



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

HENRIQUE CARLOS MARINHO PEREIRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS ESPECÍFICOS E AVALIAÇÃO
DA OCORRÊNCIA DE AGROTÓXICOS POLARES EM FRUTAS E SOJA**

Recife
2019

HENRIQUE CARLOS MARINHO PEREIRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS ESPECÍFICOS E AVALIAÇÃO
DA OCORRÊNCIA DE AGROTÓXICOS POLARES EM FRUTAS E SOJA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientador: Profº. Dr. Davi Pereira de Santana

Coorientador: Profº. Dr. Danilo César Galindo Bedor

Recife

2019

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4-1790

S586d Silva, Henrique Carlos Marinho Pereira da
Desenvolvimento de métodos analíticos específicos e avaliação
da ocorrência de agrotóxicos polares em frutas e soja / Henrique
Carlos Marinho Pereira da Silva - 2019.
127 f.: il.

Orientador: Davi Pereira de Santana.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências da Saúde (CCS). Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas. Recife, 2019.

Inclui referências e apêndice.

1. Agrotóxicos. 2. Cromatografia líquida. 3. Espectrometria de
massas por ionização por electrospray. 4. Análise de alimentos. 5. I.
Santana, Davi Pereira de (Orientador). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2021-146)

HENRIQUE CARLOS MARINHO PEREIRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS ESPECÍFICOS E AVALIAÇÃO
DA OCORRÊNCIA DE AGROTÓXICOS POLARES EM FRUTAS E SOJA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Aprovado em: 31 de outubro de 2019

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Danilo Galindo Bedor
(Departamento de Farmácia- PPGCF- UFPE)

Prof.^a Dra. Ivone Antônia de Souza
(Departamento de Farmácia- PPGCF- UFPE)

Prof.^a Dra. Danuza Leal Telles
(Instituto de Tecnologia de Pernambuco – ITEP)

Profº. Dr. Jorge Luiz Neves
(DQF-UFPE)

Profº. Dr. Fernando José Malagueño de Santana
(DCFAR - UFPE)

Dedico este trabalho a Deus que em sua eterna sabedoria nos concedeu o arbítrio de aprender e propagar o conhecimento e aos meus pais que são os instrumentos Dele na missão de educar em virtudes e princípios. Mesmo que eu tente, Queridos Pais, eu nunca conseguirei retribuir a altura toda a entrega de vocês, mas eu irei persistir na missão até o último dia de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A diretoria do Instituto de Tecnologia de Pernambuco em especial a Unidade de Agrotóxicos e de Contaminantes em Alimentos e em Bebidas Alcoólicas – ITEP/LabTox.

Ao meu orientador Prof^o. Dr. Davi Pereira de Santana por me receber em seu laboratório, pela confiança e pela orientação neste trabalho.

Ao meu co-orientador Prof^o. Dr. Danilo Galindo Bedor pela parceria construída e pelo incentivo nos momentos mais importantes do trabalho científico.

A gerente do Labtox/ITEP Dr^a. Adélia Cristina Pessoa Araújo por sua pronta disponibilidade para contribuir com o andamento deste trabalho.

A gerente de Qualidade do Labtox/ITEP Dr^a. Danuza Leal Telles por me incentivar, pela acolhida e por me ajudar bastante nas dificuldades encontradas ao longo da redação do manuscrito.

À todos que foram e são do NUDFAC pelo compartilhamento de conhecimentos e apoio durante o desenvolvimento de todo o trabalho.

Aos colegas do Labtox/ITEP pelo apoio técnico e constante disponibilidade.

RESUMO

O desenvolvimento de métodos requer um estudo prévio para identificar a adequação dos sistemas de análise, extração de amostra, além de buscar o atendimento a critérios de excelência de qualidade dos resultados gerados e a conformidade ao uso pretendido. Cada vez mais, há esforços para que alimentos seguros sejam disponibilizados ao consumidor, fazendo parte desse esforço viabilizar técnicas analíticas que permitam rápida resposta possibilitando a retirada de produtos potencialmente prejudiciais ao consumidor de uma forma mais eficaz. Neste cenário, os laboratórios têm buscado métodos multi-analitos, os quais permitem uma miniaturização de procedimentos extensivos, ou seja, a utilização de um mesmo procedimento de extração e de parâmetros de detecção de forma simultânea para inúmeras moléculas. Entretanto, apesar dos avanços nesta área, muitas moléculas devido as suas características próprias, tem se diferenciado quanto aquelas condições ótimas de análise e por isso mesmo requerem métodos dedicados específicos. Neste trabalho, após uma cuidadosa avaliação, foram identificadas as melhores condições para extração de analitos polares em frutas da região do Vale Submédio do São Francisco (VSMSF) e também para a soja, bem como foram otimizados e desenvolvidos métodos de cromatografia acoplada a detector seletivo de massas LC-ESI-MS/MS. O método desenvolvido foi empregado com sucesso para análise de 1385 amostras de alimentos durante três anos de análises, sendo uma importante ferramenta para avaliação da qualidade dos frutos e da soja coletados em importantes regiões produtoras do Brasil.

Palavras-chave: Agrotóxicos. Cromatografia Líquida. Espectrometria de Massas por Ionização por Electrospray. Análise de Alimentos.

ABSTRACT

The development of methods requires a previous study to identify the adequacy of the systems of analysis, sample extraction, in addition to seeking to meet the criteria of excellence of quality of the results generated and the conformity to the intended use. Increasingly, there are efforts to make safe food available to the consumer, as part of this effort to enable analytical techniques that allow rapid response enabling the withdrawal of potentially harmful products to the consumer in a more effective way. In this scenario, the laboratories have been looking for multianalytical methods, which allow a miniaturization of extensive procedures, i.e., the use of the same extraction procedure and detection parameters simultaneously for countless molecules. However, despite the advances in this area, many molecules due to their own characteristics, have differentiated themselves as to those optimal conditions of analysis and therefore require specific dedicated methods. In this work, after careful evaluation, the best conditions for the extraction of polar analytes in fruit matrices in the Vale Submedio do São Francisco region (VSMSF) and also at the national level for soybean were identified, as well as methods of chromatography coupled with selective mass detector LC-ESI-MS/MS were optimized and developed. The developed method was successfully used for the analysis of 1385 fruit and soy samples during three years of analysis, being an important tool to evaluate the quality of fruits and soy collected in important producing regions of Brazil.

Keywords: Pesticides. Chromatography, Liquid. Spectrometry, Mass, Electrospray Ionization. Food Analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Perspectivas do MAPA quanto a Política de Alimentos Seguros	24
Figura 2 - Consumo de agrotóxicos no Brasil.....	27
Figura 3 - Estrutura química do Diquate (direita) e Paraquate (esquerda).....	30
Figura 4 - Mecanismo envolvido no bloqueio enzimático da EPSP sintase pelo Glifosato. O glifosato é mostrado em vermelho e o S3P em verde.	32
Figura 5 - Estrutura química Fosetyl	35
Figura 6 - Estrutura química do ácido fosfônico	36
Figura 7 - Estrutura química Cloromequate	37
Figura 8 - Estrutura química Etefon (Esquerda) e Etileno (Direita)	38
Figura 9 - Estrutura química 1. MOR 2.TEA e 3.DEA	40
Figura 10 - Reação de formação de um composto N-nitroso a partir do nitrito	41
Figura 11 - Introdução da amostra em uma fonte de ESI e formação do íon.....	43
Figura 12 - Esquema do modo de varredura MRM	44
Figura 13 - Comparação da tecnologia de cromatografia de alta (HPLC) performance e cromatografia de ultra performance (UPLC).....	45
Figura 14 - Ilustração do mecanismo de separação em uma coluna HILIC	46
Figura 16 - Mapa das sub-regiões do VSMSF	54
Figura 17 - Gráfico da exportação de uva e manga da região do VSMSF	55
Figura 18 - Principais produtores de Soja no Mundo (1994-2014).....	56
Figura 19 - Evolução da produtividade da Soja no Brasil.....	57
Figura 20 - Esquema de otimização dos parâmetros da fonte de ionização de ESI como o analisador de massas funcionado no modo de varredura	63
Figura 21 - Esquema de otimização dos parâmetros para o analisador de massas funcionado no modo íon produto.....	64
Figura 22 - Esquema de otimização dos parâmetros para a fonte de ionização (ESI) com o analisador de massas funcionado no modo íon produto.	65
Figura 23 - Espectro de massas para o CQ (ESI ⁺) analisador em modo de varredura (full scan).....	73
Figura 24 - Espectro de massas para o CQ (ESI ⁺) analisador em modo de varredura dos íons produzidos (<i>product ion scan</i>).....	74
Figura 25 - Espectro de massas para o PQ (ESI ⁺) analisador em modo de varredura (full scan).....	75

Figura 25 - Espectro de massas para o PQ (ESI ⁺) analisador em modo de varredura dos íons produzidos (<i>product ion scan</i>).....	75
Figura 27- Espectro de massas para o DQ (ESI ⁺) analisador em modo de varredura (full scan).....	76
Figura 28 - Transições de massas, voltagem de cone energia de colisão para a molécula de DQ.....	77
Figura 29 - Espectro de massas para o DQ (ESI ⁺) analisador em modo de varredura dos íons produzidos (<i>product ion scan</i>).....	77
Figura 30 - Espectro de massas para o Fosetil (ESI ⁻) analisador em modo de varredura (full scan).	77
Figura 31 - Espectro de massas para o Fosetil (ESI ⁻) analisador em modo de varredura dos íons produzidos (<i>product ion scan</i>)	78
Figura 32 - Espectro de massas para o Etefom (ESI ⁻) analisador em modo de varredura (full scan)	79
Figura 33 - Espectro de massas para o Etefom (ESI ⁻) analisador em modo de varredura dos íons produzidos (<i>product ion scan</i>)	79
Figura 34 - Espectro de massas para o MOR (ESI ⁺) analisador em modo de varredura (full scan)	80
Figura 35 - Espectro de massas para o MOR (ESI ⁺) analisador em modo de varredura dos íons produzidos (<i>product ion scan</i>)	80
Figura 36 - Espectro de massas para o DEA (ESI ⁺) analisador em modo de varredura (full scan)	81
Figura 37 - Espectro de massas para o DEA (ESI ⁺) analisador em modo de varredura dos íons produzidos (<i>product ion scan</i>)	81
Figura 38 - Espectro de massas para o TEA (ESI ⁻) analisador em modo de varredura (full scan).....	82
Figura 39 - Espectro de massas para o TEA (ESI ⁻) analisador em modo de varredura dos íons produzidos (<i>product ion scan</i>).....	82
Figura 44 - Gráfico de resíduos e curva de calibração para o PQ: gráfico de resíduos (acima) e a curva de calibração (abaixo).	87
Figura 45 - Cromatogramas do para a testemunha de soja (esquerda) e na amostra fortificada com PQ (direira).....	88

