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

Paulo Emílio Pereira Barci

DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM NOZ-PECÃ EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E LC-MS/MS

Santa Maria, RS

2019

Paulo Emílio Pereira Barci

DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM NOZ-PECÃ EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E LC-MS/MS

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

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, RS

2019

Barci, Paulo Emílio Pereira
DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM NOZ-PECÃ EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E LC-MS/MS / Paulo Emílio Pereira Barci.- 2019.
91 p.; 30 cm

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

1. noz-pecã 2. agrotóxicos 3. cromatografia 4. preparo de amostra I. Zanella, Renato II. Título.

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

Paulo Emílio Pereira Barci

DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM NOZ-PECÃ EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E LC-MS/MS

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

Aprovado em 09 de agosto de 2019:

Prof. Dr. Renato Zanella (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Profa. Dra. Sandra Cadore Peixoto (UFN)

Prof. Dr. Osmar Damian Prestes (UFSM)

Santa Maria, RS

2019

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho à Deus e a minha família, a base de tudo.

Ao Prof. Dr. Renato Zanella, gratidão pela orientação e pela oportunidade de fazer parte do grupo do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP). Foram grandes os aprendizados, e uma excepcional oportunidade de desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Osmar Damian Prestes, pela paciência e capacitação no LARP. Agradeço por toda a ajuda, sugestões e ensinamentos ao longo desta jornada. Sempre serei grato por tudo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da UFSM, pelos ensinamentos no decorrer do curso.

Aos funcionários do PPGQ, Ademir e Valéria, pela gentileza, disposição e atenção com os alunos.

À banca de defesa da dissertação, professores Dra. Sandra Cadore Peixoto e Dr. Osmar Damian Prestes, pela disponibilidade de avaliar este trabalho e por suas contribuições.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro fornecido.

Agradeço à Deus pela oportunidade que me concedeu de ser aperfeiçoado como químico, através do mestrado. Sendo o fundamento dessa minha caminhada, me fez vivenciar Sua boa, perfeita e agradável vontade. Na certeza que com a força que Cristo me concedeu, pude enfrentar diferentes situações, confiando sempre em sua fidelidade e bondade.

Gratidão aos meus familiares, em especial a minha mãe Rosilene e irmão Ian, pelo apoio, força e suporte.

Aos meus colegas, integrantes do LARP, em especial a Larissa, Állisson, Lucila e Pimpernelli pelo apoio em todo o desenvolvimento desse trabalho. Ao José Dilson pela convivência e amizade.

Aos meus amigos que me acolheram em Santa Maria/RS e tornaram esta caminhada mais tranquila.

A todos que, de alguma forma me ajudaram na elaboração deste trabalho.

Muito obrigado!

RESUMO

DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM NOZ-PECÃ EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E LC-MS/MS

AUTOR: Paulo Emílio Pereira Barci
ORIENTADOR: Prof. Dr. Renato Zanella

A noz-pecã é uma das poucas espécies de nozes nativas do continente americano. A pecanicultura brasileira tem se destacado principalmente na região sul devido a fatores climáticos favoráveis. Considerando o aumento da comercialização desse produto, tem-se a necessidade do desenvolvimento de métodos multirresíduo para a determinação multiclasse de agrotóxicos em noz-pecã. Este fruto apresenta conteúdo significativo de lipídios, sendo este um grande desafio para a determinação de agrotóxicos em níveis traço, podendo ocasionar interferências na análise. Neste estudo, foi estabelecido um método de preparo de amostra com a finalidade de determinação de resíduo de 49 agrotóxicos em noz-pecã utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS). O método baseado no procedimento QuEChERS emprega extração com acetonitrila e sais na etapa de partição e limpeza de extrato utilizando C18 e PSA. Esta mistura de sorventes apresentou resultados significativos quanto ao número de compostos quando comparada a outros sorventes comerciais. A validação do método envolveu os parâmetros linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e efeito matriz. A determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de noz-pecã pelo método proposto foi simples, rápido e efetivo para a determinação multirresíduo de agrotóxicos. Os resultados da validação, avaliados através de ensaios de recuperação em 5 níveis de fortificação, foram satisfatórios, com exatidão entre 70 e 120%, RSD <20%, linearidade entre 5 e 250 µg kg^{-1}, coeficiente de determinação (r^2) superior a 0,99, LOD do método de 2 e 3 µg kg^{-1}, e LOQ de 5 e 10 µg kg^{-1}. O método desenvolvido foi aplicado em amostras de noz-pecã obtidas de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul (Brasil), Buenos Aires (Argentina) e Santiago (Chile). Não foram detectados resíduos dos agrotóxicos avaliados nas amostras analisadas. O método proposto comprovou ser eficiente e robusto permitindo o emprego em análises de rotina.

Palavras-chave: noz-pecã, agrotóxicos, cromatografia, preparo de amostra.

ABSTRACT

MULTIRESIDUE DETERMINATION OF PESTICIDES IN PECAN NUTS EMPLOYING MODIFIED QuEChERS METHOD AND LC-MS/MS

AUTHOR: Paulo Emílio Pereira Barci
ADVISOR: Prof. Dr. Renato Zanella

Pecan nuts is one of the few native nuts species from the American continent. The area in southern Brazil dedicated to pecan production is directly linked to the favorable climate of this region. Considering the commercialization growth of this product, there is a need to develop multiclass pesticide methods to analyze different pesticides in pecan nuts. Pecan is a commodity that contain high amount of lipids. It is a big challenge for sample preparation to quantify pesticides in low concentration. It could become interference in the analysis. The aim of this study was to establish a sample preparation method for determination of 47 pesticide residues in pecan nuts using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The method based on QuEChERS procedure involves acetonitrile extraction, different salts partition and clean-up with C18 and PSA. This mixture of sorbents showed significant results in number of compounds compared to other commercial sorbents. The method was validated evaluating the parameters linearity, accuracy, precision, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and matrix effect. The determination of pesticide residues in pecan nuts samples presented to be simple, fast and effective for pesticide multiresidue determination. The validation results, evaluated by recovery assays at 5 spiked levels, were satisfactory, with accuracy from 70 to 120%, RSD <20%, linearity from 5 to 250 µg kg^{-1}, determination coefficient (r^2) >0.99, method LOD of 2 and 3 µg kg^{-1} and LOQ of 5 and 10 µg kg^{-1}. The proposed method was applied to pecan samples obtained from different regions of Rio Grande do Sul State (Brazil); Buenos Aires (Argentina) and Santiago (Chile). No pesticide residues were detected in these samples. The proposed method proved to be efficient and robust allowing the use in routine analysis.

Keywords: pecan, pesticides, chromatography, sample preparation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção mundial de noz-pecã em toneladas. 18

Figura 2 – Parcela dos países na produção de noz-pecã na safra 2017/18. 18

Figura 3 – Fruto da nogueira-pecã 20

Figura 4 – Gráfico da distribuição da produção brasileira de noz-pecã no ano de 2017 entre os estados produtores conforme censo agropecuário do IBGE 2017. 20

Figura 5 – Configuração de um sistema de Cromatografia Líquida acoplada a um espectrômetro de massas em série do tipo triplo quadrupolo..... 30

Figura 6 – Representação das etapas do método QuEChERS 30

Figura 7 – Quadro comparativo entre as versões do método QuEChERS original, acetato e citrato. 36

Figura 8 – Cromatograma obtido pela técnica LC-MS/MS a partindo-se das soluções de compostos preparadas no extrato da matriz noz-pecã na concentração de 50 µg kg^{-1} 59

Figura 9 – Cromatograma no modo *full scan* dos extratos de amostra "branco" de noz-pecã dos testes P01, P02 e P03 no sistema GC-MS/MS Intuvo 9000. 61

Figura 10 – Cromatograma no modo *full scan* do extrato particionado no teste P01 da matriz noz-pecã no sistema GC-MS/MS Intuvo 9000. 63

Figura 11 – Extratos da etapa de partição da avaliação dos métodos QuEChERS original (P01), acetato (P02) e citrato (P03) na matriz noz-pecã. 64

Figura 12 – Percentual de compostos que apresentaram recuperações na faixa de 70 e 120% e RSD ≤ 20%, obtidos através dos testes L01, L02, L03, L04, L05, L06, L07 e L08 na matriz noz-pecã por LC-MS/MS. 64

Figura 13 – Gráfico de recuperação versus RSD obtidos nos testes de limpeza de extrato L01, L02, L03, L04, L05, L06, L07 e L08 para os 47 compostos avaliados inicialmente.....64

Figura 14 – Cromatogramas no modo full scan dos extratos de amostra "branco" de noz-pecã dos testes de limpeza de extrato L02 e L08 no sistema GC-MS/MS Intuvo 9000. 70

Figura 15 – Representação do método QuEChERS modificado proposto para a extração de agrotóxicos em noz-pecã. 71

Figura 16 – Cromatograma do íon total adquirido pelo sistema LC-MS/MS para (A) amostra branco de noz-pecã, (B) branco dos reagentes e (C) solução analítica no extrato da matriz noz-pecã, contendo os analitos na concentração de 50 µg kg^{-1}. 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do grupo das nozes por cada 100 g de matriz 21

Tabela 2 – Classificação dos agrotóxicos quanto ao seu modo de ação... 21

Tabela 3 – Classificação dos agrotóxicos quanto ao grupo químico, composto, modo de ação e limites máximos de resíduos permitidos para a cultura noz-pecã estabelecidos pela ANVISA e Comissão da União Europeia (EU) 26

Tabela 4 – Revisão da literatura acerca de métodos de análise de agrotóxicos em matrizes semelhantes a noz-pecã 32

Tabela 5– Critérios de avaliação na etapa de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos 40

Tabela 6 - Informações dos agrotóxicos, contendo fórmula e classe química, constante de acidez (pKa) e coeficiente de partição octanol-água (Log Kow) 43

Tabela 7 – Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de agrotóxicos em noz-pecã no sistema LC-MS/MS. 46

Tabela 8 – Testes de avaliação da etapa de partição utilizando o método QuEChERS original e suas variações acetato e citrato. 49

Tabela 9 – Relação de testes avaliados para avaliação de remoção de coextrativos e ensaios de recuperação para 2 mL de extrato de noz-pecã. 50

Tabela 10 – Condições empregadas no sistema cromatográfico LC-MS/MS 54

Tabela 11 – Compostos monitorados com seus respectivos tempos de retenção (t_R), modo de ionização por eletronebulização (ESI), íons precursores, íons produto e energia de colisão (EC) das transições monitoradas pelo sistema LC-MS/MS 56

Tabela 12 – Curvas analíticas no solvente e na matriz “branco” de noz-pecã e coeficientes de determinação e valores de faixa linear..... 74

Tabela 13 – Efeito matriz dos agrotóxicos estudados na matriz noz-pecã determinados por LC-MS/MS. 75

Tabela 14 – Percentuais de recuperação e RSD dos agrotóxicos com o emprego do método QuEChERS modificado, para matriz noz-pecã..... 77

Tabela 15 - Valores de LOD e LOQ do método para os analitos validados no estudo. 80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C_{18}	Sílica modificada com hidrocarboneto linear C_{18}, octadecilsilano
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva, do inglês, dispersive *Solid Phase Extraction*
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar, do inglês, *European Food Safety Authority*
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EMR-Lipid®	*Enhanced Matrix Removal-Lipid®*
EU	União Europeia, do inglês, *European Union*
EUA	Estados Unidos da América
FM	Fase móvel
GDA	Departamento de Agricultura da Geórgia, do ingês, *Georgia Department of Agriculture*
GPC	Cromatografia de permeação em gel, do inglês, *primary secundary amine*
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*
LARP	Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas
LMR	Limite Máximo de Resíduo
MAPA	Ministério Da Agricultura Pecuária e Abastecimento
NPD	Detector nitrogênio-fósforo, do inglês, *nitrogen-phosphorus detector*
PSA	Amina Primária Secundária, do inglês, *primary secundary amine*
QuEChERS	Rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rpm	Rotações por minuto
SPE	Extração em Fase Sólida, do inglês, *Solid Phase Extraction*
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, do inglês, *United States Department of Agriculture*
Z-Sep	Nanopartículas de zircônio estabilizadas com óxido de ítrio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
1.2 OBJETIVO 16
1.2.1 Objetivo geral 16
1.2.2 Objetivos específicos 16
2 REVISÃO DA LITERATURA 17
2.1 A PECANICULTURA 17
2.2 AGROTÓXICOS E SEUS IMPACTOS 23
2.3 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM NOZ-PECÃ.. 28
2.3.1 Técnicas cromatográficas para determinação de resíduos de agrotóxicos em noz-pecã 28
2.3.2 Preparo de amostra para análise multirresíduo de agrotóxicos 31
2.4 Validação 39
3 MATERIAIS E MÉTODOS 41
3.1 INSTRUMENTAÇÃO 41
3.2 REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS UTILIZADOS 42
3.3 AGROTÓXICOS SELECIONADOS 43
3.4 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO E DO PADRÃO DE CONTROLE 45
3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS 45
3.6 SISTEMA LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM NOZ-PECÃ 45
3.6.1 Escolha da fase móvel 45
3.6.2 Condições utilizadas no sistema LC-MS/MS 46
3.7 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA A ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM NOZ-PECÃ 47
3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM NOZ PECÂ 51
3.8.1 Seletividade 51
3.8.2 Curva analítica e linearidade 51
3.8.3 Efeito matriz 51
3.8.4 Exatidão e precisão 52
3.8.5 LOD e LOQ 53
3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO 53
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES 54

4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA LC-MS/MS EMPREGADO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM NOZ-PECÃ 54
4.2 CONDIÇÕES DE ANÁLISE POR LC-MS/MS 54
4.3 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM NOZ-PECÃ 54
4.3.1 Avaliação dos sais de partição 60
4.3.2 Avaliação da etapa de limpeza 64
4.3.3 Método de extração otimizado 71
4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO 72
4.4.1 Seletividade 72
4.4.2 Curva analítica e faixa linear 73
4.4.3 Efeito matriz 75
4.4.4 Exatidão (Ensaio de Recuperação), Precisão (Repetitividade) e Precisão intermediária 76
4.4.5 Determinação dos valores de LOD e LOQ do método e do instrumento 79
4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO 81
5 CONCLUSÃO 82
6 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS 83
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 83
REFERÊNCIAS 84

1 INTRODUÇÃO

A noz-pecã (*Carya illinoinensis*) pertence ao grupo das *Juglandaceae*, é uma das poucas espécies de nozes nativas do continente norte americano, na região do Vale do Mississippi (EUA) e apresenta alto valor de mercado. Um fator que favorece seu cultivo é a tolerância da nogueira-pecã a variadas condições climáticas. Os Estados Unidos continuam sendo apontados como o principal produtor de noz, cultivando aproximadamente 50% da produção mundial. Outros países vêm se destacando na produção da noz-pecã, além do Brasil, também México, África do Sul, Austrália, China, Israel e Argentina (PRADO et al., 2013; ZHANG et al., 2015; GDA, 2018; INC, 2018).

O consumo de noz-pecã pode trazer benefícios à saúde, auxiliando na redução dos níveis de colesterol e no risco de desenvolver doenças crônicas. Esses benefícios são possibilitados devido às suas características lipídicas, nas quais seu óleo tem se apresentado como uma boa fonte de compostos de alto valor agregado. Estes compostos são tocoferóis, fitoesteróis e ácidos graxos monoinsaturados (BOUALI et al., 2014).

As nozes em geral são fontes abundantes de ácidos graxos insaturados e metabólitos secundários, os quais apresentam variadas atividades biológicas, e assim, corroboram em benefícios a saúde. Ao realizar-se uma comparação entre as variedades de nozes do tipo pecã, brasileira, pistache, castanha de caju e pinheiro, a noz-pecã é a que contém em sua composição a maior proporção de ácidos graxos insaturados/saturado, com até 93% de teor total de ácidos graxos insaturados em seu óleo extraído. Estes grupos de lipídios são caracterizados pela presença de uma ou mais ligações duplas em sua estrutura (ATANASOV et al., 2018). Proteínas, vitaminas B e E, carboidratos, cálcio, magnésio, potássio, zinco, fibras e antioxidantes também constituem a noz-pecã, os quais contribuem também na diminuição de colesterol (TAIPINA et al., 2009; GDA, 2018).

Frente a este contexto, tanto comercial quanto de benefícios à saúde tem-se a necessidade do desenvolvimento de métodos multiclasse para a determinação de resíduos de agrotóxicos em noz-pecã. O fato da matriz noz-pecã apresentar alto teor de lipídios e baixo teor de humidade, este fato se torna um desafio no desenvolvimento

de métodos de preparo de amostra com o emprego de técnicas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS) (USDA, 2019).

Em relação as técnicas de preparo de amostra mais aplicadas na literatura são o emprego do método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged* e *Safe*) e Extração em Fase Sólida Dispersiva (d-SPE). A técnica d-SPE permite o emprego de uma variada combinação de sorventes para atender uma determinada demanda de uma matriz para remoção de coextrativos. Estes coextrativos (ácidos graxos e tocoferóis) presentes na matriz noz-pecã são interferentes a análise de agrotóxicos por LC-MS/MS (GARCÍA-REYES et al., 2007).

Estes métodos LC-MS/MS possibilitam a identificação e a quantificação de resíduos de agrotóxicos nesta matriz, podendo verificar se o limite máximo de resíduo (LMR) estabelecido pelos órgãos competentes (ANVISA, União Europeia) vem sendo respeitados nos frutos comercializados, e se algum agrotóxico que não possui utilização permitida tem sido aplicado à cultura. Desta forma é possível assegurar a segurança do alimento e sua qualidade em conformidade com as normas e requerimentos de cada país importador e ao mercado interno (EFSA, 2018).

Assim, o presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento e validação de um método multiresíduo de extração para 49 agrotóxicos, com posterior análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS). O método proposto foi aplicado para análise de noz-pecã do mercado local da cidade de Santa Maria/RS e Porto Alegre/RS, bem como da Argentina e Chile.

1.2 OBJETIVO

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar método analítico com base no método para a determinação multiresíduo de agrotóxicos em noz-pecã por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série, com a avaliação de sais de partição e de sorventes para emprego na etapa de d-SPE.

1.2.2 Objetivos específicos

(I) avaliar qual procedimento de extração e partição com base nos métodos QuEChERS original, acetato e citrato apresenta maior eficiência no preparo de amostra quanto ao maior número de compostos recuperados e menor extração de interferentes (coextrativos);

(II) avaliar diferentes sorventes como PSA, C18, Z-Sep+, terra diatomácea, sílica, EMR-Lipid® e quitosana para a etapa de limpeza do extrato empregando d-SPE;

(III) validar o método desenvolvido para a matriz noz-pecã em conformidade os parâmetros estabelecidos pela SANTE (2017) considerando os LMR estabelecidos no Brasil e na Europa;

(IV) aplicar o método proposto em amostras reais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

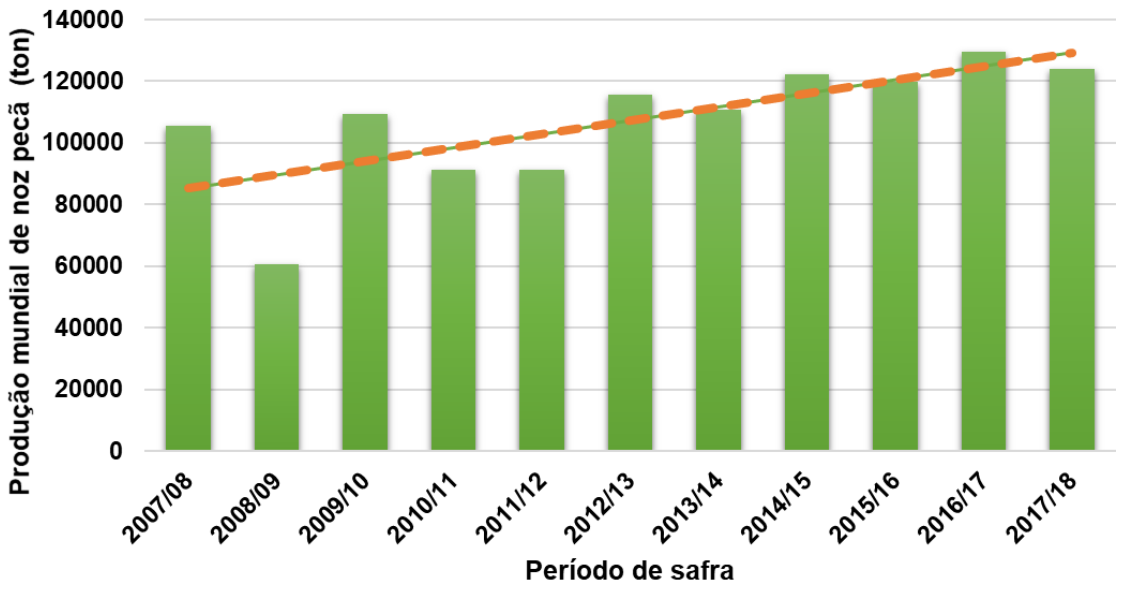
2.1 A PECANICULTURA

A Geórgia é o maior estado produtor de noz-pecã dos EUA, com produção concentradas no condado de Dougherty, sendo conhecida como a "capital pecã do mundo", devido ao grande número de nogueiras-pecã. As colheitas são realizadas nos meses de outubro e novembro (GDA, 2018).

O Conselho Internacional de Nozes e Frutas Secas (INC, do inglês *International Nut and Dried Fruit Council*), estimou uma produção de aproximadamente 124.000 toneladas de noz-pecã na safra 2017/18. Na Figura 1 é apresentada a produção mundial de noz-pecã desde a safra 2007/08 a 2017/18, onde houve um aumento de 18% desde então. Na Figura 2 está apresentada a parcela de países produtores de noz-pecã, bem como sua parcela produzida na safra 2017/18, onde 1% da produção advém de países como Brasil, Argentina, Chile entre outros (INC, 2018).

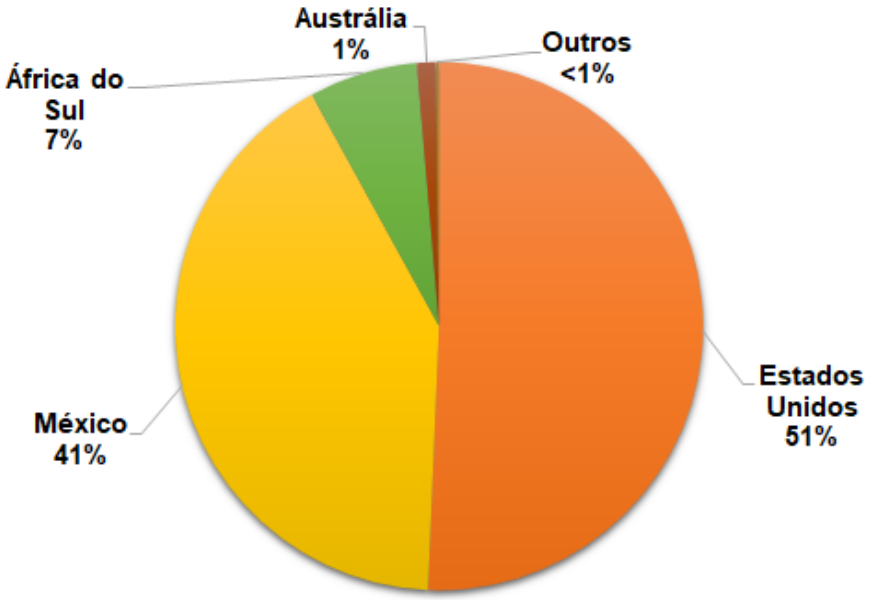
Em 2015, a China foi considerada o maior mercado consumidor de noz-pecã do mundo, tendo importado mais de 30% da produção norte-americana. Devido a esta demanda, desde 2008, a pecanicultura chinesa tem crescido rapidamente. Os chineses têm investido em pesquisas para aprimoramento do sistema de plantio e manejo que melhor se adapte as suas condições de solo e climáticas. Em 2009, a baixa produtividade de noz-pecã do país foi atribuída às limitações de terras disponíveis para o cultivo e pomares de pequeno porte (LI et al., 2009; ZHANG et al., 2015).

