, L. M. et al. Evaluation of a modified QuEChERS method for the extraction of pesticides from agricultural, ornamental and forestal soils. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 2307-2319, 2010.

ATTALLAH, E. R.; BARAKAT, D. A.; MAATOOK, G. R.; BADAWY, H. A. Validation of a quick and easy (QuEChERS) method for the determination of pesticides residue in dried herbs. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 10, n. 1, p. 755-762, 2012.

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

BETTEGA, P. V. C. CZLUSNIAK, G. R.; PIVA, R.; NAMBA, E. L.; RIBAS, C. R.; GRÉGIO, A. M. T.; ROSA, E. A. R. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. **Archives of Oral Research**, v. 7, n. 1, p. 89-97 , 2011.

BIRADAR, D. P. Medicinal plants and phytomedicines. **Annals of phytomedicine**, v. 4, n. 1, p. 1-5, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 105, de 31 de agosto de 2016**. Altera a Resolução – RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3171284/RDC_26_2014_COMP.pdf/aa3877d0-67d2-48a4-8e46-b9502092df0f>. Acessado em: 28 abr 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 26, de 13 de maio de 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf>. Acessado em: 28 abr 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166 de 24 de julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>. Acessado em: 13 dez 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 196, de 22 de dezembro de 2017**. Altera a Resolução - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_196_2017_.pdf/0201ff94-343d-427d-b554-4a729b9e540c>. Acessado em: 08 jan 2018.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, jan/dez, 2003.

BRITO, S. C. D.; RODRIGUES, W. Avaliação do marco regulatório na produção de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista de Políticas Públicas – Periódicos UFMA**, v. 19, n. 2, p. 531-538, 2015.

BRUZZONITI, M. C.; CHECCHINI, L.; CARLO, R. M.; ORLANDINI, S.; RIVOIRA, L.; BUBBA, M. QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 4089-4116, 2014.

CACCIA-BAVA, M. C. G. G.; BERTONI, B. W.; PEREIRA, A. M. S.; MARTINEZ, E. Z. Disponibilidade de medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais nas unidades de atenção básica do Estado de São Paulo: resultados do Programa Nacional de Melhoria do Acesso e da Qualidade da Atenção Básica (PMAQ). **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 5, p. 1651-1659, 2017.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phototherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-89, 2000.

CAO, Y.; TANG, H.; CHEN, D.; LI, L. A novel method based on MSPD for simultaneous determination of 16 pesticide residues in tea by LC–MS/MS. **Journal of chromatography B**, v. 998-999, p. 72–79, 2015.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, p. S58-S65, 2000.

CARVALHO, A. C. B.; BRANCO, P. F.; FERNANDES, L. A.; MARQUES, R. F. O.; CUNHA, S. C.; PERFEITO, J. P. S. Regulação Brasileira em Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 7, nº 1, 2012.

CARVALHO, P. H. V.; JESUS, A. M. D.; PRATA, V. M.; BEZERRA, D. S. S.; ROMÃO, L. P. C.; NAVICKIENE, S. Tropical Peat as a Versatile Material for Solid-Phase Extraction of Pesticides from Medicinal Plant *Cordia salicifolia*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 21, No. 4, 659-664, 2010.

CHEN, H.; PAN, M.; LIU, X.; LU, C. Evaluation of transfer rates of multiple pesticides from green tea into infusion using water as pressurized liquid extraction solvent and ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 216, p. 1-9, 2017.

CHEN, L.; SONG, F.; LIU, Z.; ZHENG, Z.; XING, J.; LIU, S. Multi-residue method for fast determination of pesticide residues in plants used in traditional Chinese medicine by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1225, p. 132-140, 2012.

CHEN, L.; SONG, F.; LIU, Z.; ZHENG, Z.; XING, J.; LIU, S. Study of the ESI and APCI interfaces for the UPLC-MS/MS analysis of pesticides in traditional Chinese herbal medicine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 1481-1491, 2014.