Figura 46 - Dispersão dos resultados obtidos para o ETH em amostras de uvas nos três anos de monitoramento. A parte inferior do box plot defini os percentis 25 e 75, a linha horizontal dentro da caixa corresponde ao valor da mediana e as linhas verticais são um indicador da variabilidade dos dados.....	91
Figura 46 – Resultados obtidos para determinação de ácido fosfônico em manga ..	93
Figura 47 - Quantitativo de amostras com resíduos de MOR, DEA ou TEA quantificáveis (laranja) e <LOQ.....	95
Figura 48 - Concentrações (mg.Kg ⁻¹) de DEA (esquerda) e TEA (direita) determinadas nas amostras de frutas	96
Figura 45 - Quantidade de amostras analisadas segundo o estado onde foram coletadas as amostras e total de amostras positivas para o herbicida PQ.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações sobre o percentual de redução do agrotóxico no plantio de culturas após implantação do PIF.	24
Tabela 2 - Quantitativo dos Registros de Herbicidas	29
Tabela 3 - Principais trabalhos analíticos com análise por MS/MS, citados na literatura relativos aos agrotóxicos polares e substâncias afins que são estudadas no presente trabalho em matriz de origem vegetal	48
Tabela 4 - Matriz de análise, região de Estudo e Substância Química de interesse analisadas	58
Tabela 5 - Características químicas dos padrões das substâncias químicas de referência do estudo.....	59
Tabela 6 - Curva de calibração em matriz para análise de Glifosato, Fosetil Al e ácido fosfônico.....	60
Tabela 7 - Curva de calibração extraída para análise CQ, DQ, PQ e Glifosato	61
Tabela 8 - Curva de calibração para análise de Morfolina, Dietanolamina e Trietanolamina.....	61
Tabela 9 - Coluna cromatográfica, característica da cromatografia e substância química.....	62
Tabela 10 - Parâmetros da fonte ESI recomendados pelo fabricante	63
Tabela 11 - Condição de análise de Etefon, Fosetil-Al, Acido Fosfonico e Glifosato para o sistema Acquity® UPLC	66
Tabela 12 - Condição de análise de MOR, DEA, TEA para o sistema Acquity® UPLC.....	66
Tabela 13 - Condição de análise de CQ, DQ e PQ para o sistema Acquity® UPLC	67
Tabela 14 - Transições de massas, voltagem de cone energia de colisão para a molécula de CQ.....	74
Tabela 15 - Transições de massas, voltagem de cone energia de colisão para a molécula de PQ.....	75
Tabela 16 - Transições de massas, voltagem de cone energia de colisão para a molécula de Fosetil	78
Tabela 17 - Transições de massas, voltagem de cone energia de colisão para a molécula de Etefom.....	79

Tabela 18 - Transições de massas, voltagem de cone energia de colisão para a molécula de MOR.....	80
Tabela 19 - Transições de massas, voltagem de cone energia de colisão para a molécula de DEA	81
Tabela 20 - Transições de massas, voltagem de cone energia de colisão para a molécula de TEA.....	82
Tabela 23 - Condição de análise de Etefon, Fosetil-Al, Acido Fosfônico e Glifosato para o sistema PREMIER MS/MS	84
Tabela 24 - Condição de análise de MOR, DEA, TEA para o sistema PREMIER MS/MS	84
Tabela 25 - Condição de análise de PQ, DQe CQ para o sistema XEVO TQS MS/MS	85
Tabela 24 – Resultados para os parâmetros de validação obtidos após a análise estatística dos dados.....	85
Tabela 27 - Matriz , Substância Química determinada e quantidade de amostras analisadas de acordo com o período	89
Tabela 28 - Incidência e concentração dos resíduos de ETH encontrados nas amostras de uva analisadas durante os anos de 2016, 2017 e 2018.	90
Tabela 27 – Resultados (mg Kg ⁻¹) para os resíduos de glifosato encontrados nas amostras de soja analisadas.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AchE	Inibição da Atividade da Acetilcolinesterase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APL	Arranjo Produtivo Local
AQC	Controle de Qualidade Analítico
BVL	Escritório Federal de Proteção aos Consumidores e Segurança Alimentar
CV%	Coeficientes de Variação
DC	Corrente Direta
DEA	Dietanolamina
CQ	Clomequate
DQ	Diquate
ECHA	Agência Química Europeia
EFSA	Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos
EPSP	Enzima 5-Enolpiruvil Shikimato-3-Fosfato
ESI	Fonte de Electrospray
ETH	Etefom
EU	União Europeia
EUA	Estados Unidos da America
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
IARC	Agência Internacional de Investigação do Câncer
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LC	Cromatografia Líquida
LC MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas
LC-ESI-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas com fonte de Electrospray
LMR	Limites Máximos de Resíduos
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIP	Manejo Integrado de Pragas
MIP	Manejo Integrado de Pragas
MOR	Morfolina
OMS	Organização Mundial de Saúde

PARA	Programa de Análise de Resíduos em Alimentos
PIF	Produção Integrada de Frutas
PQ	Paraquate
PTE	Produtos Técnicos Equivalentes
QACs	Compostos de Amónio Quaternário
QuPPe	<i>Quick Method For The Analysis Of Numerous Polar compounds</i>
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
RF	Radiofrequência
SBCPD	Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas
SRM	Monitoramento de Reações Seleccionadas
TEA	Trietanolamina
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos EUA
VSMSF	Vale Submédio do São Francisco
Kv	Voltagem capilar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivos gerais	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	JUSTIFICATIVA	21
4	REFERENCIAL TEÓRICO	22
4.1	Agrotóxicos e a segurança de alimentos	22
4.2	Herbicidas, fungicidas e substâncias químicas afins utilizados na agricultura	28
4.2.1	Herbicidas	28
4.2.1.1	<i>Paraquate (PQ) e Diquate (DQ)</i>	29
4.2.1.2	<i>Glifosato</i>	31
4.2.2	Fungicida: Fosetyl Al	34
4.2.3	Regulador de crescimento vegetal: Etefom (ETH) e Cloromequate (CQ)	37
4.2.4	Emulsificantes de ceras utilizadas em frutos: Morfolina , Dietanolamina e Trietanolamina	40
4.3	Técnicas analíticas	42
4.3.1	Espectometria de massas	42
4.3.2	Cromatografia em fase líquida	45
4.3.2.1	<i>Revisão dos métodos analíticos: determinação de compostos do estudo por LC MS/MS</i>	47
4.3.3	Métodos de extração	51
4.4	Garantia da qualidade analítica	52
4.5	Fruticultura no Vale do São Francisco	53
4.6	Cultivo da soja	55
5	MATERIAL E MÉTODOS	58

5.1	Matriz de análise, área de estudo e substâncias químicas	58
5.2	Substâncias químicas e reagentes.....	58
5.3	Soluções padrão	59
5.3.1	Soluções das curvas de calibração.....	60
5.4	Equipamentos	62
5.5	Otimização do método de análise espectrométrica (ESI-MS/MS).....	62
5.5.1	Fragmentação dos íons precursor.....	64
5.5.2	Parâmetros do analisador de Massas (MS/MS).....	65
5.6	Método de análise cromatográfico	66
5.7	Método de extração das amostras	67
5.7.1	Extração de Glifosato para matriz com baixo teor de água (Grãos de Soja)	68
5.7.2	Extração de Etefom, Fosetil-Al, Morfolina Dietanolamina, Trietanolamina, para matriz com alto teor de água (frutas in natura)	68
5.7.3	Extração de CQ, DQ e PQ para matriz com baixo teor de água (Grãos de Soja)	68
5.8	Validação dos métodos propostos	69
5.8.1	Especificidade	69
5.8.2	Limites quantificação.....	69
5.8.3	Linearidade	70
5.8.4	Veracidade/Recuperação.....	70
5.8.5	Precisão	70
<i>5.8.5.1</i>	<i>Repetitividade</i>	<i>70</i>
<i>5.8.5.2</i>	<i>Reprodutibilidade.....</i>	<i>71</i>
6	RESULTADOS.....	72
6.1	Ajustes da cromatografia.....	72
6.2	Otimização dos parâmetros de ionização ESI-MS/MS.....	72
6.2.1	CQ	73

6.2.2	PQ.....	74
6.2.3	DQ	76
6.2.4	Fosetil	77
6.2.5	Etefom	78
6.2.6	MOR.....	79
6.2.7	DEA.....	80
6.2.8	TEA.....	81
6.2.9	Parâmetros de análise obtidos de acordo com os sistemas de espectrometria ESI-MS/MS.....	83
6.3	Validação do método de análise	85
6.4	Uso do método desenvolvido para a análise de amostras reais	88
6.4.1	Frutos do VSMF.....	89
6.4.1.1	<i>Determinações de Etefom.....</i>	89
6.4.2	Determinações de Fosetil Al e ácido Fosfônico.....	93
6.4.3	Frutos produzidos no Brasil	95
6.4.3.1	<i>Determinações de MOR, DEA e TEA.....</i>	95
6.4.4	Soja produzida no Brasil	97
6.4.4.1	<i>Determinações de Glifosato.....</i>	97
6.4.4.2	<i>Determinações de PQ, DQ e CQ</i>	99
7	CONCLUSÃO	101
	REFERÊNCIAS.....	103
	APÊNDICE A- MANUSCRITO.....	119

1 INTRODUÇÃO

As substâncias químicas sintéticas utilizadas na agricultura têm sido investigadas e regulamentadas em todo o mundo. De acordo com a Agência Química Europeia (ECHA), o seu uso deve ser realizado de modo adequado e em níveis aceitáveis a segurança do consumidor (ECHA, 2017). Para tanto, são definidas regras apropriadas que visam principalmente a segurança de alimentos destinados ao consumo humano, assim como a proteção do meio ambiente.

Existem diversos argumentos a favor do consumo de substâncias químicas como os agrotóxicos e afins. Sem os agrotóxicos não seria possível garantir a sobrevivência da população de nosso planeta. A adaptação e o sucesso do crescimento populacional atualmente são dependentes da utilização e do desenvolvimento de tecnologias químicas para controle de organismos vivos que competem com a espécie humana por alimentos. Dessa forma, a quantidade e variedade de alimentos cresceu como nunca antes evidenciado após o surgimento dos agrotóxicos (DELAPLANE, 1996; MAHMOOD et al., 2016).

A lei brasileira que regulamenta o uso de agrotóxicos é de 1989 e também define sobre a pesquisa e utilização de produtos afins como é o caso de desfolhantes e reguladores de crescimento vegetais e mesmo aditivos utilizados em produtos de origem vegetal (Brasil, 1989). Segundo levantamento de Research (2017), espera-se que ocorra um aumento no consumo de reguladores de plantas e substâncias que tragam apelo comercial aos produtos de origem vegetal *in natura*.

Diante das novas demandas do consumidor, o qual se mostra mais exigente por alimentos seguros e livres de qualquer tipo de contaminante danoso à saúde humana, o mercado internacional adotou programas específicos assegurando o controle de qualidade de toda a cadeia produtiva, inclusive na produção agrícola, que faz uso de diversos tipos de agrotóxicos e substâncias químicas afins como meios tecnológicos para garantir a produtividade no campo. Destacam-se a observação aos Limites Máximos de Resíduos (LMR) permitidos, a sanidade e a higiene do processo produtivo e de embalagem, a rastreabilidade, dentre outros.

Existe uma tendência de uso dos agrotóxicos e substâncias afins na agricultura com baixa característica de persistência no meio ambiente e reduzida atividade bioacumulativa. De acordo com Pico (2008), essas substâncias representam uma transição entre o uso de moléculas de caráter lipofílico e persistentes e substâncias

químicas mais polares, estas últimas apresentam degradação mais rápida no ambiente e, por conseguinte, temos menor quantidade de resíduos presentes nos alimentos.

Com isso, agrotóxicos como PQ, DQ, CQ, Glifosato, Fosetil Al e substâncias afins como MOR, DEA, TEA e mesmo o Etefom (ETH) tem sido, via de regra, utilizados na “agricultura moderna”, uma vez que são de média a alta polaridade, de baixa persistência e sendo utilizados de forma adequada são fundamentais para produção segura de alimentos.