Figura 1 – Produção mundial de noz-pecã em toneladas.



Fonte: Adaptado de INC, 2018

Figura 2 – Parcela dos países na produção de noz-pecã na safra 2017/18.



Fonte: Adaptado de INC, 2018

A pecanicultura no Brasil foi implantada primeiramente no estado de São Paulo, na década de 60, e atualmente a produção tem se destacado na região sul, onde os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná tem obtido grande êxito no

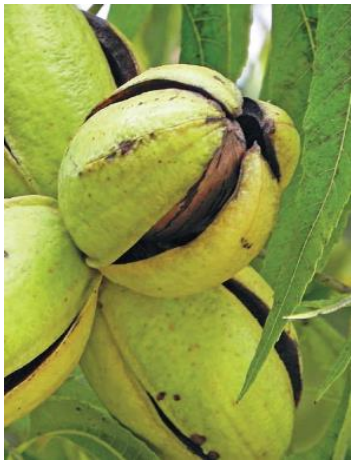
cultivo da mesma, devido a fatores climáticos favoráveis (PRADO et al., 2013; EMBRAPA, 2017).

Estes fatores climáticos são temperaturas entre 24 e 30 °C, e condições de humidade que apresentem variação de úmido a seco durante o desenvolvimento da nogueira pecã (SPARKS et al., 2005). Um fator que tem atraído o interesse de agricultores no cultivo da nogueira pecã no Brasil é o seu crescente valor de mercado. Em 2007, no centro estadual de abastecimento do estado do Rio Grande do Sul, a noz-pecã era comercializada por um preço em torno de US$ 3,00 por quilograma. Em 2014, ela já era comercializada por aproximadamente U$ 5,00 por quilograma (FRONZA et al., 2018).

Diferentes setores do governo brasileiro desde a década de 60 têm estabelecido incentivos para o fortalecimento da pecanicultura no país. No ano de 2017, o governo do estado do Rio Grande do Sul instituiu o Programa Estadual de Desenvolvimento da Pecanicultura (Pró-Pecã). Estas ações demostram o crescimento da comercialização deste fruto no mercado interno e o interesse de atender as necessidades do mercado externo, a qual apresenta também perspectivas de crescimento de consumo (EMBRAPA, 2017; RIO GRANDE DO SUL, 2017).

No Rio Grande do Sul, as cidades de Anta Gorda e Cachoeira do Sul tem se destacado como grandes produtoras de noz-pecã. Nestas cidades, a noz-pecã vem sendo cultivada majoritariamente por agricultores familiares em pequena escala, mas também cultivada em larga escala a nível empresarial. O fruto pode ser consumido *in natura* (Figura 3), processado, e aplicado de forma variada em produtos alimentícios. A casca que envolve o fruto tem sido explorada para fabricação de chás, devido à presença de antioxidantes em sua constituição (FRONZA et al. 2016; MARTINS et al., 2017).

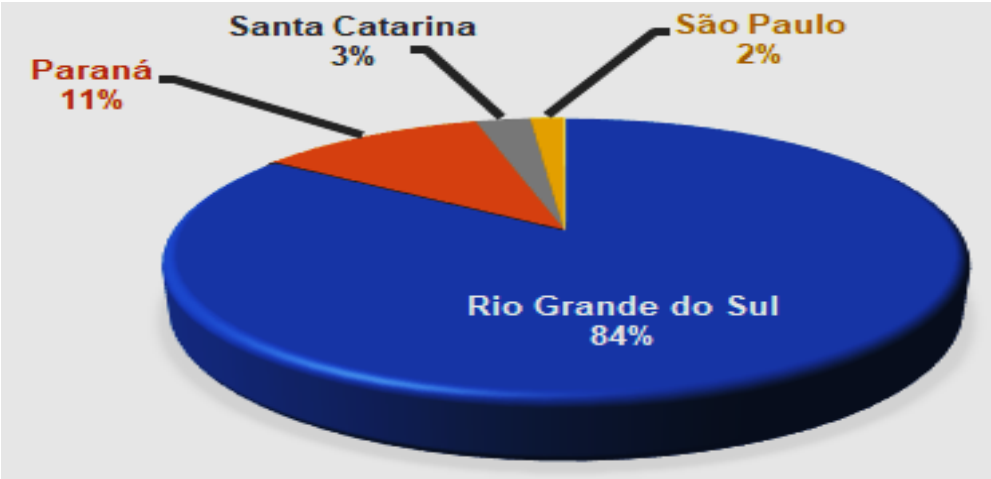
Figura 3 – Fruto da nogueira-pecã



Fonte: (Adaptado de MARTINS et al., 2017).

O censo agropecuário de 2017, divulgado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), estimou uma produção brasileira de noz europeia e pecã (este censo não divulgou o dado da pecanicultura separadamente) em torno de 1500 toneladas. O estado do Rio Grande do Sul despontou como o maior estado produtor de noz-pecã do Brasil, como apresentado na Figura 4, seguido pelos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo respectivamente (IBGE, 2017).

Figura 4 – Gráfico da distribuição da produção brasileira de noz-pecã no ano de 2017 entre os estados produtores conforme censo agropecuário do IBGE 2017.



Fonte: (IBGE et al., 2017).

A noz-pecã em sua composição apresenta aproximadamente 72 g de lipídios e 4 g de água, por cada 100 g de noz-pecã, conforme Tabela 1. Quando comparada ao grupo das nozes, conforme classificação na RDC N° 4/2012 da ANVISA, a noz-pecã é a matriz que apresenta maior proporção de lipídios em sua constituição, seguida pela macadâmia e avelã (BRASIL, 2012; USDA, 2017)

Tabela 1 – Composição do grupo das nozes por cada 100 g de matriz

Matriz	**Água (g)**	**Carboidratos (g)**	**Lipídios (g)**	**Proteína (g)**	**Açúcar (g)**
Noz-Pecã	3,52	13,86	71,97	9,17	3,97
Noz europeia (*Chestnuts*)	40,48	52,96	2,20	3,17	10,60
Castanha do Pará	3,42	11,74	67,10	14,32	2,33
Avelã	5,31	16,70	60,75	14,95	4,34
Castanha de caju	N.D.	30,00	46,67	16,67	6,67
Pistache	N.D.	30,00	43,33	20,00	6,67
Macadâmia	N.D.	13,16	73,68	7,89	0,00
Amêndoas	4,41	21,55	49,93	21,15	4,35

N.D: Não disponível.
Fonte: (USDA, 2019).

Desde a década de 90, muitos métodos analíticos para a determinação de resíduos de agrotóxicos foram desenvolvidos, que em seu conjunto de protocolos evitavam ser vagarosos e produzir uma grande quantidade de resíduos. Um dos fatores que podem gerar dificuldades nas análises é o grau de complexidade da matriz. Desta forma, faz-se por necessário a adição de alguns procedimentos, como etapas de limpeza (*clean-up*) que venham minimizar as interferências ocasionadas pela complexidade da matriz, ou seja, o efeito matriz (PRESTES et al., 2011).

Para a matriz noz-pecã, tem-se como dificuldade central para a determinação multiclasse de agrotóxicos em níveis traço o seu baixo teor de água e alto teor de gordura em sua composição centesimal (conforme apresentada na tabela 1), podendo causar interferências na análise. Desta forma, métodos de preparo de amostras de nozes têm sido desenvolvidos (WANG et al., 2017).

Caso estes interferentes não sejam anulados, os resultados obtidos por meio de técnicas cromatográficas poderão ser falsos negativos ou positivos. Assim, o preparo de amostra deve não somente evitar que ocorra a coeluição dos analitos com os interferentes presentes na matriz, mas também prevenir danos à coluna cromatográfica, elevando sua durabilidade, e reduzindo assim a necessidade de limpezas constantes no sistema de injeção (JARDIM, 2010).

Um conjunto de métodos tem sido desenvolvidos para auxiliar na remoção de lipídios na etapa de extração, entre os principais reportados em literatura são o método QuEChERS e extração em fase sólida dispersiva (d-SPE).

As metodologias de preparo de amostra propostos neste trabalho foram desenvolvidos com base em trabalhos da literatura para determinação multiresíduo de agrotóxicos em alimentos, como o método QuEChERS (rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro, do inglês, quick, easy, cheap, effective, rugged e safe) em suas versões método QuEChERS original desenvolvido por Anastassiades e colaboradores (2003), método QuEChERS acetato de Lehotay e colaboradores (2005), método QuEChERS citrato de Anastassiades e colaboradores (2007) e no método oficial da European Union Reference Laboratory for Pesticide Residues – EURL-FV (2011) para determinação de resíduos de pesticidas em abacate e amêndoas por cromatografia liquida e gasosa acoplada à espectrometria de massas. Este último foi escolhido devido a composição centesimal da amêndoa ser composta majoritariamente por lipídios, conforme apresentado na Tabela 1.

2.2 AGROTÓXICOS E SEUS IMPACTOS

De acordo com a legislação brasileira vigente, por meio do decreto nº 4.047, de 04 de janeiro de 2002, a qual regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, agrotóxicos são definidos como:

> Produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; bem como, as substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002).

Os agrotóxicos são classificados também conforme seu modo de ação, praga alvo, estrutura química de suas substâncias ativas e segundo os efeitos à saúde humana e ao meio ambiente (YAMASHITA, 2008). De acordo com Tsipi e colaboradores (2015), os agrotóxicos podem ser classificados conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Classificação dos agrotóxicos quanto ao seu modo de ação

Classificação	Modo de ação
Acaricida	Combate de ácaros
Algicida	Combate ou inibição de algas
Inseticida	Controle de insetos ou seu desenvolvimento
Avicida	Combate a aves
Bactericida	Combate ou inibição de bactérias em plantas ou solo
Fungicida	Combate ou controle de fungos
Herbicida	Combate ou inibição de plantas invasoras
Nematicida	Combate a nematoides
Raticida	Combate ou controle de roedores
Regulador de crescimento	Altera o desenvolvimento, florescimento ou a taxa de reprodução de uma cultura/planta

Fonte: (Tsipi et al., 2015).

O processo de regulamentação de agrotóxicos no Brasil envolve os seguintes órgãos do governo federal: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O IBAMA é responsável pela elaboração de uma biografia ambiental, na qual os potenciais poluidores do agrotóxico são avaliados. O MAPA tem por competência realizar a avaliação da eficácia do produto e seu uso na agricultura através de um dossiê agronômico (BRASIL, 2019).

Por fim, a ANVISA tem por atribuição a avaliação toxicológica do agrotóxico. Esta avaliação visa à classificação toxicológica dos agrotóxicos e seus afins quanto a sua aplicação em áreas urbanas, industriais, domiciliares, públicas ou coletiva, bem como o estabelecimento dos limites máximos de resíduos (LMRs) permitidos no Brasil (BRASIL, 2019). Estes LMRs, conforme RDC nº 4 de 18 de janeiro de 2012 da ANVISA é definida como a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico ou afim que é legalmente aceita no alimento, por meio de apropriada aplicação numa fase específica da cultura até o seu consumo. O LMR é expresso em µg kg^{-1} ou mg kg^{-1}. O seu estabelecimento no Brasil conforme o Decreto nº 4.074/02, em seu Artigo 2º é de competência do Ministério da Saúde.

Na União Europeia (EU), os LMRs são deliberados após uma extensa avaliação das propriedades do ingrediente ativo e seus metabólitos, além da utilização pretendida do pesticida, aos quais os alimentos importados também estão subordinados. Este estabelecimento dos resíduos de agrotóxicos que são legalmente permitidos em alimentos ou em alimentos para animais, está em concordância com as boas práticas agrícolas e na menor exposição ao consumidor. No ano de 2015, das cerca de 84.000 amostras de alimentos coletadas em 28 países membros da EU, 97% estavam em conformidade com limites legais europeu de resíduos (EFSA, 2018).

Os resíduos de agrotóxicos advindos da aplicação de agrotóxicos em culturas podem acarretar riscos à saúde pública. Diante desta problemática, a EU, por meio da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) tem estabelecido um quadro legislativo abrangente para estipular regras para a aprovação de ingredientes ativos utilizados em formulações, sua forma de aplicação e seu LMR no alimento (EFSA, 2018). Na Europa, os LMRs para agrotóxicos são monitorados de forma contínua pela EFSA nos países membros da EU e são alterados conforme novas informações e dados são inseridos em seu sistema. Quando a utilização de

agrotóxicos não é autorizada a uma cultura, os LMR são fixados num nível adequadamente baixo para proteger o consumidor da ingestão de resíduos não autorizados ou em quantidade além do regulamentado. Tem-se estabelecido pelo mesmo órgão europeu o valor padrão em 0,01 mg kg^{-1}, levando-se também em consideração os métodos analíticos de rotina disponíveis e/ou a proteção do consumidor (THE EUROPEAN PARLIAMENT, 2005).

Os agrotóxicos têm sido aplicados majoritariamente em variadas culturas para prevenir a ação de ervas daninha e pestes que possam interferir no desenvolvimento da produção agrícola. Mas a utilização dos agrotóxicos de forma indiscriminada e em não conformidade com as instruções da bula de cada produto pode ocasionar em problemas ambientais e a saúde humana (MARTINS et al., 2017; VIEIRA et al., 2017). O mercado brasileiro de agrotóxicos apresentou um consumo expressivo, onde de acordo com dados atualizados do IBAMA referentes ao ano de 2014. A produção de agrotóxicos em território nacional foi de aproximadamente 409.260,90 toneladas de produtos formulados e 139.323,22 toneladas de produtos importados (IBAMA, 2016). Na Tabela 3 são apresentados os limites máximos de resíduos permitidos para a cultura noz-pecã com base na legislação brasileira através da ANVISA e da União Europeia para os 49 compostos avaliados neste trabalho.

Tabela 3 – Classificação dos agrotóxicos quanto ao grupo químico, composto, modo de ação e limites máximos de resíduos permitidos para a cultura noz-pecã estabelecidos pela ANVISA e Comissão da União Europeia (EU)

(continua)

Grupo Químico	Composto	Modo de ação	LMR (µg kg^{-1})	
			ANVISA	EU
Organofosforados	Diazinona	I A	N.A.	20
	Dimetoato	I A	N.A.	10
	Fentiona	I A	50	20
	Mecarbam	I A	N.A.	10
	Monocrotofós	I A	N.A.	20
	Paraoxon etilico	I A	N.A.	N.A.
	Piridafentiona	I A	N.A.	N.A.
	Pirimifós-metilico	I A	N.A.	10
	Profenofós	I A	N.A.	20
	Triazofós	I A N	N.A.	10
	Vamidotiona	I A	N.A.	N.A.
Triazinas	Atrazina	H	N.A.	50
	Cianazina	H	N.A.	N.A.
	Terbutilazina	H	N.A.	50
Estrobilurina	Azoxtrobina	F	N.A.	10
	Trifloxistrobina	F	N.A.	20
	Piraclostrobina	F	N.A.	20
Carbamato	Carbaril	I R	N.A.	20
	Carbofurano	I A N	N.A.	20
	Carbofurano-3 hidróxido	I A N	N.A.	20
	Iprovalicarbe	F	N.A.	20
	Oxamil	I A N	N.A.	10
Triazois	Bitertanol	F	N.A.	20
	Bromuconazol	F	N.A.	50
	Difenoconazol	F	N.A.	50
	Epoxiconazol	F	N.A.	50
	Paclobutrazol	F R	N.A.	20
	Propiconazol	F	N.A.	20

N.A.: Não Aplicável para a cultura noz-pecã. F: Fungicida. A: Acaricida. I: Inseticida. N: Nematicida. R: Regulador de crescimento.

Fonte: (IUPAC, 2018; BRASIL, 2019; CODEX ALIMENTARIUS, 2018; EU COMISSION, 2018).

Tabela 3 – Classificação dos agrotóxicos quanto ao seu modo de ação, grupo químico, classe e limites máximos de resíduos permitidos para a cultura noz-pecã estabelecidos pela ANVISA e Comissão da União Europeia

(Conclusão)

Grupo Químico	**Composto**	**Classe**	**LMR (µg kg^{-1})**	
			ANVISA	**EU**
Carboxamida	Boscalida	F	N.A.	50
	Flutalonil	F	N.A.	10
Neonicotinoide	Imidacloprido	I	N.A.	50
	Tiametoxam	I	N.A.	20
	Tiacloprido	I	N.A.	20
Benzimidazol	Carbendazina	F	N.A.	100
	Tiofanato metílico	F	N.A.	20
Uréia	Monolinuron	H	N.A.	20
	Linuron	H	N.A.	50
Pirazol	Fipronil	I	N.A.	5
Isoxazolidinona	Clomazona	H	N.A.	20
Oxatina	Carboxim	F	N.A.	50
Metilcarbamato de fenila	Metiocarbe	I	N.A.	200
Fosforotioato de heterociclo	Pirazofós	I F	N.A.	20
Dimetilcarbamato	Pirimicarbe	I	N.A.	20
Imidazolilcarboxamida	Procloraz	F	N.A.	100
Benzamida	Mepronil	F	N.A.	20
	Propizamida	H	N.A.	10
Metilcarbamato de fenila	Propoxur	I	N.A.	50
Imidazol	Triflumizol	F	N.A.	10
Fenilamina	Metalaxil	F	N.A.	10

N.A.: Não Aplicável para a cultura noz-pecã. F: Fungicida. A: Acaricida. I: Inseticida. N: Nematicida. R: Regulador de crescimento.

Fonte: (IUPAC, 2018; BRASIL, 2019; CODEX ALIMENTARIUS, 2018; EU COMISSION, 2018).

2.3 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM NOZ-PECÃ

2.3.1 Técnicas cromatográficas para determinação de resíduos de agrotóxicos em noz-pecã

A análise de resíduos de agrotóxicos tem se tornado um grande desafio devido a fatores como o grande número de agrotóxicos e seus metabólitos existentes, e aos seus baixos níveis de concentração em diferentes matrizes e *commodities*. Mundialmente, os métodos para a determinação destes compostos têm sido elaborados por meio de técnicas como a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (TSIPI et al., 2015).

Através da cromatografia gasosa, a amostra é vaporizada e carreada pela fase móvel gasosa e seus componentes são separados por meio de sua interação com uma fase estacionária (a qual pode ser líquida ou sólida) contida em uma coluna. Esta técnica é aplicada à análise de compostos voláteis ou volatizáveis, as quais também sejam termicamente estáveis. A cromatografia líquida em seu sistema, utiliza colunas preenchidas com materiais que promovem separações e análises quantitativas de uma ampla variedade de compostos, em uma determinada faixa de tempo, em conjunto com uma fase móvel líquida sob elevadas pressões (COLLINS et al., 2006).

As técnicas cromatográficas podem ser combinadas a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. Os sistemas de detecção medem de forma contínua uma propriedade física ou físico-química do analito, o traduzindo sob a forma de um sinal analítico. Este sinal é gerado assim que o eluente sai da coluna cromatográfica e chega ao detector (COLLINS et al., 2006).

Os detectores que são mais aplicados às técnicas cromatográficas são detector por impacto de elétrons (ECD), detector por fotometria de chamas (FPD), detector por fotometria de chama pulsada (PFPD) e detector de nitrogênio-fósforo (NPD) para a cromatografia gasosa. Para cromatografia líquida são aplicados detectores por arranjo de diodos (DAD) e por fluorescência. Estes detectores apresentam especificidade limitada, apresentando menos aplicações quando comparada a espectrometria de massas (MS). Esta última pode ser acoplada a ambas as técnicas cromatográficas (GC e LC) para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Este último atua na quantificação e identificação dos analitos, obtendo também informações estruturais

e massa molar do analito, possuindo um aumento adicional da seletividade (SANTE, 2017).

A espectrometria de massas (MS) tem sido amplamente utilizada para determinação de resíduos de agrotóxicos juntamente com seus metabólitos em diversas matrizes, para averiguação de contaminação de agrotóxicos e na elucidação de metabólitos e/ou produtos de degradação desconhecidos, sendo que estes em alguns casos podem apresentar maior toxicidade que o composto de origem (TSIPI et al., 2015).

O sistema de detecção por espectrometria de massas pode ser encontrado nas configurações *single* ou triplo quadrupolo, trapeamento de íons (do inglês *ion trap*) e tempo de voo (do inglês *time of flight*). O princípio básico da técnica é a formação de íons de compostos orgânicos através de fontes de ionização, para posteriormente separá-los. Esta separação ocorre através de suas razões massa/carga (m/z), sendo posteriormente detectadas seja qualitativamente bem como quantitativamente (GROSS, 2004; CHIARADIA et al., 2009; SANTE, 2017).

Para a cromatografia gasosa os modos de ionização que obtiveram maior eficiência, sendo amplamente empregadas ao acoplamento com a espectrometria de massas são o impacto eletrônico (EI) e a ionização química (CI), as quais operam a baixas pressões. Com relação à cromatografia líquida, estes modos de ionização não se apresentaram eficientes devido às diferenças entre as fases móveis empregadas em ambas as técnicas cromatográficas (LANÇAS, 2009).

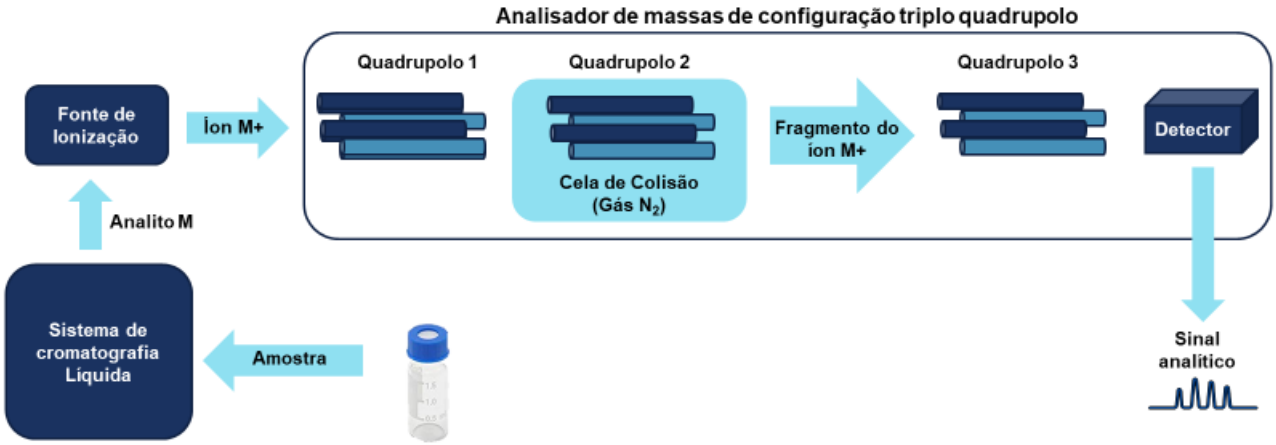
As fontes de ionização que apresentaram um acoplamento de maior eficiência com o sistema LC-MS produzem íons a pressão atmosférica. As mais utilizadas são ionização por eletronebulização (ESI), do inglês *electrospray ionization*; ionização química à pressão atmosférica (APCI), do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*; e ionização por fótons à pressão atmosférica (APPI), do inglês *atmospheric pressure photon ionization*, respectivamente (LANÇAS, 2009).