CHENG, X-L.; QI, L.W.; WANG, Q.; LIU, X. G.; BOUBERTAKH, B.; WAN, J. Y.; LIU, E. H.; LI, P. Highly efficient sample preparation and quantification of constituents from traditional Chinese herbal medicines using matrix solid-phase dispersion extraction and UPLC-MS/MS. **Analyst**, v. 138, p. 2279 –2288, 2013.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Quimica Nova**, v. 31, p. 632-636, 2008.

CHO, J.; LEE, J.; LIM, C-U. e AHN, J. Quantification of Pesticides in Food Crops Using QuEChERS Approaches and GC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 33, n. 12, p. 1803, 1816, 2016.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**, 2ª ed., Unicamp: Campinas, 2009.

DAI, R.; REN, X.; HE, X.; HUO, Y. Convenient Analytical Method for Quantitative Determination of 23 Pesticide Residues in Herbs by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Bull Environ Contam Toxicol**. v. 86, p. 559–564, 2011.

DU, G; SONG, Y.; WANG, Y. Rapid simultaneous determination of multiple pesticide residues in traditional Chinese medicines using programmed temperature vaporizer injection–fast gas chromatography coupled with mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 34, p. 3372–3382, 2011.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

EP. **European Pharmacopoeia**. COUNCIL OF EUROPE EUROPEAN PHARMACOPOE. COUNCIL OF EUROPE - (EDQM). 9th Edition, 2017.

FAN, C. L.; CHANG, Q. Y.; PANG, G. F.; LI, Z. Y.; KANG, J.; PAN, G. Q.; ZHENG, S. Z.; WANG, W. W.; YAO, C. C.; JI, X. X. High-Throughput Analytical Techniques for Determination of Residues of 653 Multiclass Pesticides and Chemical Pollutants in Tea, Part II: Comparative Study of Extraction Efficiencies of Three Sample Preparation Techniques. **Journal of AOA C International**, v. 96, n. 2, p. 432-440, 2013.

FENG, J.; TANG, H.; CHEN, D.; DONG, H.; LI, L. Accurate determination of pesticide residues incurred in tea by gas chromatography-high resolution isotope dilution mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 5, p. 4196-4204, 2013.

FERMINO, B. L.; MILANEZ, M. C.; FREITAS, G. B. L.; SILVA, W. C. F. N.; PEREIRA, R. P.; ROCHA, J. B. T.; BONINI, J. S. Ginkgo biloba L.: Phytochemical componentes and antioxidante activity. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 38, p. 950-955, 2015.

FERNANDES, C. P. M.; FÉLIX, S. R.; NOBRE, M. O. Toxicidade dos fitoterápicos de interesse do SUS: uma revisão. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 37, n. 1, p. 83-96, 2016.

FERREIRA, T. S.; MOREIRA, C.Z.; CÁRIA, N. Z.; VICTORIANO, G.; SILVA JR, W.F.; MAGALHÃES, J.C. Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 290-298, 2014.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.

FIGUEREDO, C. A.; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis – Revista de Saúde Coletiva**, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 381-400, 2014.

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

GUO, Q. et al. Analysis of the residues of 20 organochlorine pesticides in Herba epimedii, a Chinese herbal medicine, by solid-phase extraction with gas

chromatography/negative chemical ionization-mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 93, n. 1, p. 295-305, 2010.

HAKME, E.; LOZANO, A.; UCLÉS, S.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Further improvements in pesticide residue analysis in food by applying gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry (GC-QqQ-MS/MS) technologies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, DOI: 10.1007/s00216-017-0723-x, 2017.

HAMEED, I. H.; MOHAMMED, G. J.; KAMAL, S. A. A Review: Uses and Pharmacological Activity of *Matricaria chamomilla*. *Indian Journal of Public Health Research and Development*, v. 9, n. 3, 2018.

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

HARRIS, E. S. J.; CAO, S.; LITTLEFIELD, B. A.; CRAYCROFT, J. A.; SCHOLTEN, R.; KAPTCHUK, T.; FU, Y.; WANG, W.; LIU, Y.; CHEN, H.; ZHAO, Z.; CLARDY, J.; WOOLF, A. D.; EISENBERG, D. M. Heavy metal and pesticide content in commonly prescribed individual raw Chinese Herbal Medicines. **Science of Total Environment**, v. 409, p. 4297-4305, 2011.