O desenvolvimento de métodos analíticos para análises de agrotóxicos e afins estabelece uma série de requisitos técnicos a serem atingidos a partir de parâmetros de validação fundamentais à garantia dos resultados analíticos. Os procedimentos de análise buscam eficiência através de métodos cada vez mais simplificados que permitam identificar simultaneamente o maior número possível de moléculas para aquela técnica. O uso pretendido dos novos métodos precisa atender as regulamentações e apresentar resultados no menor tempo possível, uma vez que por se tratar de alimentos é necessário que os órgãos de fiscalização possam evitar a exposição humana a esses agentes rapidamente.

No entanto, para a análise de compostos de alta polaridade, que possuem distintas propriedades físico-químicas é exigida a introdução de métodos específicos ou dedicados (do inglês, *single residue methods*) com vista ao atendimento a demandas analíticas necessária a avaliação da segurança dos alimentos produzidos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Desenvolver e validar métodos específicos para analisar resíduos de contaminantes polares em alimentos de origem vegetal, em especial as frutas da região do Vale Submédio do São Francisco (VSMSF) e grãos de soja com procedência de diversas regiões produtoras do Brasil.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método para determinação dos herbicidas: Clomequate, Diquate, Paraquate e Glifosato em soja;
- Realizar levantamento dos níveis de herbicidas identificados nas culturas de soja proveniente de diversos locais do Brasil;
- Desenvolver e validar um método para determinação do fungicida Fosetil Al e seu produto de degradação (ácido fosfônico) na cultura de manga;
 - Realizar pesquisa na região do Vale Submédio São Francisco quanto a presença do fungicida Fosetil Al e seu produto de degradação na matriz manga;
- Desenvolver e validar um método para determinação do regulador de crescimento vegetal Etefom na matriz uva;
- Realizar análises dos níveis de Etefom encontrados nas uvas da região da região do Vale Submédio São Francisco;
- Desenvolver e validar método para o aditivo de ceras utilizadas em frutos: Morfolina, Dietanolamina e Trietanolamina;
- Identificar os níveis de Morfolina, Dietanolamina e Trietanolamina em frutos provenientes de diversos Estados do Brasil;

3 JUSTIFICATIVA

Alimentos seguros são fundamentais para uma agricultura sustentável, pois, dentre outros fatores, são produzidos com a devida preservação do meio ambiente e entregues ao consumidor com a qualidade adequada. Sendo assim, decorre do uso de substâncias químicas sintéticas na agricultura, a necessidade de monitorar os resíduos de contaminantes originados de práticas químicas no campo, os quais podem comprometer a segurança dos alimentos e provocar danos à saúde dos animais e ao meio ambiente.

O desenvolvimento de métodos para a análise de substâncias químicas altamente polares no Brasil é escasso e restrito a poucas *commodities*. No entanto, é preciso suprir a recente demanda por esse tipo de pesquisa dada a importância para a segurança de alimentos e por atender a setores estratégicos como aquele da exportação de frutas, mais especificamente da região do Vale Submédio São Francisco, onde existe um dos principais arranjos produtivos locais (APL) do Estado de Pernambuco com vocação reconhecida nacionalmente para produção de uva de mesa e manga. O desenvolvimento científico deve acompanhar o reconhecimento da rastreabilidade com a aceitação das avaliações a nível local e internacional.

Secundariamente, a avaliação da conformidade de frutos e da soja quanto a presença de agrotóxicos e substâncias afins, torna possível a cooperação com órgãos públicos em ações de monitoramento e fiscalização da qualidade dos alimentos e do meio ambiente e permite que seja criada novas políticas de controle para reduzir ou eliminar o dano provocado pelo consumo de alimentos contaminados.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Agrotóxicos e a segurança de alimentos

Para atender a uma demanda cada vez maior de alimentos, os processos de produção agrícolas atuais se modernizaram. Entre as tecnologias empregadas temos os agrotóxicos que são utilizados no controle de pragas e doenças que prejudiquem a produção, armazenamento e transporte dos alimentos produzidos no campo. O termo Agrotóxico foi adotado no Brasil e é considerado com amplo significado, pois evidencia a capacidade desses agentes de destruir vida animal ou vegetal, característica que é omitida ao utilizar termos como defensivos agrícolas”. (PERES & MOREIRA, 2003)

De acordo com a legislação brasileira, Lei Federal no 7.802, de 11 de julho de 1989, em seu Artigo 2, Inciso I, os agrotóxicos são definidos como:

Os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso no setor de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbano, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento.

A globalização trouxe juntamente com a expansão do comércio de produtos agrícolas a necessidade de se identificar a procedência e a conformidade dos alimentos (rastreabilidade). Com isso, foram elaborados diversos sistemas de informação e de controle para produção de alimentos seguros, desde a produção no campo até as etapas de beneficiamento. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a antecipação e a prevenção a contaminação alimentar devem constituir o principal meio para proteção do consumidor. Além disso, qualquer aumento acentuado da produção de alimentos através da aplicação de insumos adicionais, como fertilizantes, agrotóxicos e

medicamentos veterinários, predispõe riscos potenciais devido ao seu uso indevido (FAO, 2010).

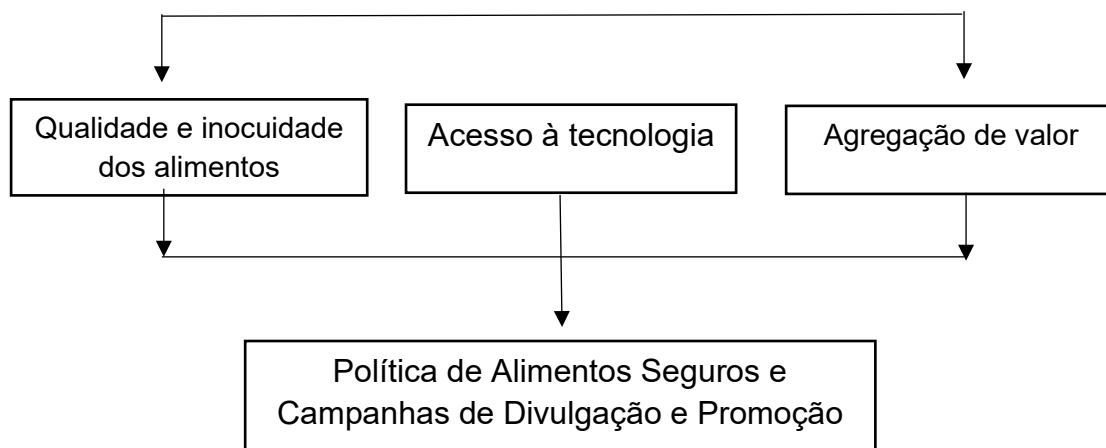
A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que alimento seguro é um atributo essencial de saúde pública, uma vez que alimentos inócuos contribuem para saúde e produtividade e fornecem uma plataforma de desenvolvimento e mitigação da pobreza (SILVA et al., 2015). É certo que os danos à saúde do consumidor podem ocorrer em qualquer ponto da cadeia produtiva. A segurança dos alimentos é uma consequência do controle de todas as etapas da cadeia produtiva. No caso dos agrotóxicos, o risco de contaminação ocorre de forma indireta pela aplicação desses produtos de maneira não recomendada ou mesmo seu uso indevido em culturas para quais não é permitido.

Para FAO, as opções de gestão de risco para segurança de alimentos devem ser iniciadas a partir de avaliações pré-fronteira para certificar que os controles no país exportador resultam em um alimento seguro. No caso dos controles de fronteira, se faz necessário apresentar registro de validações de documentos, inspeção e testes de produtos. Por fim, temos o controle dentro do país importador que pode incluir, por exemplo, registro, licenciamento do alimento. Os controles pós-fronteira também podem ser realizados a partir da inspeção e de testes do produto no importador para avaliar os controles, vigilância e monitorização do produto que foi distribuído no mercado (FAO, 2016).

No âmbito do Brasil, o consumidor é amparado pelo Código de Defesa do Consumidor (Lei nº 8.078, de 11/09/1990), que estabelece direitos básicos como proteção à vida, saúde e à segurança contra riscos provocados por produtos e serviços (BRASIL, 1990). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o responsável por organizar o atendimento das demandas de alimentos seguros, onde temos o consumidor e os mercados envolvidos nas cadeias produtivas (ANDRIGUETO; KOSOSKI, 2007).

Atendendo a essa missão o MAPA tem realizado, dentre outros programas, ações de promoção a produção integrada de alimentos e estabelece dentro de seus processos internos a qualidade e inocuidade dos alimentos como missão desse órgão o que resulta de um esforço nacional por uma política pública de segurança dos alimentos, ou seja, alimentos seguros e sustentáveis com apoio as cadeias produtivas do agronegócio e para a saúde do consumidor (ANDRIGUETO; KOSOSKI, 2007).

Figura 1 - Perspectivas do MAPA quanto a Política de Alimentos Seguros.



Fonte: Adaptado de (ANDRIGUETO; KOSOSKI, 2007).

O programa brasileiro de Produção Integrada de Frutas (PIF) é um modelo que tem viabilizado a população o consumo de alimentos com menores níveis de agrotóxicos. A adoção de medidas de sanidade na cadeia de produção de frutos beneficiou não apenas o mercado externo que exigia rastreabilidade dos alimentos, mas alterou as práticas até então não assumidas no plantio e processamento dos frutos. A seguir são apresentados indicadores da redução de uso de agrotóxicos após a adoção do PIF.

Tabela 1 - Informações sobre o percentual de redução do agrotóxico no plantio de culturas após implantação do PIF.

Produto	Maça	Manga	Uva	Mamão	Caju	Melão	Pêssegos	Citrus
Inseticidas	25	70	89	35,7	25	20,0	30,0	75,0
Fungicidas	15	31,0	42,0	30,0	30,0	10,0	20,0	20,0
Herbicidas	67,0	95,0	100,0	78,0	-	-	50,0	66,7
Acaricida	67,0	72,0	100,0	35,7	-	20,0	50,0	45,0

Fonte: Portocarrero e Kososki (2015).

Atualmente estima-se que a metade dos alimentos produzido anualmente no campo é destruída por pragas agrícolas, em parte isso se deve a alterações nas práticas de manejo (SARWAR, 2015). Muitos esforços têm sido demandados para a introdução de controles químicos que não causem problemas a saúde do consumidor

e também com reduzido danos extensíveis ao meio ambiente. Dessa forma, temos a constante elaboração de substâncias químicas que atendam a requisitos mínimos de segurança dos alimentos. De modo geral, esse desenvolvimento também é associado ao surgimento de novos problemas de pragas e manejo agrícola, desde os anos 1940, é verificado que o número de novas substâncias químicas para agricultura dobra de volume a cada década (Ramos, 2014).

Um dos primeiros alertas a respeito do uso de agrotóxicos foi realizado por Rachel Carson (1962), em seu livro *Silent Spring*. A denúncia constante naquela obra alertou o planeta para o efeito de alguns agrotóxicos no meio ambiente. A partir de então, várias técnicas de cultivo têm sido desenvolvidas para minimizar os efeitos decorrentes do uso intensivo dos agrotóxicos. Por exemplo, no Brasil, existem campos experimentais empregados na avaliação do Manejo Integrado de Pragas (MIP). Os efeitos práticos desses estudos têm se estendido ao campo, como é o caso do MIP na cultura da soja, onde os produtores verificaram uma redução dos custos de produção através do uso racional dos inseticidas nas plantações.