A ionização por eletronebulização é o modo de ionização mais aplicado ao sistema LC-MS. Este modo consiste na formação de íons a pressão atmosférica, onde uma amostra dissolvida em um solvente é pressurizada em um tubo capilar, sob uma voltagem entre 3000 e 5000 volts. Desta forma o eluente da coluna se transforma em um aerossol, e os analitos são dessolvatados, e seus íons são induzidos ao espectrômetro de massas. O mecanismo desta fonte de ionização se fundamenta na “explosão” coulômbica, onde à medida que as gotículas de solvente são evaporadas,

a carga do analito permanece inalterada. Mas como a tensão superficial das gotículas é incapaz de se oporem às forças repulsivas resultantes de carga opostas, elas explodem em muitas gotículas menores. Isto ocorre até que apenas um íon do analito permaneça, até que completamente dessolvatado, seja formado um íon em fase gasosa. Este processo de dessolvatação é auxiliado também por meio de um fluxo de gás seco, o qual o gás nitrogênio é amplamente utilizado (LANÇAS, 2009).

A configuração do analisador de massas do tipo triplo quadrupolo é a presença de três quadrupolos em série. O segundo quadrupolo não possui por finalidade a separação de íons de razão m/z específica, mas atua como uma cela de colisão. Nesta cela de colisão, uma fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo é promovida através de uma dissociação induzida por colisão com um gás inerte (CID, do inglês *collision-induced dissociation*), sendo também utilizado para o direcionamento destes íons, também chamados de íons filhos ou precursores ao terceiro quadrupolo. Em ambos os quadrupolos, tem-se o controle para realizar a transmissão de íons com uma única razão m/z ou de um grupo de razões m/z para obter-se um sinal analítico (HOPFGARTNER et al., 2004; CHIARADIA et al., 2008). Na Figura 5 tem-se a ilustração da configuração de um sistema de cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas em série do tipo triplo quadrupolo.

Figura 5 – Configuração de um sistema de Cromatografia Líquida acoplada a um espectrômetro de massas em série do tipo triplo quadrupolo



Fonte: (Adaptado de HOPFGARTNER et al., 2004).

Dentre as técnicas de operação para obtenção do espectro de massas em MS/MS, estão varredura completa (do inglês *full scan*), Monitoramento do Íon

Selecionado (SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring*), Varredura do Íon Produto, Varredura do Íon Precursor e Monitoramento Seletivo de Reações (SRM, do inglês *Select Reaction Monitoring*).

No modo de varredura SRM é monitorada a fragmentação de um íon precursor selecionado no Q1 e seus correspondentes íons produto que são filtrados em Q3. Este método permite que o equipamento focalize apenas o precursor e o produto, aumentando a sensibilidade para o monitoramento, associado ao aumento na seletividade (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010).

2.3.2 Preparo de amostra para análise multirresíduo de agrotóxicos

O preparo de amostra é uma etapa crítica na determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos. Inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos de forma a encontrar condições eficientes para promover tal determinação de diferentes compostos.

Na Tabela 4, estão resumidos diferentes métodos de determinação de agrotóxicos em matrizes que apresentam composição centesimal semelhante a noz-pecã conforme apresentada na Tabela 1 encontradas na literatura.

Tabela 4 – Revisão da literatura acerca de métodos de análise de agrotóxicos em matrizes semelhantes a noz-pecã

(Continua)

Matriz	Método de extração	Etapa de limpeza	Agrotóxicos	Técnica	Referência
Noz e amêndoas	5 g de amostra +15 mL de MeCN (0,1%, v/v, ácido fórmico) com digestão da amostra em micro-ondas; Partição com 1,5 g de $MgSO_4$ e 1,0 g de NaCl seguido de centrifugação	*Freezing-out* por 24 min a -24 ºC; seguido de d-SPE com alíquota de 5 mL e 250 mg de PSA, 250 mg de C18 e 500 mg $MgSO_4$; centrifugar; evaporação até a secura com N_2 de 3 mL do extrato em banho maria a 40 °C; Reconstituição em 1 mL água (0,1%, v/v, de ácido fórmico) e MeCN (1:1 v/v)	106 agrotóxicos	UHPLC-MS/MS	Wang et al., 2017
Amêndoas	5 g de amostra+ 5 mL de água +10 mL de acetonitrila; partição com sais de QuEChERS citrato seguido de centrifugação	d-SPE com alíquota de 5 mL de extrato, 175 mg Z-Sep e 750 mg MgSO4; centrifugar; evaporação até a secura com N_2 de 200 µL do extrato; reconstituição em 200 µL de acetonitrila e 500 µL de água	92 agrotóxicos	LC-MS/MS	Rajski et al., 2013
Amêndoas	5 g de amostra+ 5 mL de água +10 mL de acetonitrila; partição com sais de QuEChERS citrato seguido de centrifugação	d-SPE com alíquota de 5 mL de extrato com 175 mg de Z-Sep e 750 mg $MgSO_4$; centrifugar; evaporação até a secura com N_2 de 250 µL do extrato; reconstituição em 200 µL de acetonitrila e 300 µL de água (LC-MS/MS) ou evaporação até a secura com N_2 de 100 µL do extrato; reconstituição em 50 µL de acetato de etila (GC-MS/MS)	286 agrotóxicos	LC-MS/MS e GC-MS/MS	EURL-FV, 2011
Noz-pecã, amêndoas e pistache	20 g de amostra+ 200 mL de metanol; Evaporação de 5 g de alíquota do extrato a 35 °C; Partição com 2 vezes com hexano; evaporação até secura	Uso de GPC e Cartucho SPE de Florisil® (condicionado com hexano). Eluição com 5 mL de hexano:acetato de etila (90:10, v/v); Evaporar até a secura e reconstituir em acetato de etila	Pendimetalina	GC-NPD	Engebretson et al., 2001

Tabela 4 – Revisão da literatura acerca de métodos de análise de agrotóxicos em matrizes semelhantes a noz-pecã

(continuação)

Matriz	Método de extração	Etapa de limpeza	Agrotóxicos	Técnica	Referência
Noz europeia e noz	25 g de amostra + 50 mL de ACN foram misturados por 2 min. Solvente de extração filtrado + 7 g de NaCl misturado por 1 min. Após 10 min de repouso, 25 mL da fase ACN foi evaporada perto da secura em um rotaevaporador a 40 °C	Organofosforados: Extrato reconstituído em 2 mL de acetona. Organoclorados e piretroides: Etapa de purificação - 10 mL de ACN evaporada perto da secura em um rotaevaporador à 40 °C. Extrato reconstituído em 2 ml de hexano, carregado em um cartucho SPE de Florisil®, eluído com 5 mL 10% acetona/hexano. O eluente foi evaporado perto da secura em um rotaevaporador à 40 °C. O eluente foi reconstituído em um volume final de 2 mL de hexano	36 agrotóxicos	GC-FPD (para organofosforados) e GC-ECD (para organoclorados e piretroides)	Liu et al., 2016
Pistache, amendoim, noz, avelã	2,5 g de amostra+ 5 mL de acetato de etila + 2 g de sulfato de sódio anidro, seguido da filtração do extrato	-	Diazinona, clorpirifós-metílico, fenitrotiona, malationa, clorpirifós, parationa, fentoato clorfenvinfós, metidationa, etiona	RPLC-GC	Cortes et al., 2008
Pistache	10 g de amostra (pistache cru, maduro e processado) + adição de água gelada (0, 5 e 10 mL somente para as amostras cruas), foram misturadas e deixadas em temperatura ambiente por 2h. Após, foram utilizados os kits de sais de QuEChERS	4 mL do sobrenadante + kit I (150 mg of PSA) e II (150 mg of PSA e 15 mg of GCB) de clean-up. 1,5 mL do sobrenadante foi seco com N_2 e reconstituído em 0,5 mL de fase móvel (50% A+ 50% B) A: 0,1 % ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônia em metanol, pH=2,85 B: 0,1 % de ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônia em metanol, pH=4,85	Acetamiprido, imidacloprido, espirotetramato e seus metabólitos	LC-MS/MS	Farajia et al., 2018
Noz europeia	2 g de amostra+ 20 mL de acetonitrila; Evaporação extrato à 40 °C; Reconstituição com 5 mL da mistura de cicloexano + acetato de etila (1:1, v/v)	Uso de Gel de permeação cromatográfica	18 pesticidas da classe dos carbamatos	UPLC-MS/MS	Lin et al., 2010

Tabela 4 – Revisão da literatura acerca de métodos de análise de agrotóxicos em matrizes semelhantes a noz-pecã

(conclusão)

Matriz	Método de extração	Etapa de limpeza	Agrotóxicos	Técnica	Referência
Castanha de caju	1 g de amostra + 0,5 g de Florisil®; cartucho SPE com 3 g de sulfato de sódio 0,5 g e sílica gel. Eluição com 40 mL de acetato de etila. Eluato seco à 40-45°C e o volume final 2 mL. SPE: 25 g amostra + 50 mL de acetato de etila. Mexido por 30 min, filtrado e lavado com 30 mL de acetato de etila. Extrato evaporado até 1 mL	SPE Clean-up: coluna de alumina-sílica gel. Eluição: 10 mL acetato de etila	Diazinona, malationa, parationa, metidationa, pirazofós e permetrina	GC-ECD	Dorea e Lanças, 1999
Pistache	10 g de amostra 10 mL de acetonitrila; Partição com sais de QuEChERS original seguido de centrifugação	O extrato foi percolado em coluna cromatográfica de sílica gel C18	Acetamiprido	LC-MS/MS	Mahmoudabadi et al., 2017
Pistache	0,5g de amostra + 1 g de diferentes adsorventes (C18, ciano, fenil e amino) e Cartucho SPE. Eluição com 10 mL da mistura de diclorometano-etlacetato (50:50, v/v)	-	Diazinona e etiona	GC-NPD	Husain et al., 2003
Castanha caju, noz, amêndoa e pistache	3 g da fruta seca moída + 15 mL de éter de petróleo. 10 min agitação. Filtração do extrato em filtro de papel. Extração líquido-líquido	Coluna empacotada com carvão e sílica gel. Após, o extrato foi evaporado até a secura e reconstituído em hexano	HCH, DDT e Endosulfan	GC-ECD	Pandey et al., 2010
Avelã	10 g de amostra + 10 mL de ACN. Nova extração com mais 10 mL	-	116 agrotóxicos	LC-orbitrap MS	Shi et al., 2011
Noz europeia	1 g de amostra + 1 mL de água por 30 min. Após, 10 mL de ACN. Repetiu-se 3 vezes a extração com 10 mL de ACN e os solventes de extração foram combinados. Fase orgânica foi separada, seca com sulfato de sódio anidro durante 30 min, e depois concentrado para cerca de 4 mL à 50 °C	SPE: Cartucho de Carbono: Eluição com 5 mL de ACN; Eluente foi evaporado e reconstituído em 10 mL de água. SPE: Cartucho Oasis HLB: Condicionamento: 5 mL de metanol; Eluição: 5 mL de água ultrapura (duas vezes). Eluato foi evaporado até a secura à 50°C e reconstituído em 2 mL de fase móvel	Dinotefurano, tiametoxam, clotianidina, imidacloprido, acetamiprido e tiacloprido	LC-MS/MS	Shi et al., 2011

2.3.2.1 Método QuEChERS

Desenvolvido por ANASTASSIADES e colaboradores em 2003, o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged* e *Safe*) foi aplicado com sucesso para extração de agrotóxicos em cereais, frutas, vegetais entre outros. Baseia-se em etapas de extração com a utilização de acetonitrila, seguida de partição promovida pela utilização de sais como sulfato de magnésio e cloreto de sódio (ANASTASSIADES et al, 2003; LEHOTAY et al., 2010; RASCHE et al., 2015; WANG et al., 2017). No entanto, devido à eficácia do método, ao longo dos anos, foi utilizado em outras aplicações para diferentes tipos de analitos e matrizes (frutas, vegetais, cereais, mel, especiarias, leite, ovos, carne bovina) e modificações ao método (PAVKOVICH e BELL, 2018). O procedimento empregado é baseado em três passos centrais, (1) adição de 10 mL de acetonitrila em 10 g de amostra para a extração dos analitos; (2) adição 4 g de $MgSO_4$ e 1 g de NaCl para a partição; (3) uma Extração em Fase Sólida Dispersiva (d-SPE) utilizando 25 mg de PSA e 150 mg de $MgSO_4$ para a limpeza do extrato. (MAYOR et al., 2019). A Figura 6 apresenta um diagrama simplificado do procedimento normalmente utilizado para o método QuEChERS (KIM et al., 2019).

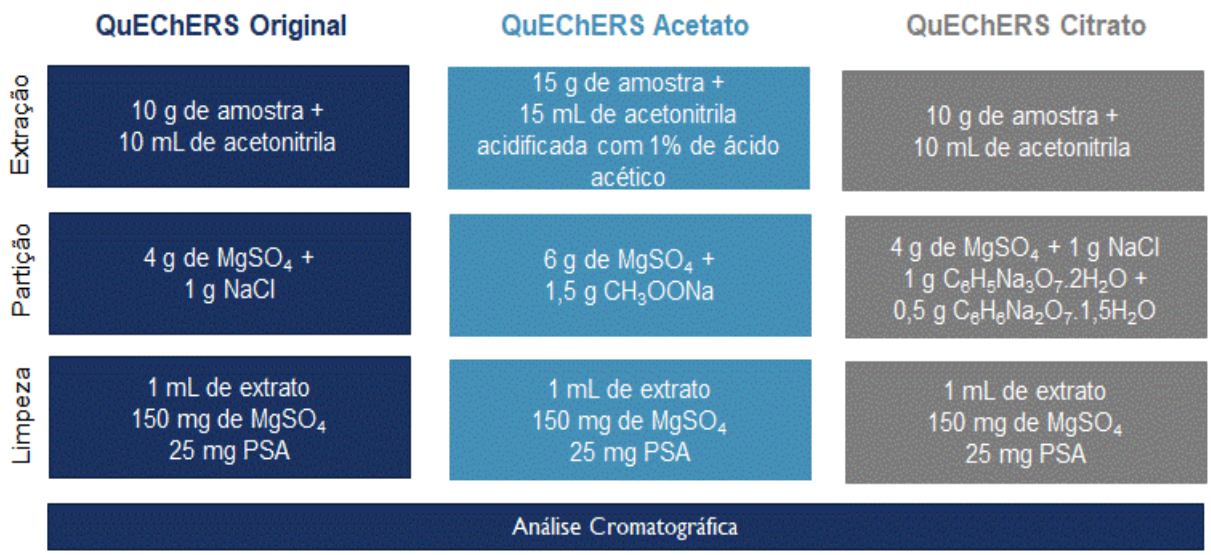
Figura 6 - Representação das etapas do método QuEChERS

Fonte: (Adaptado de Kim et al., 2019).

A utilização de acetonitrila possibilita a extração de uma ampla gama de pesticidas de vários alimentos e de matrizes ambientais (por exemplo, solo e sedimento). A acetonitrila leva a uma menor extração de coextrativos como compostos lipofílicos, ceras, lipídios e pigmentos do que outros solventes, além de ser adequada para o sistema LC-MS/MS e GC-MS/MS (KIM et al., 2019).

A fim de evitar a ionização ou degradação de alguns analitos devido a alterações no pH durante a extração, duas modificações do método QuEChERS original foram desenvolvidas: o método QuEChERS acetato e citrato. No método QuEChERS citrato criado por Anastasiades e colaboradores (2007) utiliza-se um tampão citrato com a adição de 1 g de citrato trissódico di-hidratado e 0,5 g de hidrogenocitrato de sódio sesqui-hidratado. No método QuEChERS acetato desenvolvido por Lehotay e colaboradores (2005) emprega-se um tampão de acetato com a adição de 1,5 g de acetato de sódio. Na Figura 7 tem-se as etapas empregadas bem como os principais componentes. Com os tampões, ambos os métodos produzem um solvente de extração com um pH em torno de 5, que é adequado para a extração de compostos que dependem do pH (por exemplo, pimetrozina, diclofluanida, clorotalonil e folpet). Estes métodos foram extensivamente estudados e são amplamente utilizados em laboratórios de todo o mundo. No entanto, a adição de um tampão não é recomendada para algumas amostras (por exemplo, com alto teor de gordura), pois esta faixa de pH pode diminuir a capacidade do PSA de reter os coextrativos (KIM et al., 2019).

Figura 7 – Quadro comparativo entre as versões do método QuEChERS original, acetato e citrato.



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

No método QuEChERS original, a partição entre as fases é bem-sucedida com a utilização de sulfato de magnésio e cloreto de sódio, devido as suas características particulares. A reação de hidratação do sulfato de magnésio é exotérmica, aumentando a temperatura do meio (aprox. 40-45 ºC), corroborando na eficiência na extração de pesticidas apolares. O cloreto de sódio melhora a recuperação dos compostos polares além de reduzir a quantidade de coextrativos no extrato devido ao efeito "*salting out"* (PRESTES et al., 2011; KIM *et al.*, 2019).

A técnica d-SPE, vem sendo aplicada na etapa limpeza, após aplicação do método QuEChERS. São utilizados sorventes para possibilitar a remoção de coextrativos no extrato (como lipídios, ácidos entre outros), que atuam como interferentes nas análises multiclasse de resíduos de agrotóxicos devido à alta complexidade da matriz (GARCÍA-REYES et al., 2007; OSHITA & JARDIM, 2014; TUZIMSKI & REJCZAK, 2016).

Outros fatores também são favoráveis ao emprego da técnica d-SPE como a simplicidade de execução, menor consumo de solventes e sorventes e possibilidade na combinação de diferentes sorventes quando comparada a técnica SPE, de extração em fase sólida com o uso de cartuchos e *manifold* (PRESTES et al., 2011).

Existem diferentes sorventes para a etapa de limpeza d-SPE, sendo a amina secundária primária (PSA), octadecilsilano (C18) e carbono grafitizado (GCB) os mais relatados na literatura. O PSA é normalmente utilizado para a remoção de ácidos graxos, açúcares, ácidos orgânicos, lipídios e alguns pigmentos, enquanto o C18 é eficaz para a remoção de lipídios e GCB para pigmentos coextraídos, nomeados carotenoides e clorofila, típicos de matrizes altamente pigmentadas (por exemplo, vegetais de folhas verdes). Mas o uso de GCB deve ser cauteloso, pois pode remover pesticidas de estruturas planares em sua estrutura (PERESTRELO et al., 2019).

O PSA (etilenodiamino-N-propilsilano) atua como um trocador iônico. Ele também pode interagir por ligação de hidrogênio ou dipolo-dipolo com outros compostos. Sua estrutura bidentada apresenta um alto poder quelante, o que confere sua ação na retenção de diferentes coextrativos, tal como ácidos graxos. Em geral, uma quantidade de 25 ou 50 mg de PSA são aplicados em etapas de limpeza para cada 1 mL de extrato (MASTOVSKA et al., 2010; PRESTES et al., 2011).

Além disso, outros tipos de sorventes estão continuamente sendo utilizados para ampliar a gama de aplicações do método QuEChERS, exemplos são EMR-lipid®, Z-

sep e quitosana. Assim, é importante a escolha de sorventes que permitem uma limpeza eficaz do extrato além de promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos no sistema cromatográfico (PERESTRELO et al., 2019)

O sorvente terra diatomácea, a qual também é chamada de sílica amorfa, tem por fator positivo o seu baixo custo de aquisição, com alta área superficial. Possui aplicações em métodos de preparo de amostra por MSPD, apresentando resultados similares ao uso de sorventes como C18 (CABRERA et al., 2016).

Um dos sorventes disponíveis no mercado para aplicação como d-SPE é o Enhanced Matrix Removal-Lipid® (EMR-Lipid®) do fornecedor Agilent Technologies, que tem apresentado resultados satisfatórios em análises de resíduos de agrotóxicos em matrizes altamente complexas como abacate, azeite de oliva, tecido animal entre outras, com remoção de 92% de interferentes (AGILENT TECHNOLOGIES, 2015; AGILENT TECHNOLOGIES, 2016).

A estrutura do EMR-Lipid® é desconhecida devido ao período de patente do fabricante. Mas tem-se o conhecimento de que ele não atua como um adsorvente sólido como uma d-SPE, mas dissolve a saturação presente no extrato. Este mecanismo envolve tanto a exclusão de moléculas por seu tamanho como também por interações hidrofóbicas, onde hidrocarbonetos de cadeia longa associados aos lipídios se encaixam na estrutura EMR-Lipid®, levando a formação do complexo lipid-EMR-Lipid, o qual é precipitado na solução ou permanece na fase aquosa no final da etapa *salting-out* (HAN et al., 2016).

Outro sorvente, que também pode atuar como d-SPE combinado ao método QuEChERS é o Z-Sep e Z-Sep+, que são nanopartículas de zircônio estabilizadas com óxido de ítrio (ZrO_2/ Y_2O_3) e C18, em proporções 2/5, que apresentam em sua estrutura uma alta área superficial, de 4100 m² por grama, podendo ser obtidos excelentes resultados em etapas de limpeza de extratos analisados de agrotóxicos em matrizes que apresentam grande quantidade de óleos em sua composição. A sua aplicação tem apresentado resultados superiores a sorventes já utilizados na área como PSA e C18 (RAJSKI et al., 2013; UCLÉS et al., 2015; MERCK, 2018).

Em métodos mais antigos, o Florisil® era muito empregado sob a forma de cartuchos para percolação de extratos, mas atualmente tem sido aplicado em etapas de d-SPE para limpeza de extratos de matrizes oleaginosas. É composto de silicato de magnésio, sendo a sílica um sorvente amplamente aplicado em cromatografia com

aplicações conhecidas na separação de componentes hidrofóbicos como ácidos graxos e aldeídos. O Florisil® apresenta propriedades semelhantes a sílica (COLLINS et al., 2006; PRESTES et al., 2011).

O sorvente quitosana (β-(1→4) D-glucosamine) é um biopolímero obtida através do processo de desacetilação da quitina (β-(1→4) N-acetyl-D-glucosamine). A quitina, naturalmente encontrada exoesqueletos de insetos e crustáceos, é encontrada de forma abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose. Este sorvente tem sido aplicado em etapas de limpeza, apresentado resultados satisfatórios com baixo custo (WESKA et al., 2007; ARIAS et al., 2014).