HAYWARD, D. G.; WONG, J. W.; PARK, H. Y. Determinations for Pesticides on Black, Green, Oolong and White Teas by Gas Chromatography Triple-Quadrupole Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, P. 8116-8124, 2015.

HIRD, S. J.; LAU, B. P-Y.; SCHUHMACHER, R.; KRŠKA, R. Liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of chemical contaminants in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 59, p. 59-72, 2014.

HO, Y.; TSOI, Y.; LEUNG, K. S. Highly sensitive and selective organophosphate screening in twelve commodities of fruits, vegetables and herbal medicines by dispersive liquid-liquid microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 775, p. 58-66, 2013.

HOU, X.; LEI, S.; GUO, L.; QIU, S. Optimization of a multi-residue method for 101 pesticides in green tea leaves using gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 26, 401–407, 2016.

HUIE, C. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 373, p. 23-30, 2002.

HUO, F.; TANG, H.; WU, X.; CHEN, D.; ZHAO, T.; LIU, P.; LI, L. Utilizing a novel sorbent in the solid phase extraction for simultaneous determination of 15 pesticide residues in green tea by GC/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1023-1024, p. 44-54, 2016.

KOSALEC, I; CVEK, J; TOMIĆ, S. Contaminants of medicinal herbs and herbal products. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 60, p. 485-501, 2009.

KRUVE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K. et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 29-44, 2015a .

KRUVE, A. .; REBANE, R.; KIPPER, K. et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 8-28, 2015b.

KUANG, Y.; QIU, F.; KONG, W.; LUO, J.; CHENG, H.; YANG, M. Simultaneous quantification of mycotoxins and pesticide residues in ginseng with one-step extraction using ultra-high performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 939, p. 98-107, 2013.

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

LEE, J.; KIM, L.; SHIN, Y.; LEE, J.; LEE, J.; KIM, E.; MOON, J. K.; KIM, J. H. Rapid and Simultaneous Analysis of 360 Pesticides in Brown Rice, Spinach, Orange, and Potato using Microbore GC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 16, p. 3387-3395, 2017.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA K.; LIGHTFIELD A. R. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for

Residue Analysis of Fruits and Vegetables. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 88, p. 615, 2005.

LI, J.; GU, Y.; XUE, J.; JIN, H. Y.; MA, S. Analysis and Risk Assessment of Pesticide Residues in a Chinese Herbal Medicine, *Lonicera japonica* Thunb. **Chromatographia**, v. 80, p.503–512, 2017.

LIU, H.; KONG, W.; GONG, B.; MIAO, Q.; QI, Y.; YANG, M. Rapid analysis of multi-pesticides in *Morinda officinalis* by GC–ECD with accelerated solvent extraction assisted matrix solid phase dispersion and positive confirmation by GC–MS. **Journal of Chromatography B**, v. 974, p. 65-74, 2015.

LIU, J.; TONG, L.; LI, D.; MENG, W.; SUN, W.; ZHAO, Y.; YU, Z. Comparison of two extraction methods for the determination of 135 pesticides in *Corydalis Rhizoma*, *Chuanxiong Rhizoma* and *Angelicae sinensis Radix* by liquid chromatography-triple quadrupole-mass spectrometry. Application to the roots and rhizomes of Chinese herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 1017–1018, p. 233–240, 2016.

LIU, X.; GUAN, W.; HAO, X.; WU, X.; MA, Y.; PAN, C. Pesticide Multi-Residue Analysis in Tea Using d-SPE Sample Cleanup with Graphene Mixed with Primary Secondary Amine and Graphitized Carbon Black Prior to LC–MS/MS. **Chromatographia**. v. 77, p. 31–37, 2014.

LOPES, M. M. Plantas medicinais do SUS: espécies comuns da região de Bauru-SP. 2015. . **Trabalho de Conclusão de Curso (licenciatura - Química)** - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/124309>>. Acessado em: 26 jul 2018.

LOZANO, A.; RAJSKI, Ł.; BELMONTE-VALLES, N.; UCLÉS, A.; UCLÉS, S.; MEZCUA, M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Pesticide analysis in teas and chamomile by liquid chromatography and gas chromatography tandem mass spectrometry using a modified QuEChERS method: Validation and pilot survey in real samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1268, p. 109-122, 2012.