A capacidade do homem de influir na cadeia alimentar através do uso de produtos químicos como os agrotóxicos causou diversos efeitos secundários, como é o caso da toxicidade provocada pela exposição a essas substâncias. A avaliação de toxicidade é realizada para diagnosticar principalmente a ação aguda dessas substâncias quando utilizadas pelo homem ou em organismos inferiores (SEIZE; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014). Com efeito, temos o estabelecimento das doses letais (LD_{50}), cujo Ministério da Saúde no Brasil divide os agrotóxicos em quatro classes que partem de extremamente tóxicos a pouco tóxicos (I a IV), esses dados são utilizados para o estabelecimento dos LMRs que visam garantir a segurança do consumidor e a regulamentação do comércio externo. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) subordinada ao MAPA estabelece os LMRs para os diversos tipos de alimentos comercializados no país. Entretanto, o efeito crônico das substâncias químicas não é devidamente avaliado e por vezes a biodisponibilidade das substâncias químicas não é estudada em organismos alvos, o que não torna previsíveis seus efeitos a longo prazo para todas as comunidades e compartimentos ambientais (BRASIL, 1992; BRASIL, 2017).

Recentemente uma nota técnica da ANVISA considerou o tema complexo, pois a ciência ainda não conseguiu estabelecer o nexo causal entre o aparecimento

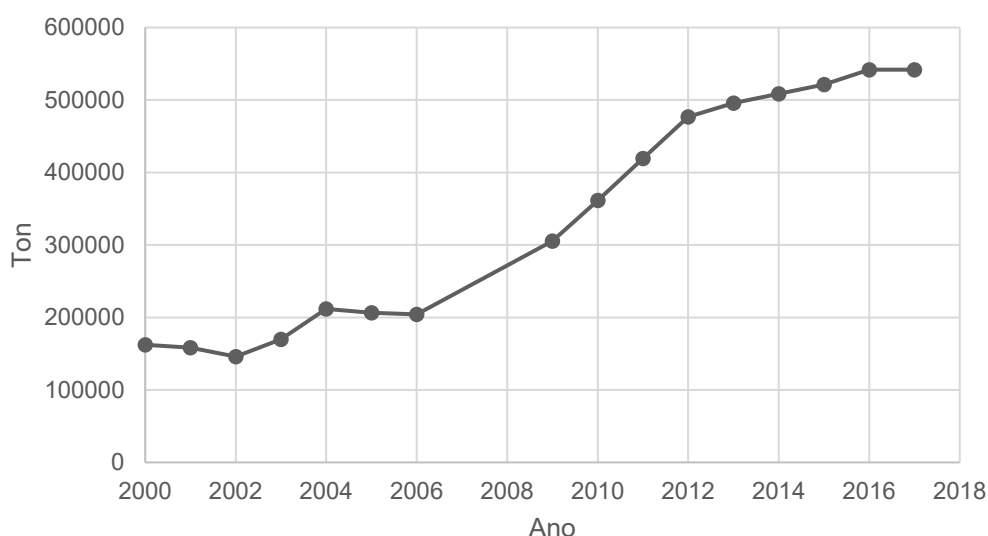
de doenças crônicas e a ingestão de diminutas quantidades de agrotóxicos via alimentos, havendo escassez de estudos publicados a respeito. Isto se deve ao fato de que as quantidades residuais ingeridas são relativamente pequenas e o tempo necessário para o desenvolvimento de uma doença crônica é longo, em geral décadas, dificultando a observação de associação entre exposição e doença (ANVISA, 2017). Deve-se considerar também o efeito sinérgico dos compostos aplicados, que podem ser maiores do que a soma dos efeitos isolados, entretanto não está prevista na legislação dos agrotóxicos brasileira (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009)

O Brasil não tem investido de forma satisfatória em sistemas que garantam a redução do uso dos agrotóxicos e com isso a segurança dos alimentos é comprometida. No passado, mais precisamente na década de 70, políticas agressivas de introdução dessas substâncias levaram a prevalências das práticas químicas na agricultura (ALVES FILHO, 2000). Recentemente é verificada uma mudança no paradigma de consumo devido exigências de regulamentação do setor agrícola com o uso de produtos que não se acumulem no meio ambiente, porém o registro de substâncias químicas “modernas”, consideradas menos persistentes, vem aumentando progressivamente. Ao utilizar esses produtos, em muitos casos, não estão sendo observados aquelas recomendações expressas pelo fabricante o que provoca a contaminação dos alimentos com prejuízos ao meio ambiente e ao consumidor.

É preocupante o crescimento acentuado de substâncias químicas no campo. Segundo O MAPA, foram registrados em 2016, cerca de 277 novos agroquímicos no ministério, um recorde histórico. Do total, 161 foram Produtos Técnicos Equivalentes-PTE's (genéricos), com alta de 374% comparada a 2015, quando foram registrados 43 PTE's. Em 2015, foram registrados 139 novos produtos. A média histórica anual é de 140 registros. O ano recorde de registros era 2007, com 203 novos produtos. Cabe ressaltar que a diretoria de agroquímicos considerou como uma evolução da qualidade e dos produtos ofertados. (BRASIL, 2017a)

Em termos de consumo dos agrotóxicos o Brasil, desde 2008, ocupa lugar de destaque sendo um dos maiores consumidores mundiais, em 2013 as culturas de soja, cana-de-açúcar, milho e algodão foram responsáveis por 80% dos agrotóxicos consumidos no país (CARNEIRO ET AL., 2015).

Figura 2 – Consumo de agrotóxicos no Brasil



Fonte: IBAMA, 2018.

Sendo assim espera-se que os agrotóxicos estejam presentes nos mais diversos alimentos consumidos. A ocorrência de resíduos de agrotóxicos nos alimentos fica evidente em relatórios recentes do Programa de Análise de Resíduos em Alimentos (PARA) de origem vegetal para o período de 2013 a 2015 (BRASIL,2016):

Do total das amostras monitoradas, 9.680 amostras (80,3%) foram consideradas satisfatórias, sendo que 5.062 destas amostras (42,0%) não apresentaram resíduos dentre os agrotóxicos pesquisados e 4.618 (38,3%) apresentaram resíduos de agrotóxicos dentro do Limite Máximo de Resíduos (LMR), estabelecido pela Anvisa. Foram consideradas insatisfatórias 2.371 amostras (19,7%), sendo que 362 destas amostras (3,00%) apresentaram concentração de resíduos acima do LMR e 2.211 (18,3%) apresentaram resíduos de agrotóxicos não autorizados para a cultura.

A análise desses dados demonstra a importância de políticas que promovam alimentos seguros e sustentáveis a mesa do consumidor, sendo imprescindível para adoção de medidas de controle, educação e incentivo a uma agricultura saudável no

sentido de reduzir ou adequar o uso de agrotóxicos químicos no combate as pragas agrícolas.

4.2 Herbicidas, fungicidas e substâncias químicas afins utilizados na agricultura

As substâncias químicas, empregadas neste estudo, foram organizadas de forma a identificá-las conforme seu uso na agricultura. A descrição mais detalhada das características de cada substância é apresentada nas seções a seguir.

4.2.1 Herbicidas

Herbicidas são uma classe de agrotóxicos utilizada para reduzir ou eliminar a competição das plantas daninhas, as quais causam interferência em áreas de atividade humana, como em culturas agrícolas (CARVALHO, 2013). As primeiras substâncias com essa finalidade eram utilizadas em grandes quantidades, como foi o caso dos boratos, brometo de etila e cloreto de sódio. Sua ação era inespecífica e além disso foram consideradas um sério risco a saúde do consumidor (DEUBER, 2006). Por volta de 1908, pesquisadores como Bolley (EUA), Bonnet (França) e Schulz (Alemanha) usaram sais de cobre e depois ácido sulfúrico para o controle de plantas daninhas em cereais (ZIMDHALL, 2013).

O uso moderno dos Herbicidas faz parte da terceira era da agricultura, a qual foi impulsionada pelo uso de fertilizantes e agrotóxicos. A partir de 1940 passaram a ser desenvolvidos herbicidas como o 2,4-D (POKORNY, 1941). Entretanto, a divulgação das propriedades dos fenoxiácidos na agricultura teve início apenas após a segunda guerra mundial. A exemplo dos Estados Unidos, o Brasil criou o seu primeiro grupo de estudos de ervas daninhas em 1963, atual Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (SBCPD). Amidas, carbamatos e triazinas surgiram na década de 1950, hoje quase 50% dos agrotóxicos comercializados são herbicidas (OLIVEIRA JUNIOR, 2011).

Tabela 2 – Quantitativo dos Registros de Herbicidas

	ANO								
	1967	1970	1974	1979	1983	1989	1994+1998	2002	2014
Total de Herbicidas sintetizados	97	115	125	137	130	145	163	211	230
Número de famílias Químicas	27	27	32	37	35	43	63	75	-

Fonte: Adaptado de Zimdahl (2007)

Os modos de ação dos herbicidas podem ser evidenciados pelo processo vegetal afetado, existe uma grande diversidade de estruturas químicas para os herbicidas, entretanto a classificação mais adequada leva em conta seu modo de ação e estrutura química (ZIMDHAL, 2013).

4.2.1.1 Paraquate (PQ) e Diquate (DQ)

O Paraquate (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium) e o Diquate (1,1'-etileno-2,2'-bipiridinium) (Figura 4) são herbicidas de bipiridílio que tem como propriedades físicas importantes a facilidade de manuseamento (sais cristalinos), baixo teor de Pressão de vapor (vapores mínimos), alta solubilidade em água (soluções de pulverização fáceis de preparar), alto potencial de ligação e rápido funcionamento (uma vez iniciada a fotossíntese) (TAGUCHI et al., 1998). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA), O PQ é um herbicida sintético de contato comercializado como sal de Dicloreto de Paraquate. Os produtos técnicos líquidos variam de 20% a 50% de concentração do princípio ativo, mas as formulações utilizadas no campo variam de 0,07% a 0,14%. Já o DQ é normalmente preparado como o sal de mono-hidrato de dibrometo. Os seus produtos técnicos variam de 15% a 25% em concentrados líquidos, mas as formulações no campo são geralmente 0,23% (ROBERTS; REIGART, 2013).

Figura 3 - Estrutura química do Diquate (direita) e Paraquate (esquerda).



A Imperial *Chemical Industries* da Inglaterra, foi a responsável pela fabricação dos herbicidas PQ e DQ, que teve sua liberação em 1958. A ação desses herbicidas é através da adsorção pelas folhas que ocorre de maneira muito eficiente por esses produtos serem comercializados com adjuvantes não iônicos acrescentados a formulação. Por ser uma substância de caráter catiônico, oferece uma baixa persistência no meio ambiente, permanecendo no local onde é realizada a aplicação. Ambos os herbicidas agem rapidamente e normalmente são observados seus efeitos dentro de várias horas e certamente dentro de alguns dias. A translocação é pobre e a cobertura foliar completa é essencial para o bom controle de ervas daninhas. Não são recomendados para o controle de plantas perenes, pois não são translocados para as raízes, sendo assim são de ação local (AG, 2017).

O PQ é mais ativo em gramíneas e DQ em folhas largas. Ambos são tóxicos para os seres humanos por contato com a pele, inalação ou ingestão. Tem características de herbicidas não seletivos e matam ou afetam qualquer folhagem de plantas que eles entram em contato (ZIMDAHL, 2013).