2.4 Validação

A validação de métodos analíticos tem por objetivo apresentar evidencias que um determinado método é adequado para uma finalidade específica (INMETRO, 2016). Esta validação de método deve se apresentar abrangente, de forma a contemplar todas as necessidades da tal aplicação, por exemplo, desde a amostragem ao resultado experimental (ISO/IEC 17025, 2017).

Este processo de validação pode compreender um conjunto de etapas, seja do planejamento a execução, como definição do objetivo e escopo do método preterido, definição dos parâmetros de desempenho abordados, definição de critérios de aceitação, qualificação de materiais, aplicação de tratamento estatístico e promover uma análise crítica dos resultados concluindo se o método se apresenta eficiente ou não (INMETRO, 2016).

Existem diferentes guias para auxiliar na validação de métodos disponibilizados por diferentes órgãos como o INMETRO através do documento de caráter orientativo DOQ-CGCRE-008 sobre validação de métodos analíticos revisado em 2016. Outro órgão brasileiro que dispõe de documentos orientativos para a validação de métodos é a ANVISA por meio da resolução da diretoria colegiada RDC Nº 166 publicada em 2017 (INMETRO, 2016; BRASIL, 2017).

Alguns órgãos internacionais também disponibilizam guias de validação como, por exemplo, *Codex Alimentarius* por meio da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura e SANTE (Saúde e Proteção do Consumidor, do francês

Santé et protection des consommateurs) por meio da comissão europeia para saúde e segurança alimentar.

Os critérios em geral para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos estão relacionados a parâmetros como curva analítica e faixa linear de trabalho, seletividade, exatidão, precisão (repetitividade e precisão intermediária), efeito matriz e limites de detecção e de quantificação. Na Tabela 5 está resumida a definição de cada um dos critérios citados.

Tabela 5– Critérios de avaliação na etapa de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos

Critério	**Definição**	**Aplicação**
Efeito Matriz	Influência dos componentes da matriz no sinal analítico	Comparação entre curvas em solvente e em extrato branco da matriz
Exatidão	Grau de concordância entre resultados diferentes de um ensaio e o valor de referência	Ensaios de fortificação
Faixa linear de trabalho	Intervalo de concentrações em que x e y se correlacionam linearmente com precisão, exatidão e linearidade adequadas	Curva analítica ($y = ax + b$)
Linearidade	Propensão em obter resultados que sejam diretamente proporcionais às concentrações dos analitos na amostra	Coeficiente de determinação (r^2)≥ 0,99
Limite de detecção	Menor concentração do analito que pode ser detectada	Sinal/ Ruído = 3
Limite de quantificação	Menor concentração do analito que pode ser quantitativamente determinado	Sinal/ Ruído = 10
Precisão	Grau de dispersão de resultados entre ensaios diferentes	Repetibilidade e Reprodutibilidade
Seletividade	Estimar o grau de interferência na quantificação do analito na presença de outros analitos	Extração de matriz "branco"

Fonte: (INMETRO, 2016; BRASIL, 2017; SANTE, 2017).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento e validação do método QuEChERS modificado com a finalidade de extrair e determinar resíduos de agrotóxicos em amostras de noz-pecã empregando LC-MS/MS. Todo o desenvolvimento deste estudo 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 no desenvolvimento deste trabalho foram:

- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3 (Millipore, EUA);
- Centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- Centrífuga refrigerada SL 703 (Solab, Brasil);
- Agitador Vortex – Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- Balanças analíticas de precisão UX-420H e APX-200 (Shimadzu, Japão);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- Moinho IKA, modelo A 11 basic (IKA, Brasil);
- GC-MS/MS Intuvo 9000 (Agilent Technologies, EUA);
- Sistema LC-MS/MS Varian (EUA) equipado com:
  - Cromatógrafo a líquido com bomba binária 212-LC, forno para coluna e sistema de desgaseificação;
  - Detector MS, 320-MS triplo quadrupolo (TQ) mass spectrometer, utilizando o modo de ionização por eletronebulização (*electrospray*);
  - Amostrador automático ProStar 410;
  - Sistema de aquisição de dados através do software MS Workstation versão 6.9.2;
  - Coluna analítica Pursuit UPS C_{18} (100 x 2,0 mm d.i.) com 2,8 µm de tamanho de partícula (Varian, EUA);
  - Sistema gerador de nitrogênio LC/MS 12/2 (Domnick Hunter, Inglaterra).

3.2 REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS UTILIZADOS

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

- Acetato de amônio (Merck, Alemanha);
- Acetato de sódio anidro (J. T. Baker, EUA);
- Acetonitrila, grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Ácido acético glacial 100% (J. T. Baker, EUA);
- Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3R, resistividade de 18,2 MΩ cm (Millipore, França);
- Bond Elut EMR-lipid (Agilent, EUA);
- Citrato de sódio di-hidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- Cloreto de sódio p.a. (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- Filtros de PTFE de 0,22 µm (Analítica, Brasil);
- Florisil® 60-120 mesh (J. T. Baker, EUA);
- Formiato de amônio (Sigma-Aldrich, EUA);
- Frascos de vidro (vial) com capacidade de 2 mL (Agilent, EUA);
- Hidrogenocitrato de sódio sesqui-hidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- Metanol, grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Microtubo, tipo Eppendorf de 2 mL (Axygen Scientific, EUA);
- Padrões sólidos dos compostos em estudo (Tabela 6);
- Quitosana (produzida pelo Laboratório de Operações Unitárias da Escola de Química e Alimentos da FURG, tendo como matéria prima resíduos de camarão rosa *Farfantepenaeus brasiliensis*) com d.p. de 62-76 µm (Rio Grande, Brasil);
- Sorvente Bondesil C18 com diâmetro de partícula (d.p.) 40 µm (Agilent, EUA);
- Sorvente Bondesil PSA com d.p. de 40 µm (Agilent, EUA);
- Sulfato de magnésio anidro p.a (J.T. Baker, Japão);
- Supel™ QuE Z-Sep+ (Sigma-Aldrich, EUA);
- Terra Diatomácea (Sigma-Aldrich, EUA);
- Tubos de polipropileno com 50 e 15 mL de capacidade (Sarstedt, Alemanha);
- Vidraria de laboratório.

3.3 AGROTÓXICOS SELECIONADOS

A seleção dos agrotóxicos utilizados neste estudo foi estabelecida partindo-se dos seguintes critérios:

- agrotóxicos autorizados para a cultura noz-pecã no Brasil;
- agrotóxicos autorizados no Brasil, mas não autorizados para a cultura de noz-pecã;
- compostos que estavam presentes na literatura; os quais são autorizados para a cultura por órgãos internacionais como a comissão da EU, com seus respectivos LMR.

Nesta seleção de analitos, levou-se também em consideração a disponibilidade de padrões dos compostos no LARP. Estes compostos foram adquiridos do fabricante Dr. Ehrenstorfer (Alemanha) e estão listados na Tabela 6, com suas respectivas fórmulas molecular, classe química e propriedades físico-químicas (pKa e Log Kow).

Tabela 6 - Informações dos agrotóxicos, contendo fórmula e classe química, constante de acidez (pKa) e coeficiente de partição octanol-água (Log Kow)

(Continua)

Compostos	Fórmula Molecular	Classe química	pKa	Log Kow
Atrazina	$C_8H_9D_5ClN_5$	Triazina	1,7	2,7
Azoxistrobina	$C_{22}H_{17}N_3O_5$	Estrobilurina	0,9	2,5
Bitertanol	$C_{20}H_{23}N_3O_2$	Triazol	Não dissocia	4,1
Boscalida	$C_{18}H_{12}C_{l2}N_2O$	Carboxamida	Não dissocia	2,9
Bromoconazole	$C_{13}H_{12}BrCl_2N_3O$	Triazol	2,8	3,2
Carbaril	$C_{12}H_{11}NO_2$	Carbamato	2,36	10,4
Carbendazina	$C_9H_9N_3O_2$	Benzimidazol	4,2	1,5
Carbofuran-3OH	$C_{12}H_{15}NO_4$	Carbamato	Não dissocia	1,8
Carbofurano	$C_{12}H_{15}NO_3$	Carbamato	Não dissocia	1,8
Carboxim	$C_{12}H_{13}NO_2S$	Oxatina	0,3	2,3
Cianazina	$C_3H_5N_3O$	Triazina	12,9	2,1
Clomazone	$C_{12}H_{14}ClNO_2$	Isoxazolidinona	Não dissocia	2,5
Diazinona	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	Oganofosforado	2,6	3,7
Difenoconazole	$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$	Triazol	1,1	4,4
Dimetoato	$C_5H_{12}NO_3PS_2$	Oganofosforado	2	0,3
Epoxiconazole	$C_{17}H_{13}ClFN_3O$	Triazol	Não dissocia	3
Fentiona	$C_{10}H_{15}O_3PS_2$	Oganofosforado	-	4,8
Fipronil	$C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$	Pirazol	Não dissocia	3,8
Flutalonil	C17H16F3NO2	Carboxiamida	Não dissocia	3,2

Tabela 6 - Informações dos agrotóxicos, contendo fórmula e classe química, constante de acidez (pKa) e coeficiente de partição octanol-água (Log Kow)

(conclusão)

Compostos	**Fórmula Molecular**	**Classe química**	**pKa**	**Log Kow**
Imidacloprido	$C_9H_{10}ClN_5O_2$	Neonicotinóide	Não dissocia	0,6
Iprovalicarbe	$C_{18}H_{28}N_2O_3$	Carbamato	Não dissocia	3,2
Linurom	$C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$	Uréia	12,1	3,2
Mecarbam	$C_{10}H_{20}NO_5PS_2$	Organofosforado	Não dissocia	2,3
Mepronil	$C_{17}H_{19}NO_2$	Benzanilide	-	3,7
Metalaxil	$C_{15}H_{21}NO_4$	Acilalaninato	-	1,7
Metiocarbe sulfona	$C_{11}H_{15}NO_4S$	Carbamato	Não dissocia	3,2
Monocrotofos	$C_7H_{14}NO_5P$	Uréia	-	0,2
Monolinurom	$C_9H_{11}ClN_2O_2$	Uréia	-	2,2
Oxamil	$C_7H_{13}N_3O_3S$	Carbamato	12,4	0,4
Paclobutrazol	$C_{15}H_{20}ClN_3O$	Benzanilide	-	3,1
Paraoxon etílico	$C_{10}H_{14}NO_6P$	Organofosforado	7,1	-
Piraclostrobina	$C_{19}H_{18}ClN_3O_4$	Estrobilurina	Não dissocia	3,9
Pirazofos	$C_{14}H_{20}N_3O_5PS$	Fosforotioato de heterociclo	-	3,8
Piridafentiona	$C_{14}H_{17}N_2O_4PS$	Organofosforado	-	3,1
Pirimicarbe	$C_{11}H_{18}N_4O_2$	Dimetilcarbamato	4,4	1,7
Pirimifos metilico	$C_{11}H_{20}N_3O_3PS$	Organofosforado	4,3	4,2
Procloraz	$C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$	Imidazolilcarboxamida	3,8	3,5
Profenofos	$C_{11}H_{15}BrClO_3PS$	Organofosforado	-	1,7
Propiconazole	$C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$	Triazóis	1,1	3,7
Propizamida	$C_{12}H_{11}Cl_2NO$	Benzamida	10,3	3,3
Propoxur	$C_{11}H_{15}NO_3$	Metilcarbamato de fenila	-	1,6
Terbutilazina	$C_9H_{16}ClN_5$	Triazina	2	3,2
Tiacloprido	$C_{10}H_9ClN_4S$	Neonicotinóide	Não dissocia	1,3
Tiametoxam	$C_8H_{10}ClN_5O_3S$	Neonicotinóide	Não dissocia	0,1
Tiofanato metílico	$C_{12}H_{14}N_4O_4S_2$	Benzoimidazol	7,3	1,4
Triazofos	$C_{12}H_{16}N_3O_3PS$	Organofosforado	-	3,4
Trifloxistrobina	$C_{20}H_{19}F_3N_2O_4$	Estrobilurina	Não dissocia	4,5
Triflumizole	$C_{15}H_{15}ClF_3N_3O$	Imidazol	3,7	5,1
Vamidationa	$C_8H_{18}NO_4PS_2$	Organofosforado	-	4,2

O coeficiente de partição octanol-água (Log Kow) é um indicador da lipofilicidade de um composto, por meio da razão da concentração do mesmo em equilíbrio, em um sistema de duas fases imiscíveis água e octanol, após dissolução (SILVA e FERREIRA, 2003).

3.4 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO E DO PADRÃO DE CONTROLE

A atrazina deuterada foi utilizada como padrão de controle, com o objetivo de avaliar a eficiência do procedimento de extração. Sua adição foi realizada nas amostras branco fortificada e nas amostras analisadas. A concentração empregada foi de 20 µg kg^{-1}.

Para padrão interno escolheu-se o composto trifenilfosfato na concentração de 20 µg kg^{-1} nas determinações por LC-MS/MS. Sua utilização teve por finalidade a verificação da estabilidade da resposta do equipamento através do sinal analítico.

3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

As soluções estoques utilizadas para aplicação neste estudo foram preparadas primeiramente a partir de padrões sólidos na concentração de 1000 mg L^{-1}. Estas soluções foram preparadas em solventes como acetonitrila e metanol grau HPLC.

A partir destas soluções estoque preparou-se uma mistura contendo todos os compostos na concentração de 5 mg L^{-1}, a qual foi utilizada para realizar os ensaios de fortificação e avaliar a linearidade do método. A partir desta mistura, preparou-se uma solução na concentração de 1 mg L^{-1} em solvente acetonitrila para posterior preparo das soluções de trabalho. As soluções de trabalho foram preparadas nas concentrações 2,5; 5, 10, 25, 50, 100 e 250 µg L^{-1}, em acetonitrila e no extrato da matriz branco avaliada de noz-pecã. Todas as soluções analíticas foram condicionadas em frascos âmbar e a temperaturas abaixo de -10 °C.

3.6 SISTEMA LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM NOZ-PECÃ

3.6.1 Escolha da fase móvel

A fase móvel utilizada neste estudo foram a fase aquosa (A) formiato de amônio 5 mmol L^{-1} e a fase orgânica (B) metanol. Na Tabela 7 está disposto o gradiente aplicado a corrida cromatográfica com um tempo final de corrida de 33 minutos, sob

vazão de 150 µL min^{-1}. O uso de formiato de amônio como aditivo a fase móvel A auxilia na formação de adutos que auxiliam na melhor detecção do analito, melhorando a detecção do composto no espectrômetro de massas (MARTINS et al., 2014; DONATO et al., 2015).

Tabela 7 – Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de agrotóxicos em noz-pecã no sistema LC-MS/MS.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
2	90	10
4	55	45
16	10	90
19	5	95
25	5	95
25,06	2	98
30	2	98
33	90	10

3.6.2 Condições utilizadas no sistema LC-MS/MS

As condições do sistema LC-MS/MS aplicadas com finalidade de estabelecer um método para a determinação dos agrotóxicos em amostras de noz-pecã estão descritas a seguir.

- Temperatura da fonte: 50 °C
- Temperatura da coluna: 30 °C
- Temperatura de dessolvatação: 250 °C
- Pressão gás de nebulização: 20 psi
- Pressão gás de dessolvatação (N_2): 40 psi
- Pressão gás de colisão (argônio): 1,8 mTorr
- Volume de injeção: 10 µL

A espectrometria de massas em série atuou no modo de monitoramento SRM com ionização por eletronebulização no modo positivo e negativo. As soluções analíticas padrão de cada analito foram infusionadas individualmente no espectrômetro de

massas. Após a infusão, foram definidos os íons característicos para cada analito, energias de colisão e voltagem do capilar. Os íons monitorados com a finalidade de identificação e quantificação foram determinados após a demarcação dessas condições.

3.7 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA A ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM NOZ-PECÃ

A Tabela 8 apresenta os testes da etapa de partição. Os testes foram identificados pelo prefixo P remetendo a avaliação da etapa de partição (P01, P02 e P03). Estes testes foram realizados com o objetivo de apontar os melhores resultados de partição do extrato, promovendo uma menor coextração de interferentes e maiores recuperações de compostos com base na metodologia de extração oficial da EURL-FV para abacate e amêndoa. Os testes P01, P02 e P03 foram avaliados no modo *full scan* no GC-MS/MS INTUVO 9000 para verificar a qualidade na remoção dos coextrativos. A avaliação dos ensaios de fortificação foi realizada no LC-MS/MS na concentração 50 µg kg^{-1}.

Uma segunda etapa do desenvolvimento da metodologia de preparo de amostra foi a avaliação de diferentes combinações de sorventes para a etapa de limpeza por d-SPE, após a aplicação do método QuEChERS. Estes sorventes foram inseridos no método para possibilitar a remoção de coextrativos no extrato (como lipídios, ácidos, entre outros), que atuam como interferentes nas análises multiclasse de resíduos de agrotóxicos devido à alta complexidade da matriz (GARCÍA-REYES et al., 2007; OSHITA & JARDIM, 2014; TUZIMSKI & REJCZAK, 2016).

Foram realizados diversos testes para se avaliar os diferentes sorventes na etapa de limpeza do método. Cada teste foi numerado com o prefixo L, referenciando-se a etapa de limpeza do extrato. Os testes L01, L02, L03, L04, L05, L06, L07 e L08 estão apresentados na Tabela 9. Para o teste L07, foi realizada uma etapa adicional, utilizando o Polish (640 mg $MgS0_4$ + 160 mg NaCl para 2 mL de extrato) conforme protocolo da empresa Agilent Technologies (2015).

A proporção de sorvente utilizada no teste L01 seguiu o protocolo da etapa de d-SPE do método QuEChERS original proposto por ANASTASSIADES e colaboradores (2003). O teste L02 foi preparado com a proporção 1:5 (PSA:C18) do método QuEChERS acetato proposto por Lehotay e colaboradores (2005).

O uso de Z-Sep+ seguiu as mesmas proporções do método oficial da EURL-FV (2011). A terra diatomácea (L04), Florisil® (L05), Sílica (L06) e quitosana (L08) seguiram as mesmas proporções do teste L02 em substituição ao uso do sorvente C18. O uso do PSA foi mantido nestes testes devido a conhecida necessidade relatada na literatura da remoção dos ácidos graxos presente nos extratos da matriz noz-pecã.

Os testes de limpeza também foram avaliados no modo *full scan* no GC-MS/MS INTUVO 9000 para verificar a qualidade na remoção dos coextrativos. Os ensaios de fortificação foram avaliados no sistema LC-MS/MS, na concentração 50 µg kg^{-1}.

Tabela 8 – Testes de avaliação da etapa de partição utilizando o método QuEChERS original e suas variações acetato e citrato.

Etapa	QuEChERS original (P01)[a]	QuEChERS acetato (P02)[b]	QuEChERS citrato (P03)[c]
Quantidade de amostra	5 g		
Hidratação	5 mL água + 30 min de contato		
Homogeneização I	Agitação em vórtex 1 min		
Extração	10 mL acetonitrila	10 mL acetonitrila 1% ácido acético	10 mL acetonitrila
Homogeneização II	Agitação manual 1 min		
Partição	4 g $MgSO_4$ 1 g NaCl	4 g $MgSO_4$ 1,5 g CH_3COONa	4 g $MgSO_4$ 1 g NaCl 1 g $C_6H_5Na_3O_7.H_2O$ 0,5 g $C_6H_6Na_2O_7.1,5H_2O$
Homogeneização III	Agitação manual 1 min e centrifugação a 3500 rpm/ 8 min		
Limpeza	2 mL de extrato 300 mg $MgSO_4$ 250 mg C18 50 mg PSA		
Homogeneização IV	Agitação em vórtex 1 min e centrifugação a 3600 rpm/ 8 min		
Filtração	Filtro PTFE 0,22 µm		
Determinação	LC-MS/MS		

[a]ANASTASSIADES *et al*., 2003; [b]LEHOTAY *et al.*, 2005; [c]ANASTASSIADES *et al.*, 2007

Tabela 9 – Relação de testes avaliados para avaliação de remoção de coextrativos e ensaios de recuperação para 2 mL de extrato de noz-pecã.

Teste	$MgSO_4$ (mg)	PSA (mg)	C18 (mg)	Z-Sep+ (mg)	Terra diatomácea (mg)	Florisil® (mg)	Sílica (mg)	EMR®-Lipid (mg)	Quitosana (mg)
L01	300	50	-	-	-	-	-	-	-
L02	300	50	250	-	-	-	-	-	-
L03	300	-	-	70	-	-	-	-	-
L04	300	50	-	-	250	-	-	-	-
L05	300	50	-	-	-	250	-	-	-
L06	300	50	-	-	-	-	250	-	-
L07	-	-	-	-	-	-	-	400	-
L08	300	50	-	-	-	-	-	-	250

3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM NOZ PECÂ

Foram utilizados como parâmetros para a validação do método analítico: seletividade, curva analítica e linearidade, efeito matriz, exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária) e limite de detecção, limite de quantificação.

3.8.1 Seletividade

A avaliação da seletividade do método foi realizada por meio da comparação dos cromatogramas a partir das injeções no sistema LC-MS/MS de extratos de amostras “branco” (com a ausência dos analitos) e da amostra “branco” fortificada com os analitos. Desta forma foi possível avaliar a coeluição dos interferentes da matriz com os analitos.

3.8.2 Curva analítica e linearidade

A linearidade da curva analítica foi avaliada por meio das injeções de soluções analíticas preparadas em conformidade com o item 3.5, nas concentrações 5, 10, 20, 50, 100, 200 e 250 µg kg^{-1}. Estas soluções foram preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato da amostra “branco” da matriz noz-pecã. Realizaram-se posteriormente os cálculos da média das áreas de cada analito, com a finalidade de obter a regressão linear e o coeficiente de determinação (r^2). Assim, foi obtida a linearidade do método.

3.8.3 Efeito matriz

Realizou-se uma comparação entre as inclinações das curvas analíticas preparadas em solvente e em extrato “branco” da matriz para avaliar o efeito matriz. O modelo de cálculo utilizado está representado na equação 1.

$$Efeito\ matriz = \frac{a_{matriz} - a_{solvente}}{a_{solvente}}\ x\ 100 \qquad \text{(Equação 1)}$$

Onde:

a_{matriz} = inclinação da curva analítica obtida a partir da injeção das soluções analíticas de cada analito, preparadas na matriz “branco” de noz-pecã;
$a_{solvente}$ = inclinação da curva analítica obtida a partir da injeção das soluções analíticas de cada analito, preparadas em solvente (acetonitrila).

3.8.4 Exatidão e precisão

Realizou-se avaliação da exatidão e precisão do método proposto por meio dos valores de recuperação e RSD. As fortificações nos níveis 5, 10, 20, 50 e 100 μg kg^{-1} foram utilizadas para avaliar a matriz noz-pecã com 6 replicatas. De acordo com o INMETRO (2016), a recuperação é calculada conforme a equação 2, através da estimativa da concentração pela análise de amostras “branco” fortificadas com o analito em quantidades conhecidas.

$$Recuperação\ (\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3}\right) x\ 100 \qquad \text{(Equação 2)}$$

Onde:
C_1 = Concentração do analito na amostra fortificada;
C_2 = Concentração do analito na amostra não fortificada;
C_3 = Concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

A precisão foi expressa através do desvio padrão relativo (RSD), o qual é calculado conforme a equação 3, sendo expresso em percentual (INMETRO, 2016).

$$RSD\ (\%) = \left(\frac{\mathrm{DP}}{\mathrm{CMD}}\right) x\ 100 \qquad \text{(Equação 3)}$$

Onde:
DP = Desvio padrão;
CMD = Concentração média determinada.