ŁOZOWICKA, B.; JANKOWSKA, M.; RUTKOWSKA, E.; HRYNKO, I.; KACZYŃSKI, P.; MICIŃSKI, J. The evaluation of a fast and simple pesticide multiresidue method in various herbs by gas chromatography. **Journal of Natural Medicines**. v. 68, p. 95–111, 2014.

ŁOZOWICKA, B.; RUTKOWSKA, E.; JANKOWSKA, M. Influence of QuEChERS modifications on recovery and matrix effect during the multi-residue pesticide analysis in soil by GC/MS/MS and GC/ECD/NPD. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 7124-7138, 2017.

LU, C. et al. Simultaneous determination of pyrethrins residues in teas by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 678, p. 56-62, 2010.

LUCAS, D. Optimizing Sample Preparation for LC-MS/MS of Pesticides Residues in Herbal Teas. **Agilent Technologies Inc.**, 2013.

MACHADO, I.; GÉREZ, N.; PISTÓN, M.; HEINZEN, H.; CESIO, M. V. Determination of pesticide residues in globe artichoke leaves and fruits by GC-MS and LC-MS/MS using the same QuEChERS procedure. **Food Chemistry**, v. 227, p. 227-236, 2017.

MAESTRONI, B.; ALNASER, A. A.; GHANEM, I. Validation of an Analytical Method for the Determination of Pesticide Residues in Vine Leaves by GC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 6421-6430, 2018.

MAO, X.; WAN, Y.; YAN, A.; SHEN, M.; WEI, Y. Simultaneous determination of organophosphorus, organochlorine, pyrethroid and carbamate pesticides in *Radix astragalii* by microwave-assisted extraction/dispersive-solid phase extraction coupled with GC-MS. **Talanta**, v. 97, p. 131-141, 2012.

MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ, G.; NIETO-GARCIA, A. J.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G. Application of QuEChERS based method for the determination of pesticides in nutraceutical products (*Camellia sinensis*) by liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 177, p. 182-190, 2016.

MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ, G.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; GARRIDO-FRENICH, A. Analytical approaches for the determination of pesticide residues in nutraceutical products and related matrices by chromatographic techniques coupled to mass spectrometry. **Talanta**, v. 118, p. 277-291, 2014.

MASIÁ, A.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Last trends in pesticide residue determination by liquid chromatography-mass spectrometry. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 2, p. 11-24, 2014.

MOREIRA, D. L.; TEIXEIRA, S. S.; MONTEIRO, M. H. D.; DE-OLIVEIRA, A. C. A. X.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Traditional use and safety of herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 248-257, 2014.

MORENO-GONZÁLEZ, D. et al. High-Throughput Methodology for the Determination of 33 Carbamates in Herbal Products by UHPLC–MS/MS. **Food Analytical Methods**, v. 8, p. 2059-2068, 2015

MOSADDEGH, M. H.; EMAMI, F.; ASGHARI, G. Evaluation of Residual Diazinon and Chlorpyrifos in Children Herbal Medicines by Headspace-SPME and GC-FID. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.13 (2): p. 541-549, 2014.

NGUYEN, T. D. et al. A multiresidue method for the determination 234 pesticides in Korean herbs using gas chromatography mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 95, p. 43-49, 2010.

NICOLETTI, M. A.; OLIVEIRA-JÚNIOR, M. A.; BERTASSO, C. C.; CAPOROSSO, P. Y.; TAVARES, A. P. L. Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos. **Infarma**, v. 19, n. ½, p. 32-40, 2007.

NIE, J.; MIAO, S.; LEHOTAY, S. J.; LI, W-T.; ZHOU, H.; MAO, X-H.; LU, J-W.; LAN, L.; JI, S. Multi-residue analysis of pesticides in traditional Chinese medicines using gas chromatography – negative chemical ionization tandem mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 32, n. 8, p. 1287-1300, 2015.

OLIVEIRA, A. B.; LONGHI, J. G.; ANDRADE, C. A.; MIGUEL; O. G.; MIGUEL, M. D. A normatização dos fitoterápicos no Brasil. Biblioteca Digital de Periódicos (UFPR). **Visão Acadêmica**, v. 7, n.2, 2006.