O local de ação do PQ e DQ são os cloroplastos, agindo no sistema da fotossíntese I, que produz elétrons livres. Ocorre a formação de radicais superóxidos pela reação do herbicida com os elétrons livres desse sistema. Por serem altamente reativos os superóxidos atacam os ácidos graxos das membranas, esse processo se recicla produzindo maiores quantidades de radicais superóxido, até que não existam mais radicais livres.

O PQ é altamente tóxico para o homem e seus mecanismos de ação têm sido bem estabelecidos (ROBERTS; REIGART, 2013). No ser humano, ocorre o acúmulo de radicais livres em vários órgãos decorrentes da combinação do PQ, especialmente nos pulmões, com efeito ocorrem lesões de oxidação e, eventualmente, fibrose pulmonar irreversível e ferimentos de órgãos vitais. A morte ocorre dentro de poucos dias e é geralmente uma consequência da falha de múltipla dos órgãos quando uma

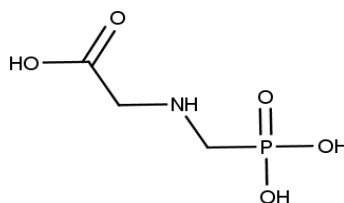
quantidade letal do PQ é ingerida. Da mesma forma que o PQ, os efeitos da ingestão do DQ são semelhantes com corrosão dos tecidos afetados (TSAO et al., 2016).

No passado, o PQ foi usado em muitos países da União Européia (EU) como um herbicida não-seletivo de ação rápida. A autorização de uso no âmbito da EU, aprovada em 2003 foi anulada em 2007 pelo Tribunal Europeu de Primeira Instância, na sequência de um processo judicial iniciado pelas autoridades suecas (EU, 2003; 2007). Entretanto, no Brasil, o PQ tem uso permitido em importantes culturas destinadas para o consumo interno e para exportação, como: trigo (LMR 0,01 mg.Kg⁻¹); banana, uva, maçã, citros e feijão (LMR 0,05 mg.Kg⁻¹); soja LMR (0,1 mg.Kg⁻¹); batata (LMR 0,2 mg.Kg⁻¹) e arroz, LMR (0,05 mg.Kg⁻¹). O Diquate é também permitido no Brasil, sendo amplamente utilizado em citros e pêssego (LMR 0,02 mg.Kg⁻¹); beterraba, café e cebola (LMR 0,1 mg.Kg⁻¹); arroz, batata e soja (LMR 0,2 mg.Kg⁻¹) e feijão (LMR 0,5 mg.Kg⁻¹) (BRASIL, 2017).

4.2.1.2 Glifosato

O glifosato foi lançado pela *Monsanto Chemical Co.* em 1971, é um herbicida não seletivo, derivado N-fosfonometil da glicina, com atividade limitada no solo, devido à sua adsorção rápida e quase completa. Controla gramíneas perenes e tem uma vantagem sobre o PQ, porque se transloca (ZIMDHALL, 2013).

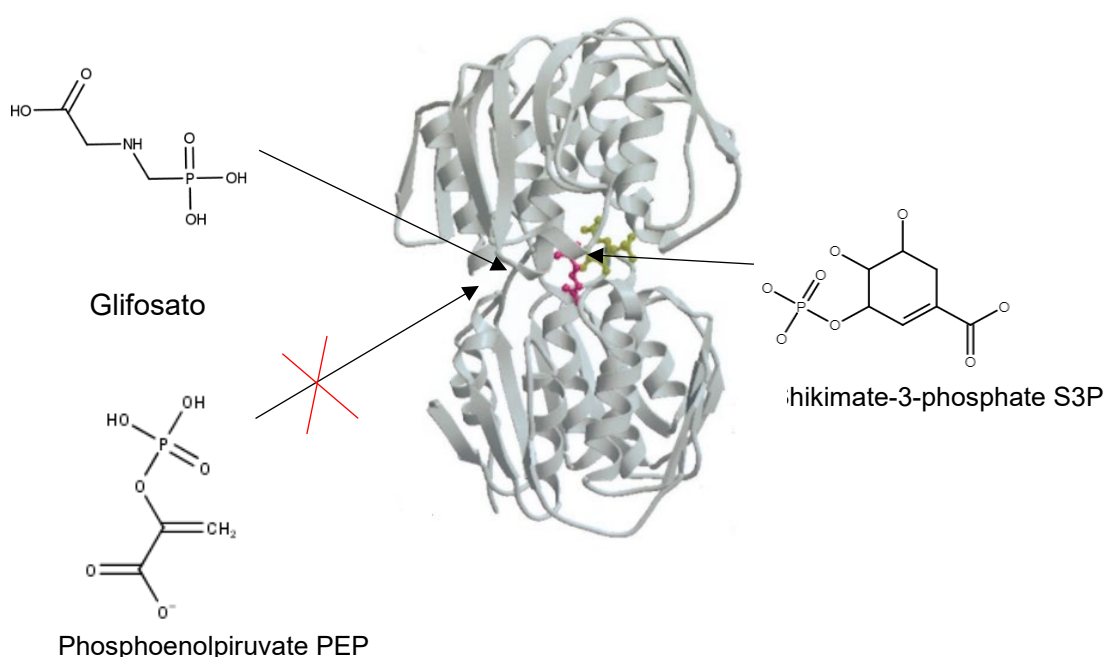
Figura 7 - Estrutura química Glifosato



O glifosato apresenta um espectro muito amplo de controle de ervas daninhas, pois inibe a enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato (EPSP sintase), uma enzima de importância fundamental muito semelhante em todas as plantas (AG, 2017). A enzima EPSP sintase, é comum nas vias sintéticas que conduzem aos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. Esses aminoácidos são essenciais nas plantas como precursores da formação de parede celular, defesa contra patógenos e

insetos e produção de hormônios (DUKE, 1970). O Glifosato ocupa o local de ligação do segundo substrato da enzima EPSP sintase mimetizando um estado intermediário do complexo enzimático ternário de substratos.

Figura 4 - Mecanismo envolvido no bloqueio enzimático da EPSP sintase pelo Glifosato. O glifosato é mostrado em vermelho e o S3P em verde.



Fonte: adaptado de Schönbrunn et al, 2001.

O Glifosato tem uma toxicidade muito baixa nos mamíferos. De forma secundária, o glifosato afeta a respiração, a fotossíntese e a síntese proteica. Sua não seletividade significa que afetará, se não matar, quase qualquer planta que entre em contato. O baixo volume de aplicação é mais eficaz do que o volume alto, e as plantas pequenas são mais facilmente controladas do que as grandes. A atividade do glifosato normalmente não pode ser detectada tão rapidamente e pode demorar vários dias a aparecer seus efeitos após a aplicação (AMARANTE JUNIOR, 2002).

A introdução na década de 1990 de culturas geneticamente modificadas resistentes ao herbicida Glifosato elevou o consumo de glifosato cerca de 15 vezes desde 1996. Ao mesmo tempo, a USEPA aumentou o que considerava uma quantidade segura para o Glifosato em um fator de 17 vezes, além do mais autorizou

um aumento do nível permitido para cultura de milho cerca de 50 vezes maior do que em 1996 (MEIN, 2016).

A elevação da produção de soja no Brasil, que segundo estimativas da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), deve ser recorde histórico em 2017 (107,61 milhões de ton), está intimamente associada ao uso de herbicidas como o Glifosato. Somente para esse herbicida, segundo Valleda (2016), tivemos progressivos aumentos do consumo, por exemplo, em 2011 tivemos o consumo de 44 mil toneladas, já para o ano de 2015 o consumo foi de 129 mil toneladas, segundo o mesmo autor, até agosto de 2016, a importação de glifosato alcançou 89 mil toneladas.

Estudos recentes revelam que o glifosato tem efeitos biológicos alinhados a conhecidas patologias associadas ao autismo. Um desses efeitos é a disbiose observada em crianças autistas e a toxicidade do glifosato para bactérias benéficas que combatem outras patógenas. Além disso, a capacidade do glifosato de facilitar a acumulação de alumínio no cérebro poderia fazer deste a principal causa de autismo nos EUA (BADEN-MAYER, 2015).

Em 1985 a USEPA classificou o glifosato como possivelmente cancerígeno para humanos (Grupo C) com base em evidências de surgimento de tumores em camundongos. Entretanto, em 1991, após uma reavaliação mudou sua classificação com base em evidências da inexistência de carcinogenicidade para humanos (Grupo E). Mais recentemente, o Painel Consultivo Científico da USEPA observou que os resultados do glifosato reavaliados ainda eram significativos usando dois testes estatísticos recomendados no preâmbulo da Agência Internacional de Investigação do Câncer (IARC). O Grupo de Trabalho da IARC, que conduziu a avaliação, considerou as conclusões significativas do relatório da USEPA e vários resultados positivos mais recentes levaram a concluir que existem provas suficientes de carcinogenicidade em animais de laboratório. O glifosato também causou danos ao DNA cromossômicos em células humanas (SUIÇA, 2015).

No Brasil, atualmente, a classificação toxicológica para o Glifosato é IV, ou seja, é considerado um produto pouco tóxico (BRASIL, 2017c). Entretanto, em agosto de 2007 a ANVISA abriu consulta pública para alteração da classificação toxicológica, findo o prazo de um mês, não houve alteração (ANVISA, 2007). Desde 2015, ano do

alerta a IARC, o Ministério Público Federal (MPF) exige conclusão da reavaliação toxicológica do glifosato (NEULS, 2015).

Para os alimentos, o uso do glifosato no Brasil é permitido em várias culturas, temos o menor LMR para a banana que é de $0,02 \text{ mg.Kg}^{-1}$ e o mais alto para cultura de aveia preta sendo de o LMR igual a 20 mg.Kg^{-1} (BRASIL, 2017c). É recomendado, portanto, o monitoramento de resíduos em alimentos de origem vegetal tanto para avaliar as boas práticas agrícolas quanto o cumprimento do intervalo de segurança.

4.2.2 Fungicida: Fosetyl Al

Os fungicidas são agrotóxicos de origem natural ou sintética, que atuam para proteger as plantas contra a invasão por fungos ou para erradicar a infecção fúngica estabelecida (OLIVER; HEWITT, 2014). Atualmente, a maioria dos fungicidas registrados para uso, são pouco prováveis de ocasionar envenenamentos agudos, pois apresentam baixa toxicidade, são ineficientemente absorvidos por mamíferos e os métodos de aplicação recomendados são tais que poucos indivíduos são intensamente expostos (ROBERTS; REIGART, 2013).

Até o final dos anos 60 e 70, as possibilidades de tratamento terapêutico de plantas infectadas com fungos eram limitadas, uma vez que a maioria dos fungicidas desenvolvidos e disponíveis para uso na agricultura permaneciam na superfície da planta, sem penetrar no tecido ou translocar-se para outras partes. Dessa forma não era verificado nenhum efeito sobre o agente patógeno estabelecido no tecido vegetal.