A precisão intermediária foi avaliada por meio da execução do procedimento analítico em dias diferentes, injetando-se os ensaios de fortificação nos níveis 5, 10, 20, 50 e 100 μg kg^{-1}.

3.8.5 LOD e LOQ

Partindo-se da avaliação dos resultados dos ensaios de recuperação de linearidade das curvas analíticas, de todos analitos realizou-se a definição do limite de detecção e do limite de quantificação do instrumento (LODi, LOQi) e do método (LODm, LOQm). Estabeleceu-se o LOQi como o menor ponto da curva analítica preparada no extrato da amostra “branco” da matriz noz-pecã, com a razão sinal/ruído maior que 10. Calculou-se o LODi partindo-se do LOQi estabelecido dividido por 3,33. Estabeleceu-se o LOQm como a menor concentração fortificada na amostra “branco” de noz-pecã, a qual apresentou recuperações entre 70-120%, e com RSD ≤ 20%. Calculou-se o LODm partindo-se do LOQm estabelecido dividido por 3,33.

3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método desenvolvido e validado foi aplicado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em 9 amostras de noz-pecã adquiridas em mercados locais das cidades de Santa Maria/RS, Porto Alegre/RS, Buenos Aires (Argentina) e Santiago (Chile) no período de setembro de 2018 a junho de 2019.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA LC-MS/MS EMPREGADO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM NOZ-PECÃ

A Tabela 10 apresenta as condições estabelecidas no sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação dos analitos sob avaliação neste estudo.

Tabela 10 – Condições empregadas no sistema cromatográfico LC-MS/MS

Condições cromatográficas	
Sistema cromatográfico	Varian 320-MS® System LC-MS/MS
Detector	Espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo, modo de aquisição SRM Varian 320-MS
Coluna	Pursuit XRs Ultra C18 (100 × 2,0 mm; 1,7 µm)
Temperatura do forno da coluna	30 °C
FM A	Formiato de amônio 5 mmol L^{-1} em água
FM B	Metanol
Volume de injeção	10 µL
Vazão	0,150 mL min^{-1}
Modo de aquisição	SRM
Tipo de ionização	Positiva e negativa
Gás de colisão	Argônio (1,8 mTorr)
Gás de dessolvatação	Nitrogênio (250 ºC)
Temperatura da fonte	50 °C

4.2 CONDIÇÕES DE ANÁLISE POR LC-MS/MS

Na Tabela 11 estão listados os agrotóxicos que foram determinados pelo sistema LC-MS/MS, no modo de ionização ESI positivo e negativo com modo de aquisição SRM. Nesta tabela também estão dispostos os tempos de retenção, íons precursores, íons produto e energia de colisão de todas as transições monitoradas neste trabalho.

A transição mais intensa de cada analito monitorado foi utilizada com a finalidade de quantificação dos compostos. A segunda transição, menos intensa foi utilizada

para a identificação dos compostos. Para os analitos pirimicarbe e pirimifós metílico foi utilizada apenas a transição de quantificação, pois estes compostos não apresentaram uma transição de identificação com intensidade adequada no analisador de massas empregado.

Na Figura 8 está disposto um cromatograma obtido por LC-MS/MS a partir de soluções de mistura de compostos preparadas no extrato da matriz de noz-pecã na concentração de 50 µg kg^{-1}.

Tabela 11 – Compostos monitorados com seus respectivos tempos de retenção (t_R), modo de ionização por eletronebulização (ESI), íons precursores, íons produto e energia de colisão (EC) das transições monitoradas pelo sistema LC-MS/MS

(continua)

Compostos	t_R	ESI	1ª transição Quantificação			2ª transição Identificação		
			Íon precursor	Íon produto	EC (eV)	Íon precursor	Íon produto	EC (eV)
Atrazina	13,24	+	216	174	13	216	104	24
Azoxistrobina	13,87	+	404	372	14	404	329	30
Bitertanol	17,70	+	338	269	17	338	251	9
Boscalida	14,47	+	343	307	17	343	271	30
Bromoconazole	15,55	+	378	159	23	378	161	23
Carbaril	11,91	+	202	145	8	202	127	26
Carbendazina	9,63	+	192	160	15	192	132	27
Carbofuran-3OH	8,48	+	238	163	12	238	220	6
Carbofurano	11,31	+	222	165	7	222	123	16
Carboxim	11,93	+	236	143	10	236	87	21
Cianizina	10,55	+	241	215	14	241	132	21
Clomazone	14,03	+	240	125	18	240	89	39
Diazinona	17,35	+	305	169	17	305	153	17
Difenoconazole	18,14	+	406	251	24	406	337	15
Dimetoato	8,79	+	230	199	8	230	125	19
Epoxiconazole	16,10	+	330	121	17	330	123	12
Fentiona	16,373	+	279	247	11	279	169	14

Tabela 11 – Compostos monitorados com seus respectivos tempos de retenção (t_R), modo de ionização por eletronebulização (ESI), íons precursores, íons produto e energia de colisão (EC) das transições monitoradas pelo sistema LC-MS/MS

(continuação)

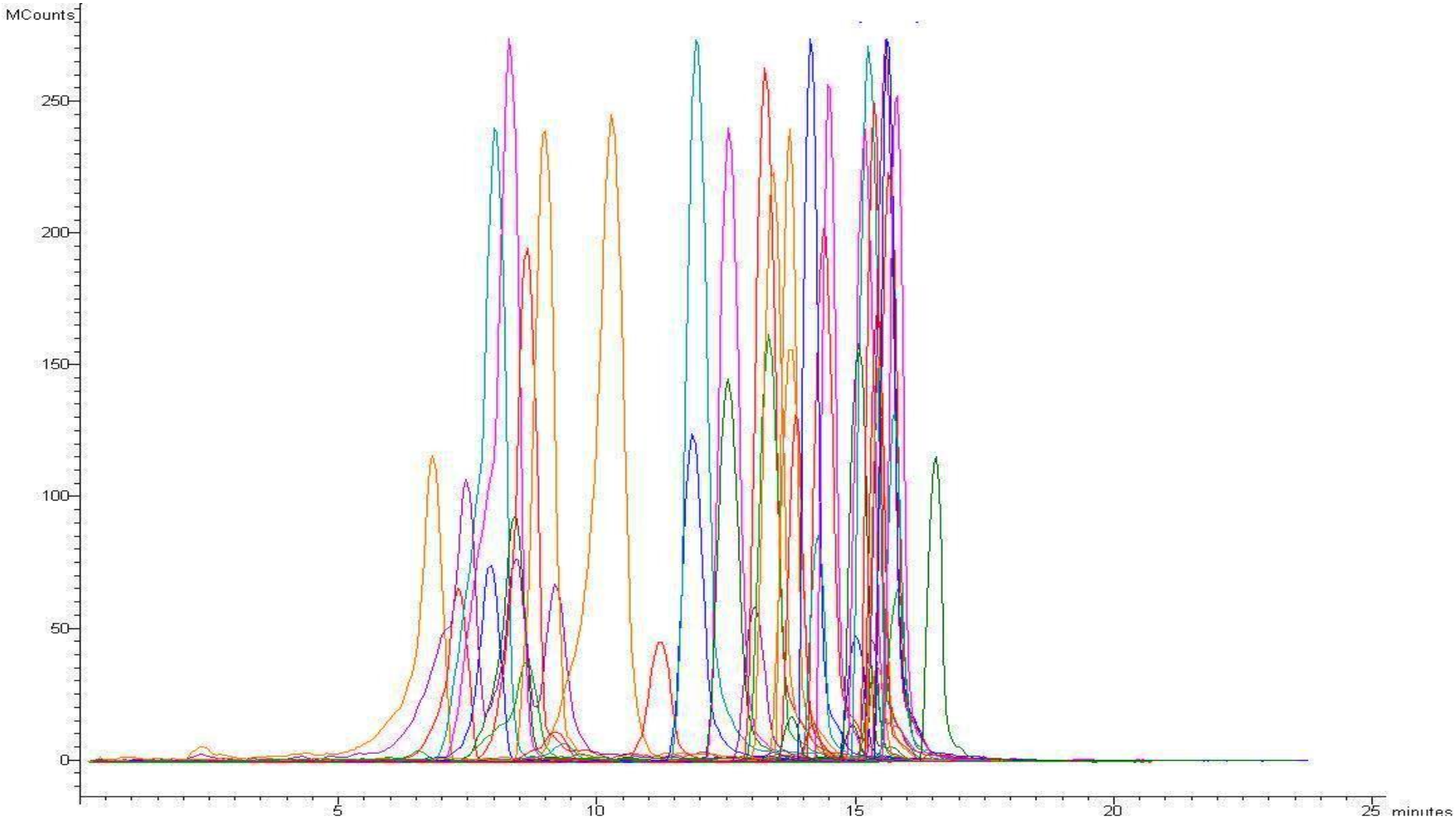
Compostos	t_R	ESI	1ª transição Quantificação			2ª transição Identificação		
			Íon precursor	Íon produto	EC (eV)	Íon precursor	Íon produto	EC (eV)
Fipronil	15,66	-	435	330	15	435	250	26
Flutalonil	14,60	+	324	262	16	324	242	23
Imidacloprido	7,99	+	256	209	14	256	175	17
Iprovalicarbe	15,16	+	321	203	8	321	118	14
Linurom	14,68	+	249	160	16	249	182	13
Mecarbam	15,99	+	330	227	7	330	199	13
Mepronil	15,24	+	270	228	15	270	119	20
Metalaxil	13,02	+	280	220	12	280	248	9
Metiocarbe sulfona	8,64	+	275	258	8,5	275	201	19
Monocrotofos	7,45	+	224	193	7	224	127	13
Monolinurom	12,45	+	215	126	15	215	148	12
Oxamil	6,82	+	237	72	5,5	237	89	5
Paclobutrazol	14,88	+	293	70	12	293	125	33
Paraoxon etílico	12,67	+	293	220	16	293	276	8,5
Piraclostrobina	16,43	+	388	194	9	388	163	22
Pirazofos	16,78	+	374	222	19	374	194	30
Piridafentiona	15,28	+	341	189	20	341	205	20

Tabela 11 – Compostos monitorados com seus respectivos tempos de retenção (t_R), modo de ionização por eletronebulização (ESI), íons precursores, íons produto e energia de colisão (EC) das transições monitoradas pelo sistema LC-MS/MS

(conclusão)

Compostos	t_R	ESI	1ª transição Quantificação			2ª transição Identificação		
			Íon precursor	Íon produto	EC (eV)	Íon precursor	Íon produto	EC (eV)
Pirimicarbe	12,58	+	239	182	12	-	-	-
Pirimifos metilico	16,83	+	306	164	19	-	-	-
Procloraz	17,75	+	376	308	11	376	266	16
Profenofos	17,66	+	375	305	19	375	347	12
Propiconazole	17,37	+	342	159	25	342	69	14
Propizamida	15,48	+	256	189	10	256	173	18
Propoxur	11,22	+	210	111	10	210	168	5
Terbutilazina	14,84	+	230	174	12	230	133	20
Tiacloprido	9,11	+	253	126	18	253	186	12
Tiametoxam	7,36	+	292	211	11	292	181	19
Tiofanato metílico	10,66	+	343	151	16	343	311	10
Triazofos	15,48	+	314	162	16	314	119	32
Trifloxistrobina	11,5	+	409	186	14	409	206	11
Triflumizole	17,298	+	346	278	10	346	220	3
Vamidationa	8,521	+	288	146	10	288	117	20

Figura 8 – Cromatograma obtido pela técnica LC-MS/MS a partindo-se das soluções de compostos preparadas no extrato da matriz noz-pecã na concentração de 50 µg kg^{-1}



4.3 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM NOZ-PECÃ

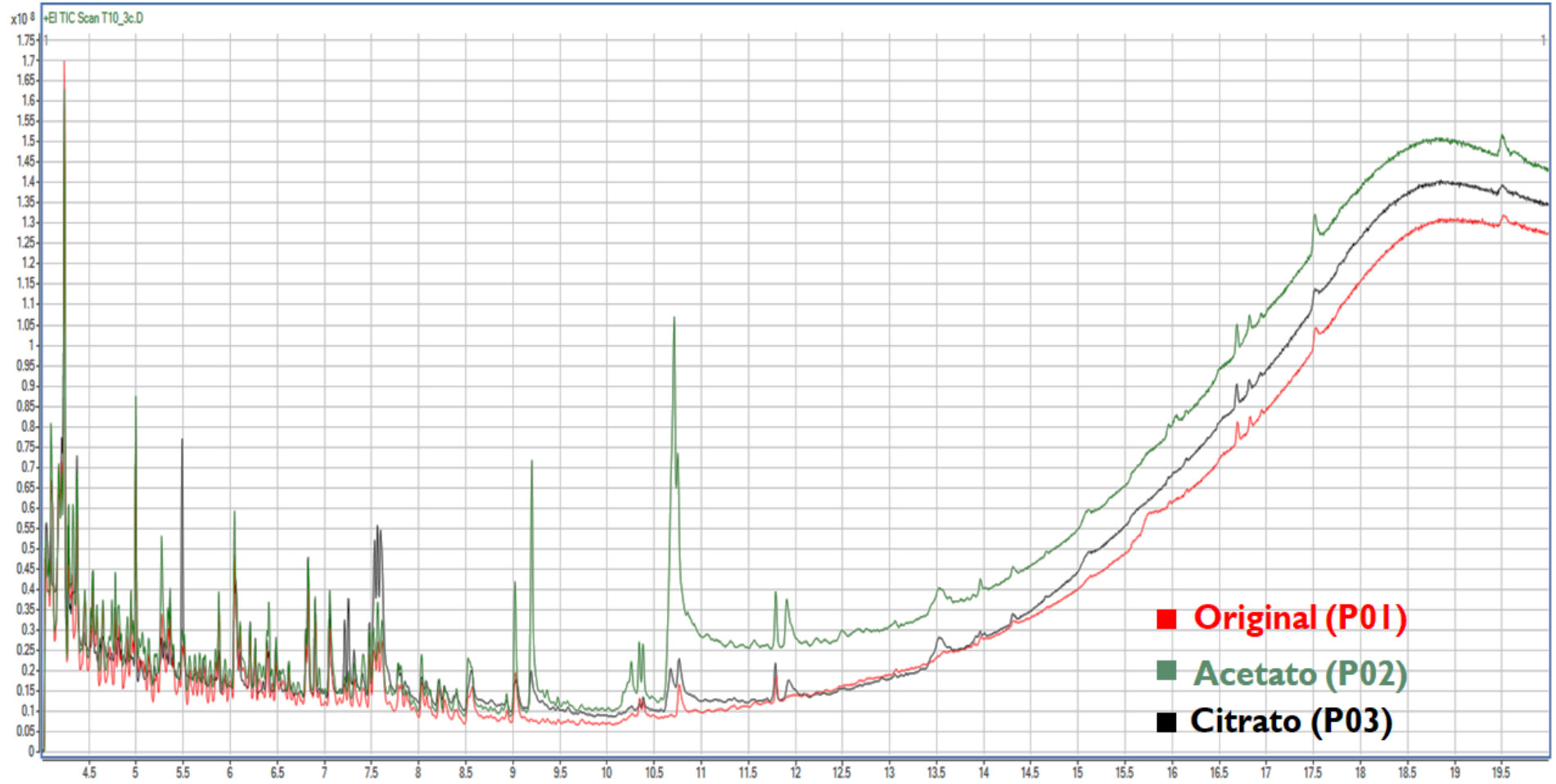
4.3.1 Avaliação dos sais de partição

As análises para o estabelecimento do método de extração foram realizadas no sistema LC-MS/MS. Com base na literatura, foram iniciados os testes conforme apresentado na Tabela 8, avaliando a eficiência na etapa de extração/partição e menor extração de coextrativos.

As recuperações dos compostos foram avaliadas (nível 50 $\mu g\ kg^{-1}$ de fortificação) por meio de curva analítica preparada em extrato “branco” da matriz noz-pecã em cada condição avaliada. Em ambos os testes de recuperações para os métodos QuEChERS original (P01), acetato (P02) e citrato (P03) foram obtidos recuperações e desvios padrão relativo satisfatórias para os 47 compostos avaliados incialmente (exceto os compostos paclobutrazol e tiofanato metílico que foram adicionados na etapa de validação do método proposto). O efeito tamponante dos métodos QuEChERS acetato e citrato apresentam bons resultados em aplicações para compostos que que apresentaram alta dependência do pH como pimetrozina, imazalil e tiabendazol, que podem, por exemplo, serem degradados. Ou também compostos que apresentam problemas de estabilidade e/ou recuperação de acordo com o pH da matriz utilizada (LEHOTAY et al., 2005; ANASTASSIADES et al., 2007; PRESTES et al., 2011).

Desta forma, a escolha da melhor etapa de extração/partição foi respaldada pela avaliação da sobreposição dos cromatogramas no modo *full scan* através do GC-MS/MS Intuvo 9000 apresentado na figura 8, do extrato branco da matriz noz-pecã. O extrato referente à aplicação do método QuEChERS acetato (P02) apresentou uma maior extração dos coextrativos, principalmente com relação ao coextrativo 9,17-Octadecadienal (Z), devido ao efeito tamponante do sal acetato de sódio, estabelecendo um pH em torno de 4,8. Os métodos QuEChERS original (P01) e QuEChERS citrato (P03) apresentaram uma menor extração de coextrativos quando comparado ao QuEChERS acetato (P02), tendo efeito similar conforme o cromatograma apresentado na Figura 9.

Figura 9 – Cromatograma no modo *full scan* dos extratos de amostra “branco” de noz-pecã dos testes P01, P02 e P03 no sistema GC-MS/MS Intuvo 9000.



Fonte: (Autor, 2019).

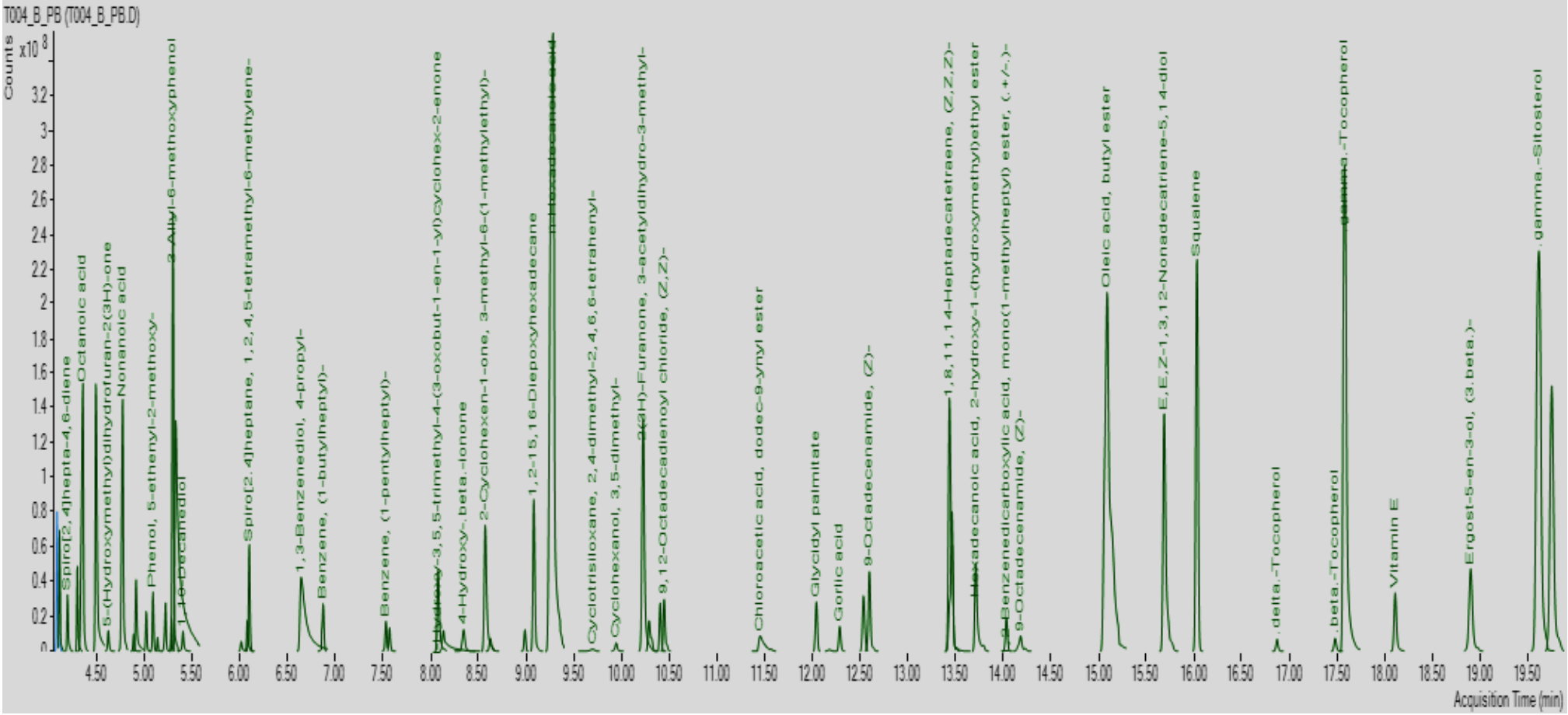
Esses coextrativos são compostos orgânicos de alta massa molecular como 9,17-Octadecadienal (Z), com um tempo de aquisição de 10,77 minutos. Este coextrativo é um ácido graxo poliinsaturado presente na matriz vegetal, além de outros como tocoferóis, ácidos oleicos e polifenóis que também estão presentes no extrato conforme identificado no cromatograma também obtido no modo *full scan* (Figura 10) a partir da extração em solvente acetonitrila. Estes interferentes estão presentes na constituição da matriz noz-pecã, a qual é uma importante fonte desses ácidos graxos (PARRILHA et al., 2018).

O uso do solvente de extração acetonitrila, proporcionou a extração dos analitos, os quais apresentam uma faixa variável de polaridade. Outro fator favorável é a menor quantidade de coextrativos lipofílicos (ceras, gorduras e pigmentos) advindos da matriz quando este solvente de extração é utilizado quando comparados a outros como acetato de etila e acetona, por exemplo (PRESTES et al., 2011).

Outro fator que favoreceu a análise multirresíduo de agrotóxicos em noz-pecã, foi a adição de água a amostra na parte inicial do procedimento, conforme o método oficial europeu EURL-FV (2011). Isso proporcionou uma interação mais efetiva entre a amostra e o solvente de extração (acetonitrila), favorecendo os resultados de recuperação obtidos bem como promoveu a partição do método QuEChERS. Esta adição de água é amplamente usada para matrizes com teor de água inferior a 25% em sua composição centesimal (MASTOVSKA et al., 2010; PRESTES et al., 2011).