OLIVEIRA, A. C. D. Inovação aplicada à indústria de medicamentos fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 7, n. 2, p. 85-90, 2012.

OLIVEIRA, A. C. D.; ROPKE, C. D. Os dez anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Fitos**, v. 10, n. 2, p. 95-219, 2016.

OLIVEIRA, D. R.; OLIVEIRA, A. C. D.; MARQUES, L. C. O estado regulatório dos fitoterápicos no Brasil: Um paralelo entre a legislação e o mercado farmacêutico (1995–2015). **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 4, n. 4, p. 139-148, 2016.

OLIVEIRA, F. G. S.; LEHN, C. R. Riscos e Perspectivas na Utilização de Fitoterápicos no Brasil. **Opará: Etnicidades, Movimentos Sociais e Educação**, v. 3, n. 4, p. 35-44, jan./dez. 2015.

OSHIRO, M. C.; MIGUEL, M. D.; DIAS, J. F. et al. A evolução do registro e prescrição de fitoterápicos no Brasil sob a perspectiva legal e sanitária. **Revista Visa em debate: sociedade, ciência e tecnologia**, v. 4, n. 4, p. 116-122, 2016.

PACÍFICO, D. M.; ARAÚJO, T. S. L.; SOUSA, N. A. t al. Scientific and technological forecasting of *Matricaria recutita* L. (chamomile). **Revista Geintec**, v. 8, n. 2, p. 4339-4356, 2018).

PARK, Y-S. et al. Pesticide multiresidue analysis in *Panax ginseng* (C. A. Meyer) by solid-phase extraction and gas chromatography with electron capture and nitrogen-phosphorus detection. **Biomedical Chromatography**, v. 21, p. 29-39, 2007.

PÉREZ-PARADA, A.; ALONSO, B.; RODRÍGUEZ, C.; BESIL, N.; CESIO, V.; DIANA, L.; BURGUEÑO, A.; BAZZURRO, P.; BOJORGE, A.; GEREZ, N.; HEINZEN, H. Evaluation of Three Multiresidue Methods for the Determination of Pesticides in Marijuana (*Cannabis sativa* L.) with Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Chromatographia**, v. 79, p. 1069-1083, 2016.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v.32, n.6, p. 1620-1634, 2009.

PSOMA, A. K.; PASIAS, I. N.; BLETSOU, A. A.; THOMAIDIS, N. S. Development and Validation of a Multiresidue Method for the Determination of Pesticides in Chios Mastic Gum by QuEChERS and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 8, p. 624-634, 2015.

QI. X. Development of a matrix solid-phase dispersion-sonication extraction method for the determination of fungicides residues in ginseng extract. **Food Chemistry**, v. 121, p. 758-762, 2010.

QIN, Y.; CHEN, L.; YANG, X.; LI, S.; WANG, Y.; TANG, Y.; LIU, C. Multi-residue method for determination of selected neonicotinoid insecticides in traditional Chinese medicine using modified dispersive solid-phase extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical Sciences**, v. 31, p. 823-830, 2015.

RAO, M. M.; KUMARMEENA, A.; GALIB. Detection of toxic heavy metals and pesticide residue in herbal plants which are commonly used in the herbal formulations. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 181, p. 267-271, 2011.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. **Open Chemistry**, v. 13, p. 980-1010, 2015.

RODRIGUES, M. V. N.; REYES, F. G. R.; MAGALHAES, P. M.; RATH, S. GC-MS Determination of Organochlorine Pesticides in Medicinal Plants Harvested in Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 135-142, 2007.

RUTKOWSKA, E.; ŁOZOWICKA, B.; KACZYŃSKI, P. Modification of Multiresidue QuEChERS Protocol to Minimize Matrix Effect and Improve Recoveries for Determination of Pesticide Residues in Dried Herbs Followed by GC-MS/MS. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 709-724, 2018.

SAKI, K.; HASSANZAD-AZAR, H.; NAGHDI, N.; BAHMANI, M. *Ginkgo biloba*; an effective medicinal plant on neurological disorders. *Journal of Preventive Epidemiology*, v. 1, n. 1, e03, 2016.