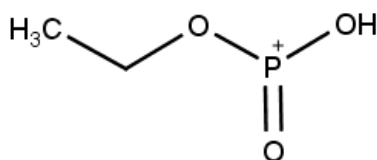
Após esse período foram introduzidos os fungicidas sistêmicos, como o próprio nome sugere, estes compostos apresentavam propriedade de translocação no tecido vegetal, ou seja, o fungicida entra em contato com o patógeno já estabelecido na planta, o que pode resultar na sua eliminação ou redução em seu desenvolvimento. O movimento dos fungicidas dentro da planta, bem como a sua capacidade em alcançar órgãos alvos oferecem algumas possibilidades de ação dessas substâncias no tratamento curativo ou erradicador (depois ou antes de verificada a infestação fúngica). A descoberta e o desenvolvimento de fungicidas sistêmicos ofereceram algumas novas possibilidades na gestão da doença, importantes do ponto de vista prático. De um modo geral, os resultados obtidos em campo mostram que os

tratamentos terapêuticos de plantas com fungicidas são geralmente menos eficientes do que o controle químico preventivo (IVIC, 2010).

Não obstante, os fungicidas sistêmicos com efeitos curativos e erradicantes contribuíram para algumas vantagens significativas na proteção fitossanitária e no controle eficiente e econômico de certas doenças fúngicas das plantas. O fungicida deve atuar no micélio fúngico e oomicetos. Isso pode não ser sempre o caso, mas se o composto fungitóxico chega a estruturas vegetativas ou geradoras de um patógeno sensível em uma planta, certos efeitos na fisiologia e morfologia do patógeno são observados. A supressão da produção de esporos de agentes patogênicos no tecido vegetal infectado pode ser vista como uma consequência indireta da atividade de um fungicida (IVIC, 2010).

O Fosetyl Al ou Alumínio Tris (O-etilfosfonato) foi o primeiro fungicida comercial sistêmico produzido. Quimicamente é um Etil-fosfito e foi descrito pela primeira vez na França em 1970, sua patente foi de propriedade da *Rhone Poulent Agrochimie Company* (Bertrand et al., 1977). O Fosetyl Al foi inicialmente rotulado para o controle de doenças provocadas por *Pythium* em campos de golfe, posteriormente foram identificadas as propriedades antifúngicas dos fosfitos sobre a requeima da batata causada pelo oomiceto (*Phytophthora infestans*), com a consequente redução do crescimento miceliano e da esporulação desse fungo, essas descobertas foram realizadas na França na década de 1970 (CARMONA; SAUTUA, 2011).

Figura 5 - Estrutura química Fosetyl

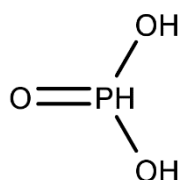


A estimulação das defesas das plantas ou efeitos tóxicos para os fungos foram as hipóteses iniciais para o mecanismo de ação dos fungicidas derivados de sais de ácido fosforoso (fosfonatos) (AFEK; SZTEJNBERG, 1989). O fato do local primário da ação fungicida está dentro do patógeno e não da planta hospedeira foi corroborado pela observação de que concentrações do íon fosfito de 0,1 a 3 mM inibiu

marcadamente o crescimento de micélios de *Phytophthora* em cultura estéril desse fungo (FENN; COFFEY, 1989). De acordo com King et al. (2010), a ocorrência de lise de célula do fungo sugere a ação do fosfito na síntese da parede celular desse microorganismo, o que contribui para hipótese do seu efeito fungitóxico. Por outro lado, Jackson, Burgess e Colquhoun (2000) em seu estudo com *Eucalyptus* demonstrou que uma baixa concentração dos íons fosfitos na raiz produziam uma ativação das enzimas de defesa da planta. Segundo a sua pesquisa, são necessários mais estudos para determinar o período de tempo durante o qual o fosfito protege a planta contra invasão de patógenos. Araújo et al. (2013), observaram no feijoeiro que a ausência ou baixa disponibilidade de fosfato provoca toxicidade acentuada por fosfito, que se mostrou muito sensível a esse ânion. Portanto, ainda não existe um consenso sobre o mecanismo de ação do Fosetil Al. Conforme evidências científicas, a sua atuação parece intrinsecamente associada às diferenças na sensibilidade entre as espécies aos íons fosfitos, assim como às concentrações empregadas e à nutrição fosfatada da planta (THAO; YAMAKAWA, 2009).

Segundo regulamentação da EU: “A definição do resíduo, para efeitos de monitorização, aplicável ao Fosetil abrange o composto parental Fosetil, o produto de degradação Ácido Fosfônico e os seus sais”. Na degradação, o passo inicial é a hidrólise da ligação éster etílico com ácido fosfônico e etanol como os principais metabolitos vegetais. O etanol é ainda dissipado por volatilização ou degradado e incorporado em constituintes naturais de tecidos vegetais e animais (EFSA, 2006). No Brasil a definição de resíduo do Fosetil não inclui o somatório para os seus compostos parentais, como é o caso do ácido fosfônico (BRASIL, 2017).

Figura 6 - Estrutura química do ácido fosfônico



Entre os anos de 2012 e 2015 foi realizado monitoramento na EU dos níveis de fosfanatos em alimentos, a autoridade europeia identificou a presença de resíduos de Fosetil superiores a 2 mg·Kg⁻¹, após a investigação concluiu-se que eram

decorrentes de alimentos nos quais os resíduos do Fosetil Al e seus sais se mantêm abaixo do LQ. Portanto, foi razoável presumir que os resíduos eram decorrentes de adubos foliares e não do Fosetil Al.

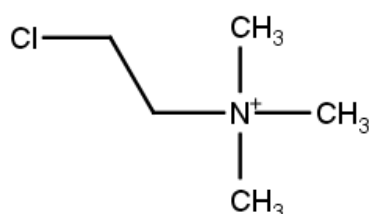
Para a Comunidade Europeia, foram definidos LMR temporários a aplicar-se na ocorrência de resíduos fosfonatos nas culturas relevantes de origem vegetal, esse LMR encontra-se, dependendo da cultura, entre $2 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ e $400 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (EU, 2017). No Brasil temos seis culturas permitidas para uso do Fosetil com LMR entre $0,5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ e $6 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Em nenhum dos casos, porém temos previsto o somatório com o seu metabolito ácido fosfônico (BRASIL, 2017c).

4.2.3 Regulador de crescimento vegetal: Etefom (ETH) e Clormequate (CQ)

Os reguladores de crescimento de plantas, também conhecidos como hormônios exógenos de plantas, são substâncias sintéticas que são semelhantes aos hormônios vegetais naturais. Eles são usados para regular o crescimento das plantas e são produtos importantes para garantir a produção agrícola (MACAU, 2017). Atualmente o uso de reguladores vegetais nas culturas tem potencial na produtividade, muito embora sua utilização não seja prática em plantios de alto nível tecnológico como é o caso da soja (MORTELE et al., 2011).

O Clormequate (CQ) (2-cloroetil trimetilamonium), é uma substância utilizada como regulador de crescimento por reduzir o crescimento e a produtividade da planta (ESPARZA; MOYANO; GALCERAN, 2009). Segundo Paranjap et al. (2014), essa substância inibe o alongamento celular em cereais sendo comparado com os agrotóxicos, exceto com os herbicidas de contato (PARANJAP et al., 2014). O primeiro registro do Cloreto de Clormequate nos EUA foi emitido para a BASF em 1962. Esta utilização inicial foi restrita a estufas de plantas. Em 2006, o EPA autorizou o uso para incluir plantas ornamentais em viveiros e abrigos (USEPA, 2007).

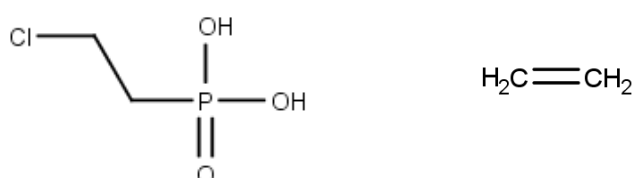
Figura 7 - Estrutura química Clormequate



É uma substância extremamente higroscópica cristalina e é comercializado como um concentrado solúvel e um pó impermeável (PARANJAP et al., 2014). O CQ interfere na síntese do ácido giberélico, causando alterações fisiológicas na planta (MARUR, 1998). Com efeito, o CQ pode ser utilizado para influenciar a produtividade em plantas, como foi o caso do estudo conduzido por Lamas (2001), para o algodoeiro, onde o parcelamento e o esquema aplicação do CQ teve influência no desenvolvimento do algodoeiro.

O Etefom (ácido 2-cloretil fosfônico) é um outro regulador de crescimento vegetal, foi descoberto em 1965 e registrado pela primeira vez como um agrotóxico nos Estados Unidos em 1973. A USEPA publicou uma patente de registro para Etefom em setembro de 1988, requerendo toxicologia, química de resíduos e dados de efeitos animais e efeitos ambientais (USEPA, 1995). É uma substância altamente solúvel em água e estável em solução aquosa com pH < 3,5, liberando etileno em pH mais altos, justamente quando do contato com o tecido vegetal (LEITE, 2005). Nas plantas, o Etefom sofre degradação rapidamente para ácido fosfórico, íons cloreto e etileno, tendo efeito sobre o processo de crescimento vegetal (TOMLIN, 1994).

Figura 8 - Estrutura química Etefon (Esquerda) e Etileno (Direita)



Burg e Burg (1965) observaram a formação do etileno (C₂H₄) nos processos vegetais, podendo promover a maturação dos frutos em várias espécies. Babbitt, Powers e Patterson (1973) identificaram uma aceleração na formação da cor e atividades enzimáticas da celulase e poligalacturase do fruto do tomateiro através do uso do Etefom. Segundo Silva et al. (2007), o Etefom é utilizado como maturador da cana-de-açúcar, além disso foi considerado eficiente na indução de maior perfilhamento e produção final de colmos. Li (2004), verificou que baixas concentrações de Etefom promoveram a diferenciação de feixes vasculares e ampliou as áreas de vasos epigenéticos e floema nas folhas da cana-de-açúcar em regiões

subtropicais na China, assim a alteração do sistema de transporte interno das plantas, aumentou a atividade radicular, diferenciação dos cloroplastos, aumento da área fotossintética total e o teor de clorofila. Além disso, ocorreu modificação das atividades de enzimas que estavam relacionadas ao crescimento e acúmulo de açúcares, produzindo mais talos, acelerando o crescimento e o teor de açúcar nas cultivares.

Fracaro et al. (2004), avaliaram diferentes doses de Etefom antes da poda de videiras para melhorar a brotação e qualidade dos cachos. Nos seus experimentos conduzidos em 2001 e 2002 concluiu-se que a dosagem adequada do Etefom proporcionou cacho e bagas maiores peso, e comprimento e largura, melhorando aspectos importantes para a sua aceitação nos mercados como uma atraente e uniforme baga cor e tamanho, juntamente com a melhoria dos cachos e das bagas de forma geral.

A aplicação do Etefom não produz o mesmo efeito em todas as cultivares e é dependente do estágio fenológico, condições climáticas e dose aplicada na planta. Roberto et al. (2013), observou após a utilização do Etefom uma acentuada coloração das uvas roxas principalmente em variedades onde a coloração era pouco desenvolvida. Aplicações em videiras também podem estimular a brotação das gemas de ciclos anteriores. De acordo com Hirai (2001), podemos enumerar os seguintes usos do Etefom em videiras: processos de desbaste dos cachos, restrição do crescimento de ramos, intensificação da coloração de uvas tintas, aumento do pigmento antocianínico no caso das uvas para vinho, antecipação da maturação dos frutos, melhoria da qualidade do repouso. A versatilidade desse regulador trouxe ganhos consideráveis na produção de uvas em termos de produtividade e qualidade desse fruto.

No caso específico de compostos organofosforados como Etefom ocorre uma preocupação devido aqueles efeitos conhecidos com a exposição crônica a essas substâncias como a inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE) e prevenção da transmissão neural.