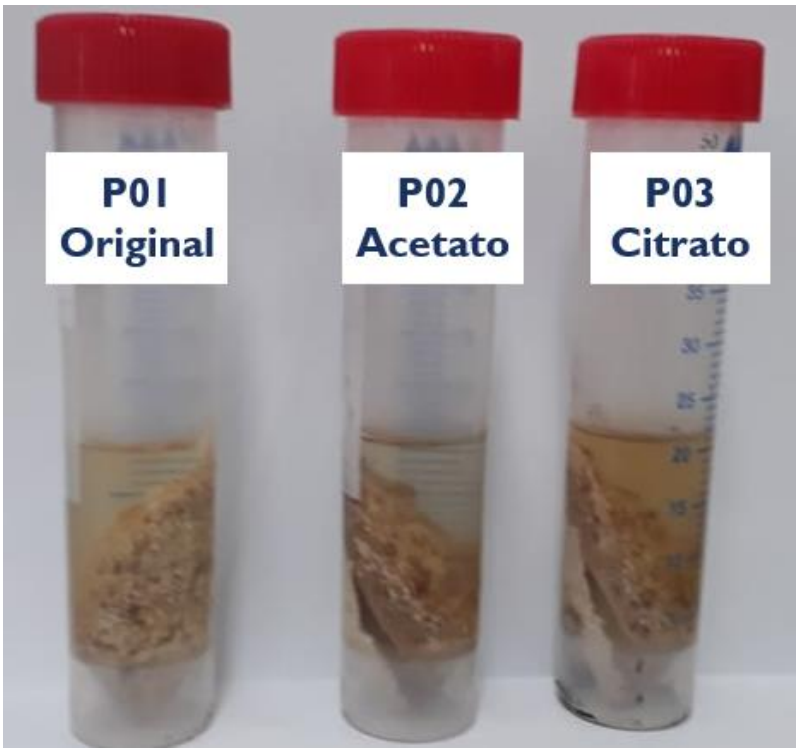
Testes de extração multirresíduo de agrotóxicos realizados na matriz noz-pecã, sem esta etapa de hidratação não apresentaram uma quantidade significativa de extrato ao final da etapa de partição. O sulfato de magnésio e cloreto de sódio do método QuEChERS original (P01) foram escolhidos como os sais da etapa de partição do método elaborado. Esta escolha foi reforçada devido a menor quantidade de sais a serem utilizados se comparado ao método QuEChERS citrato (P03), já que leva a geração de menor quantidade de resíduos em comparação. Outro fator é o custo, já que os sais de QuEChERS Citrato, citrato de sódio di-hidratado e hidrogenocitrato de sódio sesqui-hidratado, representam maior custo para aquisição. Na Figura 11 estão dispostos os extratos particionados de acordo com a metodologia aplicada nos testes P01, P02 e P03.

Figura 10 – Cromatograma no modo *full scan* do extrato particionado no teste P01 da matriz noz-pecã no sistema GC-MS/MS Intuvo 9000.



Fonte: (Autor, 2019).

Figura 11 – Extratos da etapa de partição da avaliação dos métodos QuEChERS original (P01), acetato (P02) e citrato (P03) na matriz noz-pecã.



Fonte: (Autor, 2019).

4.3.2 Avaliação da etapa de limpeza

A etapa de limpeza é essencial para a obtenção de um extrato final livre ou parcialmente livre de interferentes da matriz em análise. Desta forma, nesta etapa optou-se por sorventes que proporcionassem a remoção de interferentes do extrato, bem como não produzir interferência significativa na recuperação dos compostos a serem determinados.

Uma limpeza eficiente do extrato corrobora em robustez e confiabilidade aos resultados determinados por um sistema cromatográfico. Isto pelo fato de que componentes da matriz, podem aderir a coluna cromatográfica, influenciando na resposta do cromatógrafo e tornando necessário um maior número de intervenções técnicas no equipamento (SAITO et al., 2004).

Além disso, outro fator relevante a necessidade de efetuar a limpeza do extrato é a presença de interferentes que são eluídos pela coluna cromatográfica em tempos

de retenção próximos ao dos analitos. Este fato corrobora em alterações no resultado da análise, devido a problemas como aumento ou supressão do sinal analítico no sistema de ionização, e consequentemente na quantificação destes compostos como falso positivo ou negativo (SAITO et al., 2004; PRESTES et al., 2011). Entre os principais coextrativos presentes na matriz noz-pecã, os quais também foram identificados em análise no modo *full scan* no sistema GC-MS/MS Intuvo 9000 são os ácidos mono, poli-insaturados e saturados, tocoferóis e compostos polifenólicos (PARRILLA et al., 2018). O cromatograma está apresentado na figura 9.

Nesta etapa, conforme a tabela 9 avaliou-se diferentes tipos de sorventes para a etapa de limpeza dos extratos da matriz noz-pecã para promover a remoção de coextrativos e interferentes. Na Figura 12 estão apresentados os resultados de recuperação dos compostos para cada teste avaliado e na Figura 13 tem-se expresso graficamente a recuperação e RSD obtidos para os 47 compostos avaliados nos diferentes testes de limpeza de extrato aplicados, excetuando-se 4 compostos que apresentaram RSD >45 % nos testes de limpeza L01, L05 e L06.

Figura 12 - Percentual de compostos que apresentaram recuperações na faixa de 70 e 120% e RSD ≤ 20%, obtidos através dos testes L01, L02, L03, L04, L05, L06, L07 e L08 na matriz noz-pecã por LC-MS/MS.

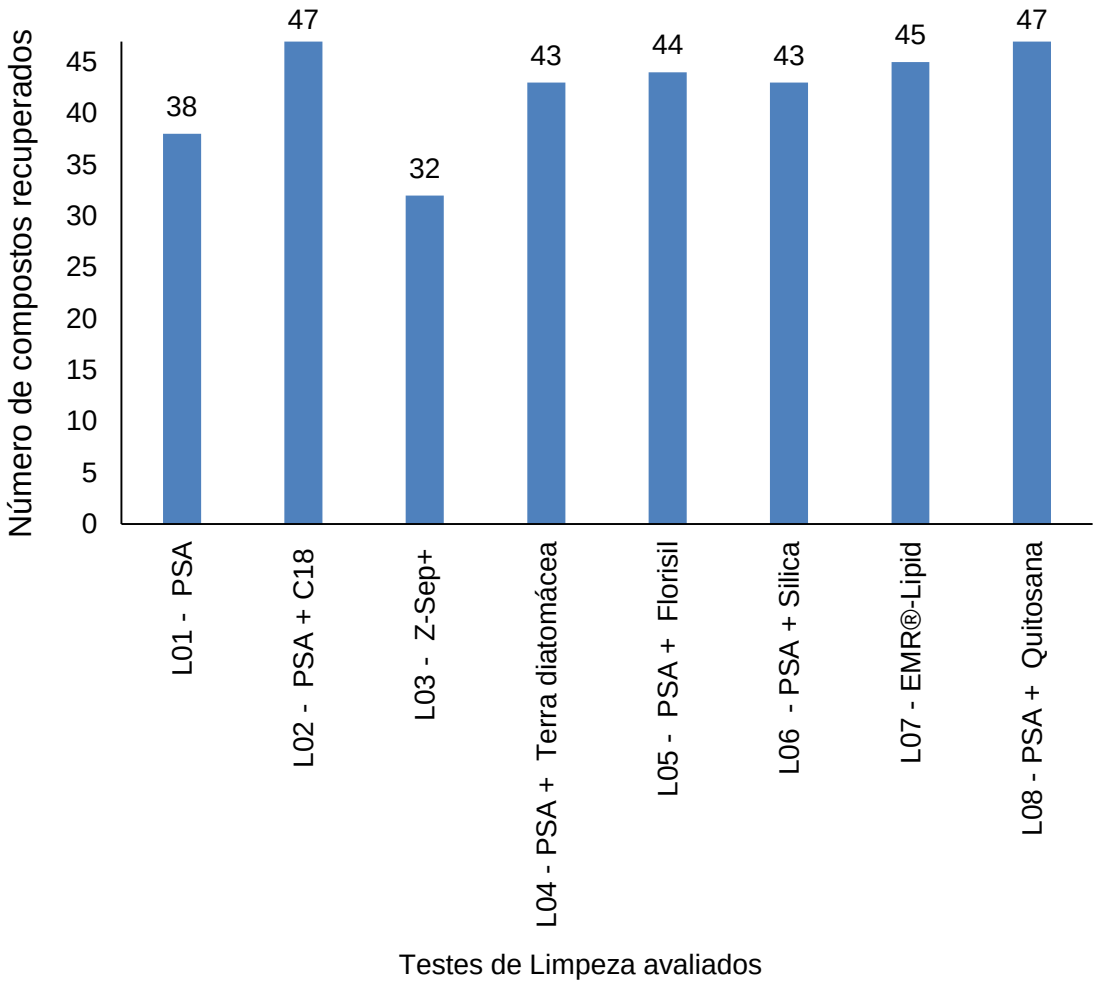
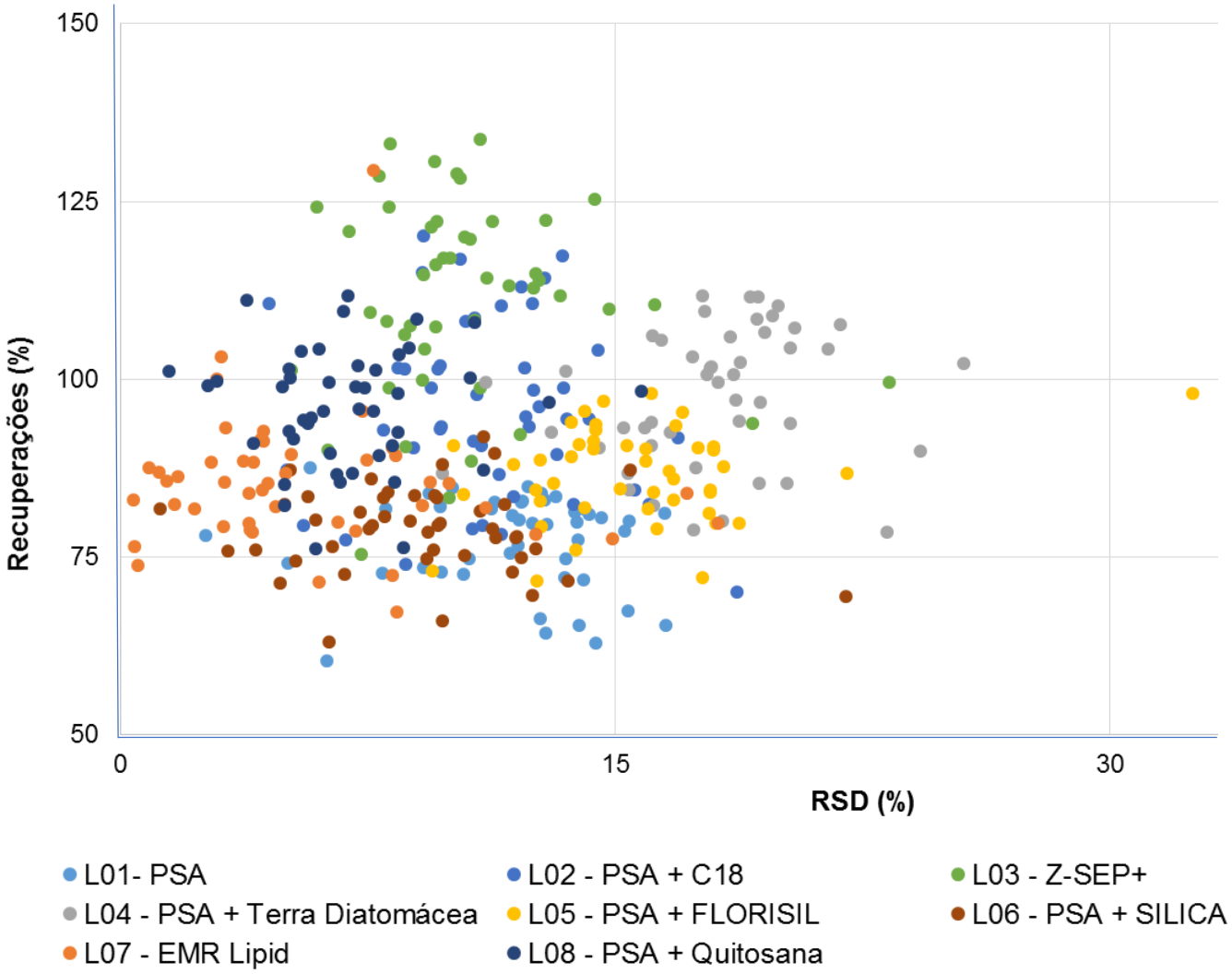


Figura 13 – Gráfico de recuperação versus RSD obtidos nos testes de limpeza de extrato L01, L02, L03, L04, L05, L06, L07 e L08 para os 47 compostos avaliados inicialmente.



Os testes de limpeza que apresentaram maior número de compostos recuperados (100% dos compostos avaliados) foram com os sorventes quitosana e PSA (L08), e PSA e C18 (L02). O teste L01, com a utilização do sorvente PSA individualmente, não apresentou resultados de recuperação satisfatórios para o composto fentiona. Assim, o uso só de PSA (teste L01) foi descartado para o método em desenvolvimento. A fentiona era autorizada no Brasil para a cultura de noz-pecã até 22 de julho de 2019, porém o registro desse agrotóxico foi suspenso conforme publicado no Diário Oficial da União (BRASIL, 2019). Apesar dessa suspensão, o monitoramento da fentiona em noz-pecã permanece relevante.

A aplicação de baixas temperaturas na etapa de limpeza, para promover a precipitação de gorduras não apresentou diferenças significativas na limpeza do extrato, de acordo com as análises realizada no modo *full scan* no sistema GC-MS/MS para ambos os testes de limpeza. Desta forma, esta etapa não foi adicionada ao método desenvolvido apesar de apresentar bons resultados para matrizes com alto teor de lipídios em sua composição centesimal (NORLI et al., 2011; HAKAME et al., 2018).

Os melhores testes de limpeza de extrato quanto a recuperação e RSD, L02 e L08, foram avaliados quanto à remoção de coextrativos da matriz noz-pecã. Esta análise do extrato “branco” foi realizada no modo *full scan* no sistema GC-MS/MS Intuvo 9000. Os gráficos referentes ao *full scan* dos testes L02 e L08 está apresentado na Figura 14.

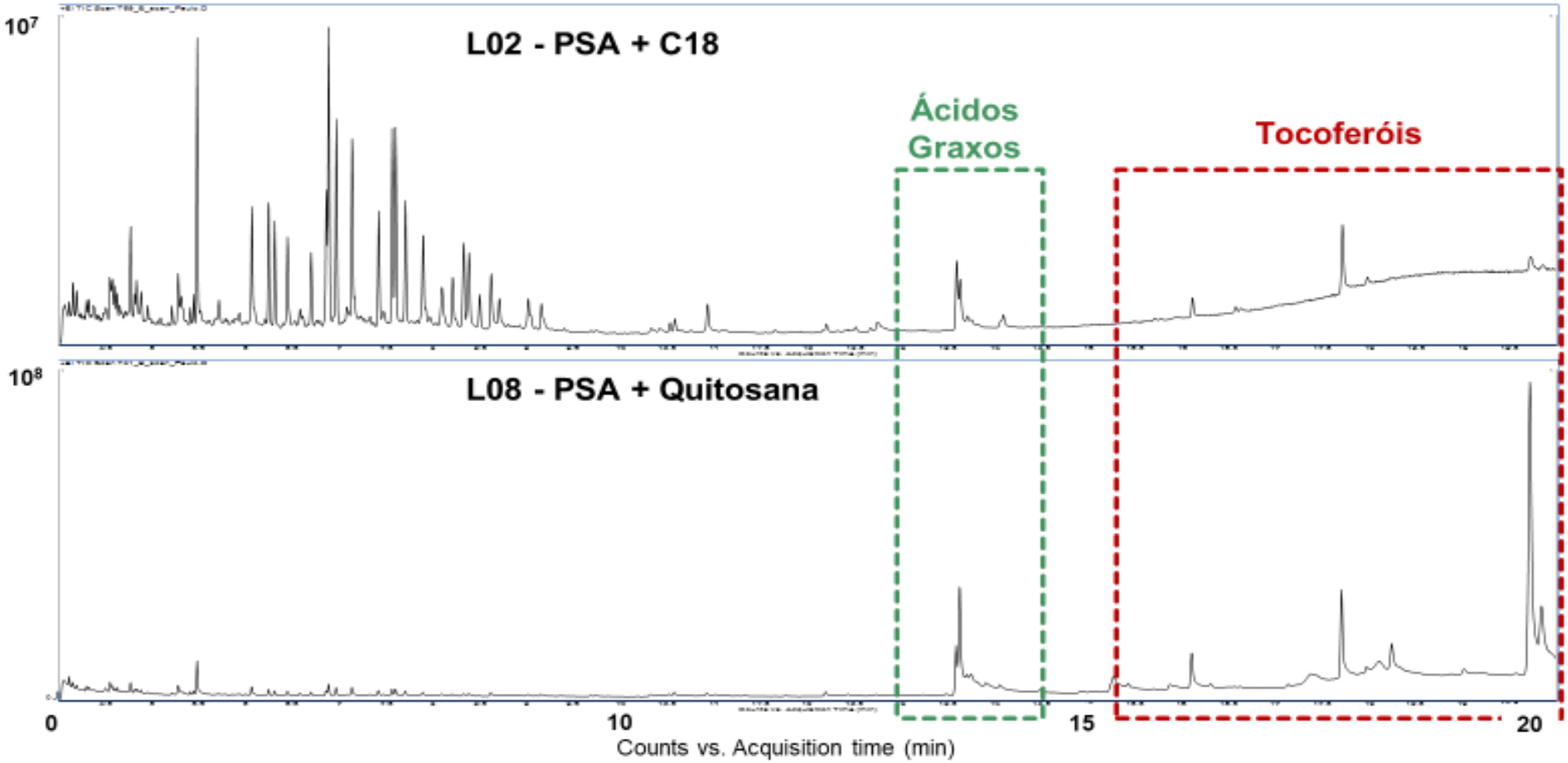
O teste de limpeza com o uso de quitosana e PSA (L08) apresentou menor eficiêcia na remoção do coextrativo 9,17-Octadecadienal (Z) (ácido graxo) e tocoferois quando comparado a mistura PSA e C18 (L07), nos seguintes tempo de aquisição: entre 13,5 e 14,0; 16,0 e 16,5; 17,5 e 18,5; 19,5 e 20 minutos no cromatograma disposto na Figura 14, com escala de 10 vezes menor.

Sabe-se que o sorvente PSA possui a capacidade de retenção de açúcares, ácidos graxos e outros ácidos orgânicos. O sorvente C18 apresentou uma maior capacidade para remover componentes lipofílicos, tais como gorduras e lipídios (tocoferóis) se comparada a Quitosana. A Quitosana apresentou resultados inferiores para o mesmo propósito, nesta avaliação qualitativa quanto à limpeza do extrato na

análise no modo *full scan* no sistema GC-MS/MS Intuvo 9000 (LEHOTAY et al., 2005; PRESTES et al., 2011; PERESTRELO et al., 2019).

O teste L03 com o uso de Z-Sep+ apesar de apresentar boas aplicações na análise de resíduos de agrotóxicos em matrizes com alta composição centesimal de lipídios como abacate e amêndoas, nos testes realizados na matriz noz-pecã, não se obteve um extrato qualitativamente melhor quando comparado aos testes L02 e L08 quando comparados via cromatograma no modo *full scan* no GC-MS/MS INTUVO 9000. Também se obteve recuperações superiores a 120% para os compostos carbofurano, carbofurano 3-OH, dimetoato, cianazina, propoxur, carbaril, monolinuron, paraoxon, matalaxil, azoxistrobina, iprovalicarbe, mecarbam, fipronil e piraclostrobina, bem como RSD superior a 20% para oxamil (LOZANO et al., 2014; MADEJ et al., 2018).

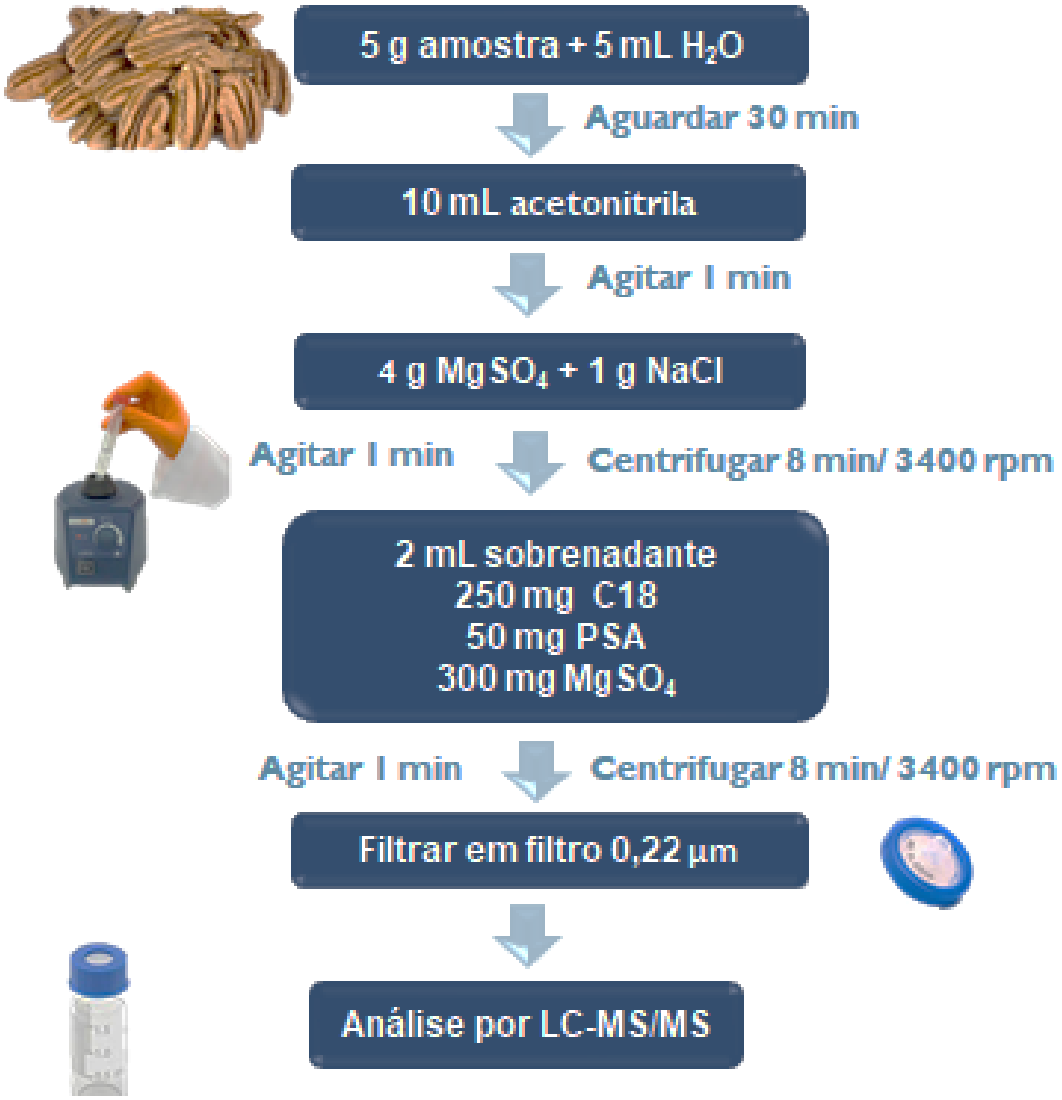
Figura 14 – Cromatogramas no modo *full scan* dos extratos de amostra “branco” de noz-pecã dos testes de limpeza de extrato L02 e L08 no sistema GC-MS/MS Intuvo 9000.