SANTE. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. **Documento n° 11813/2017**. Disponível em:

<
https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf >. Acessado em: 13 dez 2017.

SARKHAIL, P.; YUNESIAN, M.; AHMADKHANIHA, R.; SARKHEIL, P.; RASTKARI, N. Levels of organophosphorus pesticides in medicinal plants commonly consumed in Iran. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2012, v. 20, n. 9, p. 1-5.

SELVI, C.; PARAMASIVAM, M. Review on pesticide residue analytical methods and residue status in medicinal plants. **Journal of Entomology and Zoology Studies**. v. 5, n. 3, p. 945-950, 2017.

SHARAPIN, N. Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos. **Publicação do convênio Andrés Bello e Programa Iberoamericano de Ciência e Tecnologia para o desenvolvimento**. Rio de Janeiro. 2000.

SHOEIBI, S.; AMIRAHMADI, M.; RASTEGAR, H.; KHOSROKHAVAR, R.; KHANEGHAH, A. M. An Applicable Strategy for Improvement Recovery in Simultaneous Analysis of 20 Pesticides Residue in Tea. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 5, p. T792-T796, 2013.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia – Da planta ao medicamento**. 4ª Edição. Editora da UFRGS e UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2002.

SŁOWIK-BOROWIEC, M. Validation of a QuEChERS-Based Gas Chromatographic Method for Multiresidue Pesticide Analysis in Fresh Peppermint Including Studies of Matrix Effects. **Food Analytical Methods**. v. 8, p. 1413–1424, 2015.

SŁOWIK-BOROWIEC, M.; SZPYRKA, E.; WALORCZYK, S. Analysis of Pesticide Residues in Fresh Peppermint, *Mentha piperita* L., Using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe Method (QuEChERS) Followed by Gas Chromatography with Electron Capture and Nitrogen Phosphorus Detection. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, p.633–637, 2012.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-450, 2008.

SUN, N.; HAO, L.; XUE, J.; JIN, H.; TIAN, J.; LIN, R. Multi-residue analysis of 18 organochlorine pesticides in 10 Traditional Chinese Medicines by gas chromatography (GC). **Journal of Health Science**, v. 53, n. 4, p. 464-469, 2007.

TAGAMI, T. et al. Rapid analysis of 56 pesticide residues in natural medicines by GC/MS with negative chemical ionization. **Journal of Natural Medicines**, v. 62, p. 126-129, 2008.

TAHA, S. M. A Rapid Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for Multi Residue Analysis of 212 Pesticides in Chamomile. **Journal of Research Analytica**, v. 2, n. 3, p. 1-16, 2016.

TAHA, S. M.; GADALLA, S. A. Development of an efficient method for multi residue analysis of 160 pesticides in herbal plant by ethyl acetate hexane mixture with direct injection to GC-MS/MS. **Talanta**, v. 174, p. 767-779, 2017.

THOMPSON, M; ELLISON, S. L.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 835-855, 2002.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

TONG, H.; TONG, Y.; XUE, J. Multi-residual Pesticide Monitoring in Commercial Chinese Herbal Medicines by Gas Chromatography–Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 7, p. 135-145, 2014.

TONG, Y.; XUE, J.; WU, X. Multi-residue pesticide determination in Flos chrysanthemi by mixed mode SPE purification with GC-MS/MS analysis. **Analytical Letters**, 46. p. 615–629, 2013.

TREVISAN, M. T. S.; OWEN, R. W.; CALATAYUD-VERNICH, P.; BREUER, A.; PICÓ, Y. Pesticide analysis in coffee leaves using a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe approach and liquid chromatography tandem mass spectrometry: Optimization of the clean-up step. **Journal of Chromatography A**, v. 1512, p. 98-106, 2017.

TRIPATHY, V.; BASAK, B. B.; VARGHESE, T. S.; SAHA, A. Residues and contaminants in medicinal herbs—A review. **Phytochemistry Letters**. v. 14, p. 67-78, 2015.