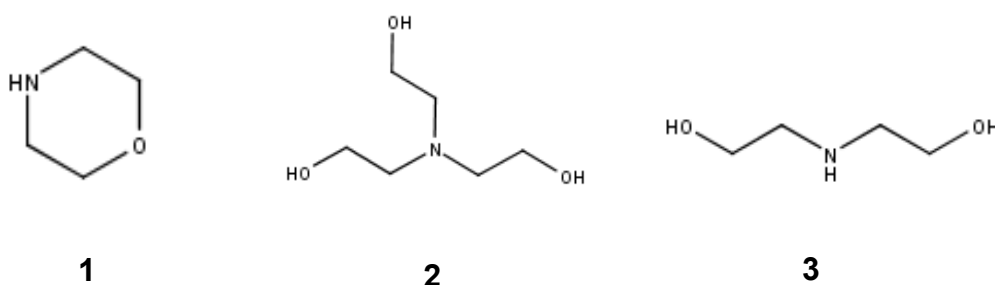
No Brasil o Etefom é permitido para uso em diversas culturas entre elas a que figura com maior LMR é o figo sendo de $2,0 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ por outro lado nas culturas de Uva, Manga o seu LMR é de $0,1 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ (Brasil, 2017). Na EU o LMR pode chegar a $20 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ em amoras, $1,0 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ para uva de mesa, entretanto é predominante o LRM

de $0,05 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ para a maioria dos frutos como manga, limão, mandarina, dentre outras matrizes (EU, 2017).

4.2.4 Emulsificantes de ceras utilizadas em frutos: Morfolina , Dietanolamina e Trietanolamina

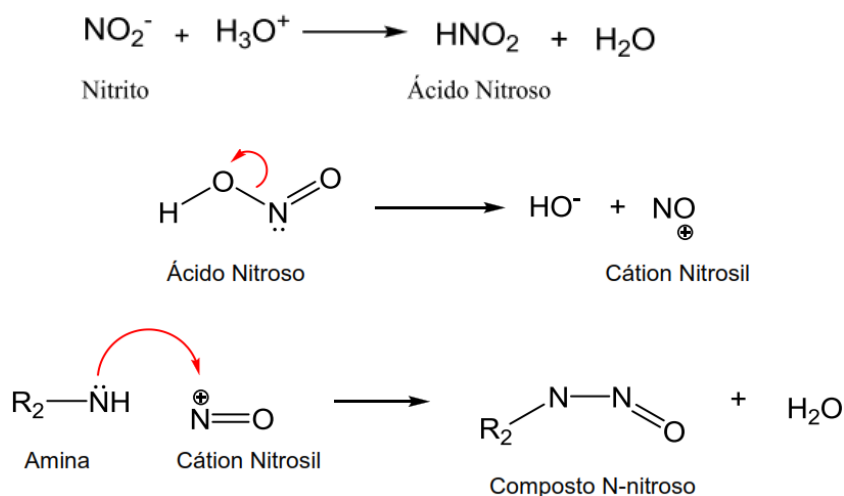
A Morfolina (MOR), Dietanolamina (DEA) e Trietanolamina (TEA) são substâncias químicas sintéticas que apresentam um grande número de aplicações, como por exemplo, derivados de agrotóxicos fungicidas, cosmetologia, intermediários aditivos para produção de borrachas, auxiliar de moagem de cimento, produção de papeis dentre outras (ANGOLA CHEMICALS, 2017; BERGFELD et al., 2011; JUNIOR; MARQUES, 2009).

Figura 9 - Estrutura química 1. MOR 2.TEA e 3.DEA



Destaca-se no Brasil o seu uso como emulsificante de ceras utilizadas na conservação de frutas. Entretanto, estão relacionadas com problemas de toxicidade devido à sua capacidade de, na presença de nitritos, serem transformadas nas N-nitrosamina., conforme apresentado na figura 10.

Figura 10 - Reação de formação de um composto N-nitroso a partir do nitrito



Fonte: Liporine (2016)

Por sua extensa aplicação industrial e agrícola, estas substâncias tornaram-se muito importantes também do para a segurança de alimentos e dessa forma a Europa não estabeleceu LMRs em alimentos para contemplar a MOR, DEA e a TEA, portanto agentes de revestimento são considerados aditivos e necessitam ter aprovação antes de sua colocação no mercado e sua presença em alimentos é considera uma violação sendo impróprio para o consumo. Contudo, são amplamente utilizados como aditivos alimentares nos EUA, Canadá, Austrália, América do Sul, Israel e África do Sul, bem como em outras partes do mundo (KOLBERG et al., 2012).

As ceras utilizadas na proteção dos frutos pós-colheita são consideradas de forma geral como segura para uso na agricultura, são muitos os exemplos de frutos que recebem tratamento para que tenham sua vida de prateleira ampliada evitando a perda de sua matéria fresca, o que representa inclusive um ganho comercial pois os alimentos apresentam características físicas desejáveis pelo consumidor (CARON; JACOMINO; KLUGE, 2003); Além de Proteger a sua superfície contra insetos e fungos, reduz a humidade. Uma das principais vantagens dos emulsionantes à base de MOR são os pontos de ebulição similares da MOR e da água, assim ocorrendo a evaporação da água temos também a da MOR, porém a cera é mantida no fruto conservando-o do meio externo (HUNTSMAN, 2005)

4.3 Técnicas analíticas

4.3.1 Espectrometria de massas

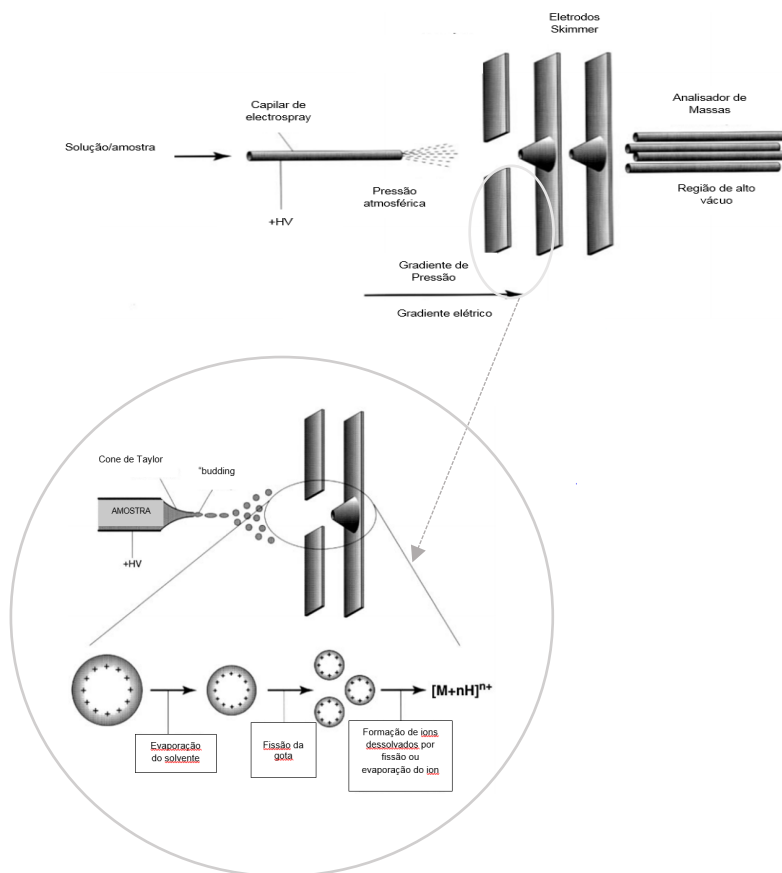
A indústria química e as autoridades sanitárias em diversos países têm desenvolvido protocolos com exigências para que as substâncias químicas de uso na agricultura sejam cada vez menos persistentes e com baixo grau de toxicidade para o consumidor (ITÁLIA, 1989; ESTADOS UNIDOS, 2017). Em paralelo, a regulamentação quanto aos LMRs, existe uma demanda para a quantificação de substâncias a nível de traços ($< 100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (DORWEILER, 2014).

Os métodos de análise quantitativos que empregam as propriedades de interação da luz com a matéria são técnicas tradicionais empregadas nas análises de compostos orgânicos. Porém, a alta seletividade, capacidade de multi-análise, sensibilidade e potencial para análise química qualitativa e quantitativa tornou a espectrometria de massas a técnica preferida para as análises de agrotóxicos e substâncias afins empregadas na agricultura (BOTITSI, TSIPI E ECONOMOU 2017)

Um espectrômetro de massas consiste em um instrumento capaz de identificar substâncias químicas através da sua relação massa/carga (m/z). As moléculas em uma amostra são convertidas em íons em fase gasosa que são subsequentemente separados no espectrômetro de massas de acordo com sua razão massa (m) sobre a sua carga (z). A condição mais importante deste método é a conversão de moléculas neutras de um analito em íons (GASKELL, 1997).

Na fonte de ionização de *Electrospray* (ESI) a ionização das moléculas envolve a produção de íons através da formação de um spray da solução contendo o analito em um campo elétrico (Cone de Taylor). O processo de ionização no ESI ocorre devido à aplicação de um forte campo elétrico que age sobre a superfície da gotícula. À medida que o solvente evapora na região o tamanho da gotícula diminui gradativamente até que sobre somente os íons livres do solvente, os quais passam para etapa seguinte de análise que é o analisador de massas, onde ao contrário da fonte de ESI temos o funcionamento sob alto vácuo, nesta região os íons formados são selecionados nos analisadores de acordo com sua m/z (GASKELL, 1997).

Figura 11 - Introdução da amostra em uma fonte de ESI e formação do íon

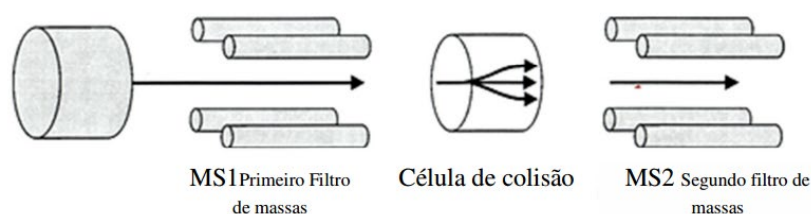


Fonte: Adaptado de GASKELL (1997)

Segundo Skoog et al. (2001), o analisador de massas quadrupolo é mais compacto, mais barato e mais robusto do que qualquer outro tipo de espectrômetro massa. No quadrupolo, os íons de diferente massa/carga (m/z) se separam com a ajuda de um campo elétrico aplicado em um espaço confinado por quatro barras cilíndricas paralelas que atuam como eletrodos nas quais se aplicam a corrente direta (DC) e radiofrequência (RF). O espectrômetro de massas triplo quadrupolo, como o próprio nome sugere, é composto de três quadrupolos: MS^1 , MS^2 e MS^3 . O primeiro (MS^1) e o último quadrupolo (MS^3) atuam como filtros de massas. Em MS^2 os fragmentos do íon de interesse são gerados por dissociação induzida por colisão (do inglês *Collision-induced dissociation*-CID), ou seja, pela colisão de espécies iônicas moleculares com uma molécula de gás. A configuração *tandem* permite realizar análises extremamente seletivas e sensíveis de misturas complexas como: biológicas, ambientais, de alimentos, de extratos naturais, entre outros. Quando operados no modo de varredura por Monitoramento de Múltiplas Reações (MRM, do inglês *Multiple*

Reaction Monitoring) tanto o primeiro quanto o segundo analisador são focalizados nas massas selecionadas, sendo que possível selecionar mais de um íon precursor em MS¹. Os íons selecionados pelo primeiro quadrupolo são fragmentados no MS² e os íons-fragmento são selecionados no MS³. A ausência da varredura permite que o equipamento focalize apenas o precursor em MS¹ e o fragmento em MS³ aumentando a sensibilidade para o monitoramento, que é associada a um aumento da seletividade e da sensibilidade (EBERLIN, 2011).