4.3.3 Método de extração otimizado

A Figura 15 apresenta o fluxograma do método QuEChERS modificado aplicado na extração dos agrotóxicos nas amostras de noz-pecã.

Figura 15 – Representação do método QuEChERS modificado proposto para a extração de agrotóxicos em noz-pecã.



4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO

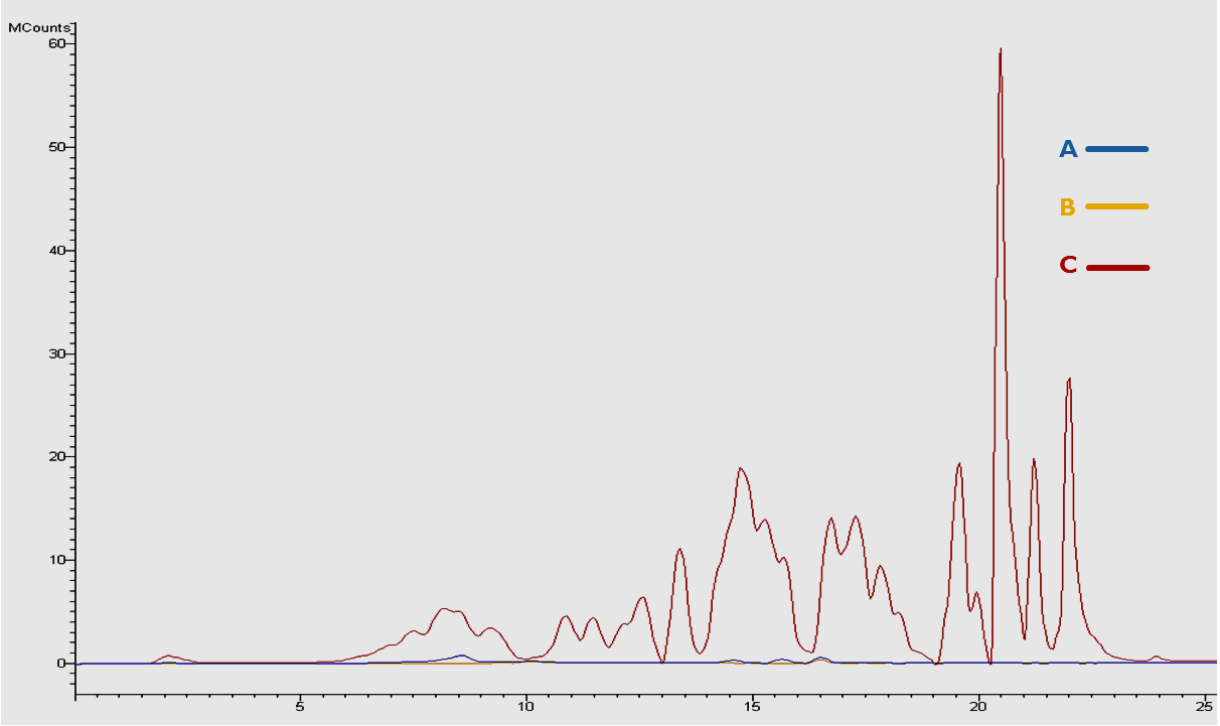
O método QuEChERS modificado para análise de agrotóxicos em noz-pecã foi validado conforme os seguintes parâmetros: seletividade, curva analítica e faixa linear, efeito matriz, exatidão (recuperação), precisão (repetibilidade), limite de detecção e limite de quantificação. Amostras reais também foram aplicadas ao método.

4.4.1 Seletividade

A seletividade do método elaborado foi confirmada por meio da comparação dos cromatogramas adquiridos pela injeção do extrato “branco” da matriz noz-pecã e o extrato de amostra de noz-pecã fortificada no sistema LC-MS/MS. Por meio desta avaliação foi possível verificar a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos. Na amostra “branco” de noz-pecã aplicada ao estudo se apresentou isenta de contaminação de agrotóxicos.

Na Figura 16, tem-se os cromatogramas adquiridos pelo sistema LC-MS/MS, do extrato “branco” de noz-pecã, branco dos reagentes e da solução analítica (mix de compostos) no extrato da matriz na matriz noz-pecã na concentração de 50 µg kg^{-1}.

Figura 16 – Cromatograma do íon total adquirido pelo sistema LC-MS/MS para (A) amostra branco de noz-pecã, (B) branco dos reagentes e (C) solução analítica no extrato da matriz noz-pecã, contendo os analitos na concentração de 50 µg kg^{-1}.



4.4.2 Curva analítica e faixa linear

A faixa linear de trabalho de cada analito foi determinada através das injeções em triplicata das soluções analíticas preparas em acetonitrila e nos extratos “branco” da matriz noz-pecã, nas concentrações 2,5; 5; 10; 25; 50 e 125 µg L^{-1}.

A Tabela 12 apresenta os coeficientes de determinação (r^2), para as curvas analíticas em solvente e na matriz “branco” de noz-pecã, bem como a faixa linear para cada analito.

A partir dos resultados dos coeficientes de determinação (r^2) para cada analito, tem-se por conclusão que os compostos estudados apresentam linearidade satisfatória e adequada, sendo maior ou igual que 0,99. Assim, este parâmetro está em conformidade com guias de validação de métodos de instituições como o INMETRO (2016), BRASIL (2017) e SANTE (2017).

Tabela 12 – Curvas analíticas no solvente e na matriz “branco” de noz-pecã e coeficientes de determinação e valores de faixa linear.

Analitos	Faixa linear de trabalho (µg L^{-1})	Curva analítica	
		Solvente	Matriz
		r^2	r^2
Azoxistrobina	2,5 - 125	0,9984	0,9998
Bitertanol		0,9978	0,9991
Boscalida		0,9952	0,9993
Bromoconazole		0,9966	0,9993
Carbaril		0,9966	0,9997
Carbendazina		0,9991	0,9998
Carbofurano		0,9985	1,0000
Carbofurano-3-OH		0,9982	0,9991
Cianizina		0,9995	0,9997
Clomazone		0,9979	0,9998
Diazinona		0,9967	0,9999
Dimetoato		0,9995	0,9997
Epoxiconazole		0,9989	0,9992
Fentiona		0,9942	0,9982
Fipronil		0,9973	0,9994
Imidacloprido		0,9978	0,9979
Iprovalicarbe		0,9983	0,9994
Mecarbam		0,9986	0,9987
Mepronil		0,9928	0,9988
Metalaxil		0,9978	0,9998
Metiocarbe sulfona		0,9981	0,9955
Oxamil		0,9987	0,9997
Paclobrutazol		0,9945	0,9997
Paraoxon		0,9973	0,9990
Piraclostrobina		0,9973	0,9999
Pirazofos		0,9943	0,9977
Pirimicarbe		0,9979	0,9997
Pirimifos metilico		0,9980	0,9998
Propizamida		0,9967	0,9986
Propoxur		0,9986	0,9993
Tiacloprido		0,9991	0,9994
Tiametoxam		0,9995	0,9998
Tiofanato metilico		0,9962	0,9995
Triazofos		0,9962	0,9999
Triflumizole		0,9982	1,0000
Vamidationa		0,9986	1,0000
Atrazina	5 - 125	0,9974	0,9997
Carboxim		0,9964	0,9991
Difenoconazole		0,9957	0,9995
Flutalonil		0,9918	0,9985
Linurom		0,9940	0,9997
Monocrotofos		0,9984	0,9997
Monolinurom		0,9975	0,9984
Piridafetiona		0,9964	0,9984
Procloraz		0,9968	0,9997
Profenofos		0,9987	0,9998
Propiconazole		0,9952	0,9996
Terbutilazina		0,9965	0,9997
Trifloxistrobina		0,9952	0,9998

4.4.3 Efeito matriz

O efeito matriz tem por definição a influência de um ou mais componentes não detectados das amostras na medição da concentração ou massa de um analito. No sistema LC-MS/MS, esta influência ocorre principalmente na etapa de ionização, onde o coextrativo compete pela ionização com o analito no sistema LC-MS/MS. Desta forma o analito pode ter seu sinal cromatográfico suprimido ou aumentado, consequentemente interferir na exatidão quantitativa (SANTE, 2017; RUTKOWSKA et al., 2019).

Na Tabela 13 estão dispostos os resultados obtidos para o efeito matriz, avaliado para cada analito determinados por LC-MS/MS.

Tabela 13 – Efeito matriz dos agrotóxicos estudados na matriz noz-pecã determinados por LC-MS/MS.

Compostos	**ME (%)**	**Compostos**	**ME (%)**	**Compostos**	**ME (%)**
Atrazina	-5	Fipronil	-28	Pirimicarbe	1
Azoxistrobina	2	Flutalonil	7	Pirimifos metilico	10
Bitertanol	-10	Imidacloprido	19	Procloraz	1
Boscalida	12	Iprovalicarbe	-1	Profenofos	-1
Bromoconazole	8	Linurom	1	Propiconazole	-14
Carbaril	1	Mecarbam	20	Propizamida	-4
Carbendazina	25	Mepronil	0	Propoxur	5
Carbofurano	-95	Metalaxil	-2	Terbutilazina	2
Carbofurano-3-OH	83	Metiocarbe sulfona	-30	Tiacloprido	25
Carboxim	-8	Monocrotofos	18	Tiametoxam	27
Cianizina	18	Monolinurom	0	Tiofanato metilico	29
Clomazone	9	Oxamil	27	Triazofos	-8
Diazinona	-2	Paclobrutazol	11	Trifloxistrobina	7
Difenoconazole	8	Paraoxon	-16	Triflumizole	4
Dimetoato	11	Piraclostrobina	-3	Vamidationa	5
Epoxiconazole	4	Pirazofos	-18		
Fentiona	-15	Piridafetiona	-3		

Todos os compostos avaliados neste trabalho apresentaram efeito matriz na determinação cromatográfica, com exceção do mepronil e monolinurom. A maioria dos compostos apresentaram supressão da resposta, com valores de efeito matriz entre -95 e 83%. Com isto, para minimizar os efeitos de matriz para cada analito, as soluções analíticas (mix de compostos) foram preparadas na matriz “branco” de noz-pecã. A intensidade do efeito matriz pode ser classificada como leve (±0-20%), média (±20-50%) e forte (> ± 50%) (FERREIRA et al., 2016). Carbofurano e carbofurano-3-OH foram os únicos compostos que apresentaram um forte efeito matriz no método validado.

4.4.4 Exatidão (Ensaio de Recuperação), Precisão (Repetitividade) e Precisão intermediária

A exatidão e precisão dos analitos foram avaliados por meio da injeção de cinco níveis de concentração em seis replicatas. A Tabela 14 apresenta os resultados das recuperações (n= 6) e RSD% para os 49 compostos que foram fortificados na matriz noz-pecã, nos níveis de fortificação de 5, 10, 20, 50 e 100 µg kg^{-1}, extraídos através do método QuEChERS modificado.

Devido à baixa detectabilidade do equipamento empregado neste trabalho, 12 compostos foram avaliados nos níveis de 10, 20, 50 e 100 µg kg^{-1}.

Para a determinação dos valores de recuperação, utilizou-se as curvas analíticas preparadas no extrato “branco” da matriz noz-pecã.

A faixa de aceitação dos valores de recuperação seguiu o guia de validação de métodos da SANTE (2017), com valores entre 70 e 120%, com RSD ≤ 20%.

A precisão intermediária (RSD_{pi}) para os agrotóxicos estudados foram avaliadas diferentes dias dos estudos de repetitividade. Na Tabela 14 também são apresentados os valores de recuperação e a precisão intermediária, nas concentrações de 5, 10, 20, 50 e 100 µg kg^{-1} para a matriz noz-pecã.

Tabela 14 – Percentuais de recuperação e RSD dos agrotóxicos com o emprego do método QuEChERS modificado, para matriz noz-pecã

(continua)

Compostos	Recuperação (RSD) (%) para os 5 níveis de fortificação (µg kg^{-1}) (n=6)									
	5	10	20	50	100	5	10	20	50	100
	Repetitividade					Reprodutibilidade				
Atrazina	-	84 (8)	83 (8)	80 (6)	80 (3)	70 (9)	85 (7)	81 (9)	85 (3)	85 (4)
Azoxistrobina	84 (4)	110 (6)	104 (4)	101 (4)	100 (1)	79 (5)	94 (7)	95 (4)	98 (3)	99 (3)
Bitertanol	72 (10)	93 (9)	91 (8)	91 (8)	91 (4)	70 (5)	89 (11)	84 (3)	90 (7)	72 (8)
Boscalida	74 (8)	85 (15)	84 (6)	94 (3)	92 (6)	-	71 (5)	85 (5)	91 (6)	94 (3)
Bromoconazole	77 (9)	85 (18)	70 (12)	77 (8)	75 (4)	81 (18)	103 (11)	76 (9)	82 (8)	74 (4)
Carbaril	72 (8)	91 (8)	92 (8)	91 (6)	90 (4)	72 (6)	97 (9)	88 (6)	86 (3)	94 (4)
Carbendazina	116 (13)	109 (13)	89 (11)	83 (3)	79 (5)	104 (14)	99 (13)	89 (11)	88 (5)	89 (4)
Carbofurano	99 (14)	119 (17)	95 (13)	91 (8)	86 (4)	71 (10)	92 (6)	85 (9)	89 (5)	94 (4)
Carbofurano-3-OH	76 (11)	98 (12)	86 (9)	107 (11)	103 (7)	78 (16)	103 (6)	111 (5)	120 (3)	113 (2)
Carboxim	-	70 (8)	76 (6)	76 (4)	79 (3)	-	84 (8)	72 (5)	80 (3)	76 (4)
Cianizina	92 (18)	120 (10)	109 (7)	112 (6)	110 (7)	80 (13)	115 (8)	116 (12)	118 (3)	103 (4)
Clomazone	70 (7)	92 (5)	85 (11)	80 (6)	81 (13)	77 (11)	82 (8)	83 (5)	83 (3)	93 (9)
Diazinona	70 (7)	78 (9)	72 (6)	71 (5)	70 (3)	83 (5)	78 (6)	73 (6)	70 (1)	75 (3)
Difenoconazole	-	70 (5)	74 (8)	84 (6)	87 (2)	74 (5)	88 (8)	90 (7)	92 (6)	70 (7)
Dimetoato	80 (14)	90 (14)	93 (10)	98 (7)	95 (5)	70 (14)	105 (10)	94 (7)	101 (5)	111 (6)
Epoxiconazole	72 (14)	80 (13)	72 (5)	81 (4)	80 (2)	88 (9)	79 (6)	81 (14)	83 (8)	77 (5)
Fentiona	72 (3)	71 (10)	73 (8)	70 (5)	70 (2)	92 (18)	81 (10)	83 (7)	77 (4)	84 (5)
Fipronil	78 (8)	102 (7)	103 (4)	103 (1)	100 (3)	72 (1)	92 (4)	94 (4)	97 (3)	88 (3)
Flutalonil	-	86 (8)	90 (6)	100 (5)	97 (3)	72 (5)	99 (5)	108 (4)	110 (3)	111 (5)
Imidacloprido	78 (9)	117 (16)	118 (6)	120 (10)	113 (12)	71 (12)	73 (13)	81 (12)	93 (7)	93 (4)
Iprovalicarbe	71 (9)	98 (10)	95 (4)	98 (4)	95 (4)	75 (10)	94 (6)	92 (5)	91 (1)	91 (4)
Linurom	-	70 (8)	78 (11)	79 (8)	74 (4)	74 (9)	77 (3)	79 (11)	83 (3)	90 (8)
Mecarbam	72 (7)	112 (8)	118 (2)	120 (3)	119 (3)	72 (3)	101 (4)	104 (3)	108 (2)	112 (3)
Mepronil	70 (5)	92 (7)	91 (6)	90 (3)	86 (4)	70 (5)	92 (8)	94 (6)	100 (4)	98 (3)

Compostos	Recuperação (RSD) (%) para os 5 níveis de fortificação (µg kg^{-1}) (n=6)									
	5	**10**	**20**	**50**	**100**	**5**	**10**	**20**	**50**	**100**
	Repetitividade					**Reprodutibilidade**				
Metalaxil	70 (8)	98 (9)	96 (5)	94 (4)	94 (2)	76 (6)	91 (6)	91 (4)	90 (5)	92 (5)
Metiocarbe sulfona	74 (7)	106 (17)	116 (17)	108 (9)	72 (20)	74 (7)	91 (12)	70 (7)	80 (6)	71 (9)
Monocrotofos	-	74 (15)	73 (7)	88 (8)	90 (5)	70 (6)	84 (6)	93 (6)	99 (6)	100 (3)
Monolinurom	-	71 (6)	73 (13)	79 (7)	83 (4)	81 (11)	97 (16)	84 (8)	84 (7)	89 (6)
Oxamil	95 (18)	119 (14)	108 (7)	111 (6)	102 (6)	109 (11)	118 (11)	119 (4)	120 (7)	116 (6)
Paclobrutazol	86 (11)	98 (6)	90 (13)	94 (6)	92 (6)	92 (8)	110 (10)	114 (3)	111 (3)	88 (4)
Paraoxon	74 (10)	70 (8)	95 (5)	94 (4)	97 (2)	85 (20)	71 (5)	77 (3)	83 (4)	88 (3)
Piraclostrobina	71 (5)	88 (8)	80 (7)	80 (4)	80 (3)	71 (2)	76 (6)	79 (4)	78 (3)	84 (4)
Pirazofos	48 (16)	95 (7)	99 (5)	98 (3)	96 (3)	70 (7)	98 (3)	101 (2)	103 (3)	72 (18)
Piridafetiona	-	97 (8)	93 (5)	95 (3)	91 (4)	-	70 (4)	90 (4)	100 (5)	95 (3)
Pirimicarbe	70 (8)	89 (13)	86 (5)	88 (4)	86 (2)	71 (13)	76 (9)	81 (5)	83 (4)	88 (5)
Pirimifos metílico	71 (7)	84 (6)	78 (10)	79 (4)	77 (3)	71 (8)	76 (8)	79 (9)	74 (2)	70 (6)
Procloraz	-	74 (7)	72 (8)	74 (6)	72 (2)	-	71 (5)	75 (5)	79 (3)	70 (9)
Profenofos	-	**56** (10)	**55** (10)	**57** (4)	**53** (5)	**68** (13)	**67** (9)	**61** (8)	**59** (3)	74 (4)
Propiconazol	-	74 (13)	70 (9)	70 (4)	70 (8)	70 (9)	71 (7)	70 (14)	73 (6)	73 (3)
Propizamida	-	70 (9)	77 (10)	88 (6)	87 (2)	71 (12)	98 (7)	96 (12)	92 (3)	96 (6)
Propoxur	72 (13)	80 (17)	83 (9)	93 (5)	92 (2)	72 (7)	78 (13)	77 (8)	83 (3)	92 (4)
Terbutilazina	-	70 (3)	71 (6)	75 (4)	73 (2)	-	70 (2)	71 (5)	79 (3)	81 (2)
Tiacloprido	76 (11)	109 (6)	104 (5)	104 (4)	98 (8)	84 (8)	104 (10)	101 (9)	107 (5)	114 (4)
Tiametoxam	79 (18)	118 (11)	118 (1)	120 (1)	120 (17)	79 (12)	94 (13)	91 (11)	98 (7)	100 (5)
Tiofanato metilico	78 (13)	103 (10)	104 (9)	102 (7)	96 (5)	71 (13)	92 (9)	90 (14)	101 (4)	94 (6)
Triazofos	80 (6)	104 (6)	93 (5)	92 (3)	89 (3)	74 (8)	94 (2)	90 (5)	93 (3)	94 (3)
Trifloxistrobina	-	74 (8)	86 (6)	95 (5)	97 (2)	70 (4)	89 (3)	91 (3)	88 (1)	82 (5)
Triflumizole	70 (11)	80 (5)	70 (5)	70 (2)	-	**67** (4)	**69** (9)	**67** (3)	**67** (3)	78 (4)
Vamidationa	77 (10)	101 (5)	95 (7)	97 (5)	94 (2)	72 (12)	97 (4)	88 (5)	100 (3)	95 (2)

A exatidão do método para noz-pecã, em relação à repetibilidade, se apresentaram resultados satisfatórios dentro dos critérios de aceitação para a maioria dos compostos, com exceção do profenofós na validação.

O profenofós apresentou resultados de recuperação inferiores a 68% nos cinco níveis de fortificação avaliados, apesar de nos testes iniciais ter apresentado resultados satisfatórios. Isto está relacionado ao fato de que o profenofós se degradar em extratos com pH fora da faixa de 3,5 a 4,0 unidades. O extrato de noz-pecã a partir do método validado apresenta pH em torno de 5 unidades. Em meio ácido, a degradação do profenofós é reduzida em cerca de 37% (SAVANT et al., 2010; KHAN et al., 2018).

Os valores de recuperação na avaliação da precisão intermediária variaram na faixa de 70 e 120% com RSD_{pi} menores que 20%, para a maioria dos analitos, excetuando-se o composto triflumizole que apresentou recuperações inferiores a 69% nos níveis de fortificação 5, 10, 20 e 50 µg kg^{-1}. Desta forma, todos os compostos avaliados apresentaram resultados satisfatórios quanto exatidão, precisão e precisão intermediária, excetuando-se o profenofós (etapa de validação e precisão intermediária) e triflumizole (precisão intermediária).

4.4.5 Determinação dos valores de LOD e LOQ do método e do instrumento

Na Tabela 15 estão dispostos os valores obtidos de LOD e LOQ do método para os analitos na matriz noz-pecã.

Neste estudo, o LOQm se apresentou na faixa de 5 a 10 µg kg^{-1}, enquanto o LODm de 2 a 3 µg kg^{-1}. Com relação ao LOQi, os valores determinados foram de 2,5 a 5 µg L^{-1}, enquanto que para o LODi foram 0,75 a 1,5 µg L^{-1}. Estes valores de limites foram considerados satisfatórios, pelo fato de que estes atendem as concentrações dos valores máximos de resíduos permitidos (LMR) para os agrotóxicos em noz-pecã, estabelecidos pela legislação da EU e brasileira por meio da ANVISA.

Tabela 15 - Valores de LOD e LOQ do método para os analitos validados no estudo.