TRIPATHY, V.; SAHA, A.; KUMAR, J. Detection of pesticides in popular medicinal herbs: a modified QuEChERS and gas chromatography-mass spectrometry based approach. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 458-468, 2017.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE. **PPDB: Pesticide Properties DataBase**. Disponível em: <<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>>. Acessado em: 22 jul 2017.

USP 40-NF 35. **United States Pharmacopeia**. US PHARMACOPEIAL CONVENTION USP. USP UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONV. 2016.

VACLAVIK, L.; KRYNITSKY, A. J.; RADER, J. I. Mass spectrometric analysis of pharmaceutical adulterants in products labeled as botanical dietary supplements or herbal remedies: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 6767-6790, 2014.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. **Validação de métodos analíticos**. Arquivos do MUDI, v. 11, n. 2, p. 26-31, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VESSECCHI, R.; LOPES, N. P.; GOZZO, F. C.; DÖRR, F. A.; MURGU, M.; LEBRE, D. T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O. V.; RIVEROS, J. M. Nomenclaturas de Espectrometria de Massas em Língua Portuguesa. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1875-1887, 2011.

WAN, Y.; et al Simultaneous determination of organophosphorus pesticides in Chinese herbal medicines by microwave-assisted extraction coupled with dispersive-solid phase extraction and gas chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 24, p.961-968, 2010.

WONG, J. W. et al. Analysis of Organophosphorus Pesticides in Dried Ground Ginseng Root by Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry and -Flame Photometric Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1117-1128, 2007.

WONG, J. W. et al. Multiresidue Pesticide Analysis of Ginseng Powders Using Acetonitrile- or Acetone-Based Extraction, Solid-Phase Extraction Cleanup, and Gas Chromatography-Mass Spectrometry/Selective Ion Monitoring (GC-MS/SIM) or - Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5884-5896, 2010.

WONG, M. Y-M.; SO, P-K.; YAO, Z-P. Direct analysis of traditional Chinese medicines by mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1026, p. 2-14, 2016.

World Health Organization. Disponível em: <
<http://who.int/medicines/areas/traditional/definitions/en/>>. Acessado em: 30 ago 2017.

WU, R.; CHEN, Q.; LI, S.; FAN, G. Simultaneous Determination of 27 Pesticides in Ginseng by UPLC/MS/MS and Modified QuEChERS Procedure. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 3, p. 839- 846, 2015.

XU, R.; WU, J.; LIU, Y.; ZHAO, R.; CHEN, B.; YANG, M.; CHEN, J. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in traditional Chinese medicine by gas chromatography with electron capture detection. **Chemosphere**, v. 84, p. 908-912, 2011.

YANG, X.; XU, D. C.; QIU, J. W.; ZHANG, H.; ZHANG, Y. C.; DONG, A. J.; MA, Y.; WANG, J. Simultaneous determination of 118 pesticide residues in Chinese teas by gas chromatography-mass spectrometry. **Chemical Papers**, v. 63, n. 1, p. 39-46, 2009.

YANG, Y.; KONG, W.; ZHAO, L.; XIAO, Q.; LIU, H.; ZHAO, X.; YANG, M. A multiresidue method for simultaneous determination of 44 organophosphorous pesticides in Pogostemon cablin and related products using modified QuEChERS sample preparation procedure and GC-SPD. **Journal of Chromatography B**, v. 974, p. 118-125, 2015.

ZHANG, X.; MOBLEY, N.; ZHANG, J.; ZHENG, X.; LU, L.; RAGIN, O.; SMITH, C. J. Analysis of Agricultural Residues on Tea Using d-SPE Sample Preparation with GC-NCI-MS and UHPLC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, p. 11553-11560, 2010.

ZHAO, L.; STEVENS, J. Optimizing Recoveries of Planar Pesticides in Spinach Using Toluene and Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC Kits with Graphitized Carbon. Application Note, **Agilent Technologies Inc.**, 5990-4247EN, 2012.

ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M. Analysis of pesticides residues in Brazilian medicines plants: matrix solid phase dispersion versus conventional (European Pharmacopoeia) methods. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 14, n. 2, p. 304-309, 2003.

ZUIN, V.G.; VILEGAS, J. H. Y. Pesticide Residues in Medicinal Plants and Phytomedicines. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 73-88, 2000.