Compounds	LOD µg kg^{-1}	LOQ µg kg^{-1}	LMR (EU) µg kg^{-1}	LMR (Brasil) µg kg^{-1}
Atrazina	3	10	50	-
Azoxistrobina	2	5	10	-
Bitertanol	2	5	20	-
Boscalida	3	10	50	-
Bromoconazole	2	5	50	-
Carbaril	2	5	20	-
Carbendazina	2	5	100	-
Carbofuran-3OH	2	5	20	-
Carbofurano	2	5	20	-
Carboxim	3	10	50	-
Cianizina	2	5	-	-
Clomazone	2	5	20	-
Diazinona	2	5	20	-
Difenoconazole	3	10	50	-
Dimetoato	2	5	10	-
Epoxiconazole	2	5	50	-
Fentiona	2	5	20	50
Fipronil	2	5	5	-
Flutalonil	3	10	10	-
Imidacloprido	2	5	50	-
Iprovalicarbe	2	5	20	-
Linurom	3	10	50	-
Mecarbam	2	5	10	-
Mepronil	2	5	20	-
Metalaxil	2	5	10	-
Metiocarbe sulfona	2	5	200	-
Monocrotofos	3	10	20	-
Monolinurom	3	10	200	-
Oxamil	2	5	20	-
Paclobutrazol	2	5	20	-
Paraoxon etílico	2	5	10	-
Piraclostrobina	2	5	20	-
Pirazofos	2	5	-	-
Piridafentiona	3	10	20	-
Pirimicarbe	2	5	20	-
Pirimifos metilico	2	5	-	-
Procloraz	3	10	20	-
Propizamida	3	10	100	-
Propoxur	3	10	10	-
Terbutilazina	2	5	20	-
Tiacloprido	3	10	10	-
Tiametoxam	2	5	50	-
Tiofanato metílico	2	5	50	-
Triazofos	2	5	20	-
Propizamida	2	5	20	-
Trifloxistrobina	3	10	20	-
Vamidationa	2	5	20	-

4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método QuEChERS modificado proposto foi empregado na determinação de resíduos de agrotóxicos em 17 amostras de noz-pecã. Em cada amostra foi utilizada o padrão de controle (atrazina deuterada) na concentração de 50 µg kg^{-1}. Os resultados de exatidão e precisão se apresentaram dentro da faixa de aceitação de recuperação entre 70 e 120%, com RSD < 20%.

Não foram detectados nenhum resíduo dos 47 agrotóxicos validados neste estudo nas 17 amostras analisadas. O fato de não ter sido detectado resíduos dos agrotóxicos validados pode estar relacionado ao processo de beneficiamento do fruto da nogueira pecã. As etapas de beneficiamento do fruto envolvidas são lavagem com água aquecida a temperatura de 80 ºC (com a finalidade de inativar enzimas e eliminar microrganismos), descascamento e etapa de secagem, onde a noz-pecã é submetida a temperatura máxima de 40 ºC para a diminuir o teor de umidade das sementes (ORO, 2007).

5 CONCLUSÃO

O método QuEChERS modificado otimizado e aplicado neste estudo mostrou-se eficaz para a determinação de 47 agrotóxicos em noz-pecã, onde o uso dos sais de partição do método QuEChERS original e da mistura dos sorventes PSA e C18 se mostraram mais eficiente quanto ao maior número de compostos recuperados bem como na remoção de coextrativos.

A detecção dos analitos empregando o sistema LC-MS/MS com fonte de ionização por eletronebulização (*electrospray*) nos modos positivo e negativo, operando no modo SRM, apresentou resultados satisfatórios referente a detectabilidade, seletividade e precisão na etapa de validação do método para a matriz noz-pecã.

O método foi avaliado em parâmetros como linearidade e faixa de trabalho, através da fortificação das curvas analíticas preparadas em extrato da matriz noz-pecã, nos níveis de concentração de 5; 10; 20; 50; 100 e 250 µg kg^{-1}. O efeito matriz avaliado pela comparação das curvas analíticas preparadas na matriz noz-pecã e no solvente acetonitrila. Esta comparação indicou a necessidade de validar e quantificar os dados utilizando a solução de compostos em matriz.

Através dos ensaios de fortificação nos cinco níveis de concentração, a exatidão do método foi avaliada, apresentando-se com recuperações dentro da faixa de 70 a 120%. A precisão do método apresentou resultados satisfatórios em termos de repetitividade, com RSD inferiores a 20% para os 47 compostos avaliados. Os valores de LOD e LOQ do método foram de 2 a 3 e 5 a 10 µg kg^{-1}. Assim, o método proposto, empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS para a determinação de agrotóxicos em noz-pecã é adequado, podendo ser aplicado em análises de rotina.

6 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

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

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Ampliar o escopo de agrotóxicos a serem analisados na matriz noz-pecã por LC-MS/MS;
- ✓ Avaliar a casca da noz-pecã quanto a presença de resíduos de agrotóxicos, bem como antes e após o beneficiamento do fruto, visando avaliar em quais etapas podem ocorrer a degradação dos compostos;
- ✓ Desenvolver um método de análise cromatográfica por GC-MS/MS para expandir o escopo para analitos não passíveis de análise por cromatografia líquida;
- ✓ Avaliar a aplicabilidade do método de extração QuEChERS modificado para outros produtos com alta composição centesimal de lipídios.

REFERÊNCIAS

AGILENT TECHNOLOGIES. Enhanced Matrix Removal—Lipid Brochure. 5991-6052EN, 2016. Disponível em: < https://www.agilent.com/cs/library/brochures/5991-6052EN_EMRLipid%20brochure.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2019.

AGILENT TECHNOLOGIES. Recommended protocols for enhanced matrix removal – lipid. Agilent Technologies Application Note. 5991-6057EN, 2015. Disponível em: < https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5991-6057EN.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2019.

AGROFIT, 2018. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: jan. 2019.

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 the Association of Official Analytical Chemists**, v. 86, nº 2, p.412-431, 2003.

ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM, E.; TASDELEN, B.; STAJNBAHER, D. Crop protection, public health, environmental safety. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, p.439-458, 2007.

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

ATANASOV, A. G.; SABHARANJAKC, S. M.; ZENGIND, G.; MOLLICAE, A.; SZOSTAKA, A.; SIMIRGIOTISG, M.; HUMINIECKIA, L.; HORBANCZUKH, O.K.; NABAVII, S.M.; MOCANJ, A. Pecan nuts: A review of reported bioactivities and health effects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p.246–257, 2018.

BOUALI, I.; TRABELSI, H.; HERCHI, W.; MARTINE, L.; ALBOUCHI, A.; BOUZAIEN, G.; SIFI, S.; BOUKHCHINA, S.; BERDEAUX, O. Analysis of pecan nut (Carya illinoinensis) unsaponifiable fraction. Effect of ripening stage on phytosterols and phytostanols composition. **Food Chemistry**, v. 164, p.309–316, 2014.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. **RDC Nº 166 – Estabelecimento de critérios de validação de métodos analítico**. Brasília, 2017. Disponível em: < https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>. Acesso em: 5 mai. 2019.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. **Regularização de Produtos – Agrotóxicos: Monografias de Agrotóxicos.** Brasília, 2019. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos>. Acesso em: 8 mai. 2019.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 4, DE 18 DE JANEIRO DE 2012.** Brasília, 2012. Disponível em:

<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/res0004_18_01_2012.html>. Acesso em: 10 mai. 2019.

BRASIL. **Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002**. Brasília, 2002. Disponível em: <https://www.inpev.org.br/responsabilidades/legislação/images/Decreto.PDF>. Acesso em: Acesso em: 10 jan. 2019.

BRASIL. **Diário Oficial da União, Resolução nº 1.967, 22 julho 2019.** Brasília, 2019b. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Publica%C3%A7%C3%B5es+de+22.07.2019+-+DIVERSAS.pdf/31c3df4b-4bc1-41b8-9f39-78f8acf602a6>. Acesso em: 10 ago. 2019.

CABRERA, L. C.; Caldas, S. S.; PRESTES, O. D.; PIMENTEL, E. G.; ZANELLA, R. Evaluation of alternative sorbents for dispersive solid-phase extraction clean-up in the QuEChERS method for the determination of pesticide residues in rice by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 39, p.1945–1954, 2016.

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

CODEX ALIMENTARIUS, 2018. TN 0672 – Pecan. Disponível em: < http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/commodities-detail/en/?c_id=257>. Acesso em: 12 mar. de 2019.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia, 2 ed, Unicamp, cap: 8 e 9, 2006.

CORTES, J.; TOLEDANO, R. M.; VILLÉN, J.; VÁZQUEZ, A. Analysis of Pesticides in Nuts by Online Reversed-Phase Liquid Chromatography-Gas Chromatography Using the Through-Oven Transfer Adsorption/Desorption Interface. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.5544-5549, 2008.

DONATO, F.F.; MARTINS, M.L.; MUNARETTO, S.J.; PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. Development of a Multiresidue Method for Pesticide Analysis in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Determination by Gas and Liquid Chromatography with Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. **J Braz Chem Soc**. v. 26, p. 2077-2087, 2015.

DOREA, H.; LANÇAS, F. Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction of Organophosphorus and Synthetic Pyrethroid Pesticides in Cashew Nut and Passion Fruit. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 11, p.367-375, 1999.

EFSA, 2018. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/pesti cides>. Acesso em: 10 jan. 2018.

EMBRAPA, 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/clima-temperado/busca-de-eventos/-/evento/209207/curso-sobre-o-cultivo-da-nogueira-peca>. Acesso em: 15 jan. 2018.

ENGEBRETSON, J.; HALL, G.; HENGEL, M.; SHIBAMOTO, T. Analysis of Pendimethalin Residues in Fruit, Nuts, Vegetables, Grass, and Mint by Gas Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p.2198-2206, 2001.

EU COMISSION, 2018. EU Pesticides database for Pecans. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?e vent=product .resultat&language=PT&selectedID=17>. Acesso em: 15 jan. 2018.

EURL-FV, 2011. Determination of pesticide residues in avocado and almond by liquid and gas chromatography tandem mass spectrometry – European Union Reference Laboratory for Pesticide Residues. Disponível em: <http://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EURL-FV%20(2013-M11)Determination%20of%20pesticide%20residues%20in%20high%20oil% 20vegetal%20commodities.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2018.

FARAJIA, M.; NOORBAKHSHA, R.; SHAFIEYANB, H.; RAMEZANIC, M. Determination of acetamiprid, imidacloprid, and spirotetramat and their relevant metabolites in pistachio using modified QuEChERS combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.240, p.634-641, 2018.

FERREIRA, J. A.; FERREIRA, J. M.; TALAMINI, V.; FACCO, J. F.; RIZZETI, T. M.; PRESTES, O. D., ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Determination of pesticides in coconut (Cocos nucifera Linn.) water and pulp using modified QuEChERS and LC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 213, p. 616-624, 2016.

FRONZA, D.; HAMANN, J. J.; BOTH, V.; ANESE, R. O.; MEYER, E. A. Pecan cultivation: general aspects. **Ciência Rural**, v. 48, p.1-9, 2018.

FRONZA, D.; HAMANN, J.J. Técnicas para o cultivo da nogueira-pecã. Santa Maria - RS: Universidade Federal de Santa Maria, Colégio Politécnico, Núcleo de Fruticultura Irrigada, p.402, 2016.

GARCÍA-REYES, J. F.; FERRER, C.; GÓMEZ-RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Determination of pesticide residues in olive oil and olives. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p.239-251, 2007.

GDA, 2018. Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3645>. Acesso em: 5 jan. de 2018.

GROSS, J. H. Mass spectrometry. A textbook. **Springer**, 1ª edição, p.415-478, 2004.

HAKME, E.; LOZANO, A.; FERRER, C.; DÍAZ-GALIANO, F.J.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Analysis of pesticide residues in olive oil and other vegetable oils. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 100, p.167-179, 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.

HOPFGARTNER, G.; VARESIO, E.; TSCHÄPPÄT, V.; GRIVET, C.; BOURGOGNE, E.; LEUTHOLD, L. A. Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. **Journal of Mass Spectrometry**, v.39, p.845-858, 2004.

HUSSAIN, S. W.; KIAROSTAMI, V.; MORROVATI, M.; TAGEBAKHSH, M. R. Multiresidue determination of diazinon and ethion in pistachio nuts by use of matrix solid phase dispersion

with a lanthanum silicate co-column and gas chromatography. **ACTA CHROMATOGRAPHICA**, v. 13, p.208-214, 2003.

IBAMA, 2016. Produção, importação, exportação e venda de ingredientes ativos 2014. Disponível em: < http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Acesso em: 15 jan. 2018.

IBGE, 2017. Censo Agropecuário de 2017. Disponível em: < https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=0&tema=76356>. Acesso em: 07 mar. 2019.

INC, 2018. Estatística anual da produção de nozes e frutras secas de 2017/ 2018. Disponível em: < https://www.nutfruit.org/files/tech/1523960263_INC_Statistical_Yearbook_2017-2018.pdf>. Acesso em: 08 mar. de 2019.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008, rev. 5, 2016.

ISO/IEC 17025. Requisitos Gerais para a Competência dos Laboratórios de Ensaio e de Calibração. ABNT NBR, p.12, 2017.

IUPAC, 2018. Global Availability of Information on Agrochemicals. Disponível em: < https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/atoz.htm#F>. Acesso em: 20 jan. 2018.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, p.13-25, 2010.

KHAN, Z.; KAMBLE, N.; BHONGALE, A.; GIRME, M.; BAHADUR, V.; CHAUHAN; BANERJEE, K. Analysis of pesticide residues in tuber crops using pressurised liquid extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**. v. 241, p. 250-257, 2018.

KIM, L.; LEE, D.; CHO, H. K.; CHOI, S. D. Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 22, p.1-16, 2019.

LANÇAS, F. M. A cromatografia liquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v.1, p. 35-61, 2009.

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

LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKÁ, K.; LIGHTFIELD, A. 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.615-630, 2005.

LI, Y.R.; WU, W.L.; LIU, Y.Z. Development and utilization of pecan germplasm resources. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**, v. 37, p.13306–13308, 2009.

LIN, Q. B.; XUE, Y. Y.; SONG, H. Determination of the Residues of 18 Carbamate Pesticides in Chestnut and Pine Nut by GPC Cleanup and UPLC–MS–MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 48, p.7-11, 2010.

LIU, Y.; SHEN, D.; LI, S.; NI, Z.; DING, M.; YE, C.; TANG, F. Residue levels and risk assessment of pesticides in nuts of China. **Chemosphere**, v.144, p.645-651, 2016.

LOSANO, A.; RAJISKI, L.; UCLÉS, S.; VALLES, N. B.; MEZCUA, M.; ALBA, A. R. F. Evaluation of zirconium dioxide-based sorbents to decrease the matrix effect in avocado and almond multiresidue pesticide analysis followed by gas chromatography tandem mass spectrometry. **Talanta**, v.118, p.68–83, 2014.

LOZANO, A.; RAJSKI, L.; UCLÉS, A.; BELMONTE-VALLES, N.; MEZCUA, M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Evaluation of zirconium dioxide-based sorbents to decrease the matrix effect in avocado and almond multiresidue pesticide analysis followed by gas chromatography tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 118, p.68-83, 2014.

MADEJ, K.; KALENIK, T. K.; PIEKOSZEWSKI, W. Sample preparation and determination of pesticides in fat-containing foods. **Food Chemistry**, v.269, p.527–541, 2018.

MAHMOUDABADI, M.; ABEDINI, E.; ZAHEDI, H.; ALIZADEH, A. Experimental determination of acetamiprid pesticide residue in three different types of pistachio by ion mobility spectrometry and using QuEChERS method in the different temperatures and in the presence of ammonia as dopant gas. **International Journal for Ion Mobility Spectrometry**, p.1-8, 2017.

MARTINS, C. R.; MALGARIM, M.; BILHARVA, M.; MARCO, R. NOZ-PECÃ: a rainha dos frutos secos. **Revista Campo & Negócios HF EMBRAPA**, p. 57-61, 2017.

MARTINS, G.L.; FRIGGI, C.A.; PRESTES, O.D.; VICARI, M.C.; FRIGGI, D.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. Simultaneous LC–MS/MS Determination of Imidazolinone Herbicides Together with Other Multiclass Pesticide Residues in Soil. **Clean Soil Air Water**. v. 42, p. 1441–1449, 2014.

MARTINS, M. L.; KEMMERICH, M.; PRESTES, O. D.; MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F.; ZANELLA, R. Evaluation of an alternative fluorinated sorbent for dispersive solid-phase extraction clean-up of the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method for pesticide residues analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1514, p.36-43, 2017.

MASTOVSKA, K.; DORWEILER, K. J.; LEHOTAY, S. J.; WEGSCHEID, J. S.; SZPYLKA, K. A. Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChERS method combined with automated direct sample introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5959-5972, 2010.

MAYOR, A. S.; RODRÍGUEZ, B. S.; HERRERA, A. V.; DELGADO, M. A. R. Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, p.1-22, 2019.

MERCK. Increase Removal of Fat and Pigment from Avocado Extracts Prior to GC-MS Analysis of Pesticide and Metabolite Residues. Disponível em: <

https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/food-beverage /avocado-extracts-zsep.html>. Acesso em: 20 jan. 2018.

NORLI, H. R.; CHRISTIANSEN, A.; DERIBE, E. Application of QuEChERS method for extraction of selected persistent organic pollutants in fish tissue and analysis by gas chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p.7234-7241, 2011.

ORO, T. **Composição nutricional, compostos bioativos e vida útil de noz e óleo extravirgem de noz-pecã [Carya illinoinensis (Wangenh) C. Koch].** 2007. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Comparison of different sorbents in the QuEChERS method for the determination of pesticide residues in strawberries by LC–MS/MS. **Chromatographia**, v. 77, p.1291–1298, 2014.

PANDEY, P.; RAIZADA, R. B.; SRIVASTAVA, L. P. Level of organochlorine pesticide residues in dry fruit nuts. **Journal of Environmental Biology**, v.31, p.705-707, 2010.

PARRILLA, E. A.; LÓPEZ, R. U.; ROSA, L. A. Bioactive componentes and health effects of pecan nuts and their by-products: a review. **Journal of Food Bioactives**, v. 1, p. 56-92, 2018.

PAVKOVICH, A. M.; BELL, D. S. QuEChERS. **Encyclopedia of Analytical Science**, v.3, p.1-6, 2018.

PERESTRELO, R.; SILVA, P.; FIGUEIRA, P. P.; PEREIRA, J. A. M.; SILVA, C.; MEDINA, S.; CÂMARA, J. S. QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 1070, p.1-28, 2019.

PRADO, A.C.P.; MANION, B.A.; SEETHARAMAN, K.; DESCHAMPS, F.C.; ARELLANO, D.B.; BLOCK, J.M. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [Caryaillinoinensis (Wangenh) C. Koch]. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p.64-73, 2013.

PRESTES, D. P.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, p.51-64, 2011.

RAJSKI, L.; LOZANO, A.; UCLÉS, A.; FERRER, C.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1304, p.109-120, 2013.

RASCHE, C.; FOURNES, B.; DIRKS, U.; SPEER, K. Multi-residue pesticide analysis (gas chromatography–tandem mass spectrometry detection) - Improvement of the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method for dried fruits and fat-rich cereals -Benefit and limit of a standardized apple purée calibration (screening). **Journal of Chromatography A**, v. 1403, p.21–31, 2015.

RIO GRANDE DO SUL, 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos /201705/29154122-diretrizes-pro-peca.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2018.

RUTKOWSKA, E.; ŁOZOWICKA, B.; KACZYŃSKI, P. Three approaches to minimize matrix effects in residue analysis of multiclass pesticides in dried complex matrices using gas chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**. v.279, p. 20-29, 2019.

SAITO, Y.; KODAMA, S.; MATSUNAGA, A.; YAMAMOTO, A. Multiresidue Determination of Pesticides in Agricultural Products by Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Large Volume Injection. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists,** v. 87, p.1356-1367, 2004.

SANTE 11945/2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. **European Commission**, rev. 0, p.1-42, 2017.

SAVANT, R. H., BANERJEE, K., UTTURE, S. C., PATIL, S. H., DASGUPTA, S., GHASTE, M. S., & ADSULE, P. G. Multiresidue analysis of 50 pesticides in grape, pomegranate, and mango by gas chromatography-Ion trap mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.58, p.1447-1454, 2010.

SHI, Y.; CHANG, J. S.; ESPOSITO, C. L.; LAFONTAINE, C.; BERUBE, M. J.; FINK, J. A.; ESPOURTEILLE, F. A. Rapid screening for pesticides using automated online sample preparation with a high-resolution benchtop Orbitrap mass spectrometer. **Food Additives & Contaminants**, v.28, p.1383-1392, 2011.

SILVA, L. R.; FERREIRA, M. M. C. Estudo do coeficiente de partição octanol-água de bifenilas policloradas (PCBs) utilizando parâmetros topológicos. **Química Nova**, v.26, p. 312-318, 2003.

SPARKS, D. SPARKS, D. Adaptability of pecan as a species. **Hortscience**, v. 40, p.1175-1189, 2005.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Algunos consejos útiles para el análisis cromatográfico de compuestos orgánicos volátiles. **Scientia Chromatographica**, v. 3, p.199-221, 2011.

TAIPINA, M. S.; LAMARDO, L. C. A.; RODAS, M. A. B.; DEL MASTRO, N. L. The effects of gamma irradiation on the vitamin E content and sensory qualities of pecan nuts (Carya illinoensis). **Radiation Physics and Chemistry**, v. 78, p.611-613, 2009.

THE EUROPEAN PARLIAMENT, 2005. REGULATION (EC) NO 396/2005 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 23 February 2005. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServdo?uri=OJ:L:2005:070:000 1:0016:en:PDF>. Acesso em: 20 jan. 2018.

TSIPI, D.; BOTITSI, H.; ECONOMOU, A. Pesticide chemistry and risk assessment. Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticide Residues and Their Metabolites, 1ª edição, John Wiley & Sons, 2015.

TUZIMSKI, T.; REJCZAK, T. Application of HPLC–DAD after SPE/QuEChERS with ZrO2-based sorbent in d-SPE clean-up step for pesticide analysis in edible oils. **Food Chemistry**, v.190, p.71-79, 2016.

UCLÉS, A.; LÓPEZ, S. H.; HERMANDO, M. D.; ROSAL, R.; FERRER, C.; FERNÁNDEZ-ALBA. Application of zirconium dioxide nanoparticle sorbent for the clean-up step in post-harvest pesticide residue analysis. **Talanta**, v. 144, p.51-61, 2015.

USDA, 2019. Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/sho w/3645>. Acesso em: 07 mar. 2019.

VIEIRA, M. S.; RIZZETTI, T. M.; SOUZA, M. P.; MARTINS, M. L.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Multiresidue determination of pesticides in crop plants by the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method and ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry using a calibration based on a single level standard addition in the sample. **Journal of Chromatography A**, v. 1526, p.119-127, 2017.

WANG, J.; GONG, Z.; ZHANG, T.; FENG, S.; WANG, J.; ZHANG, Y. Simultaneous determination of 106 pesticides in nuts by LC–MS/MS using freeze-out combined with dispersive solid-phase extraction purification. **Journal of Separation Science**, v. 40, p.2398-2405, 2017.

WESKA, R. F.; MOURA, J. M.; BATISTA, L. M.; RIZZI, J.; PINTO, L. A. A. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v.80, p.749–753, 2007.

YAMASHITA, M. G. N. Análise de rótulos e bulas de agrotóxicos segundo dados exigidos pela legislação federal de agrotóxicos e afins e de acordo com parâmetros de legibilidade tipográfica. 2008 Dissertação (Mestrado em Desenho Industrial)-Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2008.

ZHANG, R.; PENG, F.; Li, Y. Pecan production in China. **Scientia Horticulturae**, v. 197, p. 719-727, 2015.