Figura 12 - Esquema do modo de varredura MRM



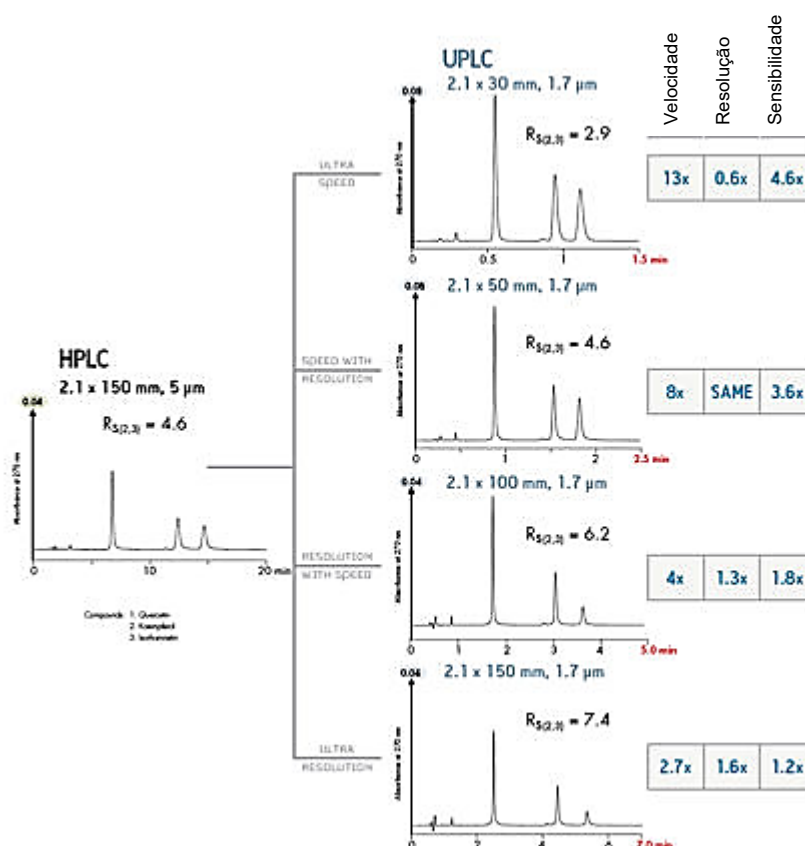
Fonte: Adaptado de Waters Corporation (2005)

A espectrometria de massas acoplada aos sistemas de cromatografia é uma combinação muito poderosa para a identificação inequívoca de moléculas por fornecer simultaneamente: tempo de retenção e dados de abundância relativas entre diferentes transições. É cada vez mais comum a substituição de sistemas de cromatografia com detectores convencionais por outros como os espectrômetros de massas nas análises de contaminantes de alimentos. Esta técnica é amplamente empregada na detecção de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, uma vez que possibilita um aumento na sensibilidade de detecção e reduz a interferência espectral de compostos presentes na matriz.

4.3.2 Cromatografia em fase líquida

A cromatografia líquida (do *inglês liquid chromatography - LC*) tem crescido rapidamente nas últimas décadas, onde verificamos uma evolução constante dos materiais de recheio. Adicionalmente, temos a redução do tamanho das partículas da fase estacionária e também a criação de sistemas de análise capazes de suportar altas pressões acima de 100 MPa. A utilização de partículas menores que 2 μm , caracteriza a cromatografia líquida de ultra eficiência, e sua consequência direta é um menor tempo de eluição dos analitos, ganhos na resolução e sensibilidade, isso porque as menores profundidades dos poros da fase estacionária permitem uma troca mais rápida do soluto da fase móvel com os poros das partículas (MALDANER, JARDIM, 2009; WATERS CORPORATION, 2014).

Figura 13 - Comparação da tecnologia de cromatografia de alta (HPLC) performance e cromatografia de ultra performance (UPLC).

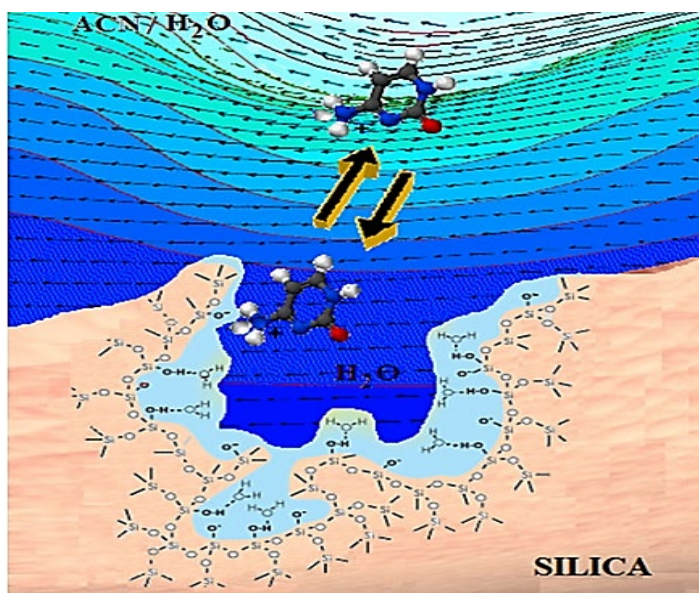


Fonte: Waters Corporation, 2014.

A cromatografia com interação hidrofílica (HILIC, do inglês *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) emprega como eluentes solvente orgânico em alta quantidade e também um eluente contendo água. A ordem de eluição é praticamente contrária aquela da cromatografia em fase reversa. Pode-se dizer de uma forma simples, que a HILIC utiliza uma separação do tipo “fase normal”, inclusive com uma fase estacionária hidrofílica, porém com elementos de fase reversa, especialmente a fase móvel (LANÇAS, 2010).

Comumente a cromatografia HILIC descreve uma partição líquido/líquido entre a fase móvel e a estacionária, uma camada rica em água é formada na superfície da fase estacionária polar, assim temos a distribuição dos analitos entre essa camada rica em água e a fase orgânica de menor polaridade. Segundo Lanças (2010), “Observa-se também a ocorrência de outros tipos de interação entre os solutos presentes na camada aquosa e a superfície polar da fase estacionária”. Tipicamente o aumento da concentração de água no eluente diminui a retenção do analito, o aumento do componente orgânico, como a acetonitrila, causa a retenção do analito na fase estacionária por um tempo maior. (LANÇAS, 2010; MACHEREY-NAGEL, 2017).

Figura 14 - Ilustração do mecanismo de separação em uma coluna HILIC



Fonte: Buszewski e Noga (2011)

4.3.2.1 Revisão dos métodos analíticos: determinação de compostos do estudo por LC MS/MS

Em virtude da importância para segurança de alimentos na prática agrícola e dos riscos para o homem e meio ambiente associado a presença de resíduos de contaminantes, são vários os estudos analíticos desenvolvidos com o objetivo de detecção de resíduos de agrotóxicos e afins em diferentes matrizes. A seguir é apresentado um resumo da literatura para aqueles métodos que empregam a técnica de espectrometria de massas, por ser a técnica mais comum na atualidade empregada nas análises de compostos polares, como é o caso daquelas substâncias químicas objeto de estudo desse trabalho.

Tabela 3 - Principais trabalhos analíticos com análise por MS/MS, citados na literatura relativos aos agrotóxicos polares e substâncias afins que são estudadas no presente trabalho em matriz de origem vegetal

Referência	ANO	País	Método de extração	Coluna cromatografica	Compostos	Matriz/Alimento	Deteção
HANOT et al.	2015	Bélgica	Metanol-Água (95:5, v/v)	ACQUITY BEHC 18 column (1.7µm;2.1×100mm)	CQ	Laranjas e Alfaces	UPLC-MS/MS
ESPARZA et al.	2009	Espanha	Metanol-Formato de amônia 100 mM (1:4,v/v). E Extração em fase sólida Envi™-18 SPE	are silica Atlantis HILIC(150 mm×2.1 mm, 3 µm; Waters, Milford,	CQ	Pão e Cerveja	HPLC-MS/MS
KACZYŃSKI	2017	Polônia	Solução de ácido fórmico 5% em metanol-agua (1:1, v/v/).	Obelisc N column (2.1 mm X 100 mm,5µm particle size)	CQ e PQ	Cebola,trigo,Batata e Ervilhas.	LC-MS/MS
HANOT et al.	2014	E.U.A	Solução de ácido fórmico 0,1% em metanol	zic-HILIC column of 3.5µm, 2.1×100 mm from Merck	Etefom	uvas	HILIC-MS/MS
UGARE et al.	2013	India	Solução de ácido fórmico 1% em metanol	Atlantis T3 (100 X 3 mm,5 µm)	Etefom	Berries	LC-MS/MS
SCHRÜBBERS et al.	2016	Costa Rica	Água, ácido clorídrico 1M, múltiplos tratamentos de extração em fase sólida	BEH C18 XP column (130 Å, 2.5mm particles, 2.1 mm)	Glifosato	Folhas de café	LC-MS/MS
LI et al.	2007	China	Diclorometano e extração em fase sólida	Supelco Discovery C18 column (5µm, 150 mm × 2.1 mm i.d)	Glifosato	Soja,Milho, Farinha de trigo	LC-MS/MS

Tabela 3 - Principais trabalhos analíticos com análise por MS/MS, citados na literatura relativos aos agrotóxicos polares e substâncias afins que são estudadas no presente trabalho em matriz de origem vegetal

Referência	ANO	País	Método de extração	Coluna cromatografica	Compostos	Matriz/Alimento	Deteção
BOTERO-COY et al.	2013	Espanha	Água, diclorometano, extração em fase sólida HLB®, Solução de formiato de amônio 100mM	BEHamide BEH HILIC ObeliscR ObeliscN	Glifosato	Arroz, Soja e milho	LC-MS/MS
CHEN et al.	2013	China	Água	Asahipak NH ₂ P-50 4E	Glifosato	Frutas e vegetais	HPLC-ESI-MS-MS
CHAMKASEM; HARMON	2016	E.UA	Ácido acético 50 mM e Na ₂ EDTA 10 mM	Acclaim™Trinity™Q1 (3µm, 100×3 mm)	Glifosato	Soja e Milho	LC-MS/MS
ANERJEE et al.	2007	India	QuEChERS	Purosphere RP-18 (55 mm×2mm×3µm)	MOR	Uva	LC-MS/MS
HENGEL et al.	2014	E.U.A	Solução de ácido acético 1% em metanol	Primesep-A column(100×2.1 mm i.d., 5.0µm)	MOR	Maças	HILIC-ESI-MS/MS
CHEN et al.	2015	China	Solução de ácido fórmico 1% em acetonitrila-água (1:1, v/v) e limpeza final usando DMSPE	ACQUITY UPLC BEH HILIC Column, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm	MOR	Maças	UHPLC–HRMS
PIZZUTTI et al.	2016	Brasil	Solução de HCl 0,5M	Sielc Obelisc R column (5um, 2.1 mm i.d x 150 mm)	PQ	Feijão Corda	UPLC-MS/MS
KOLBERG et al.	2012	Alemanha	Solução de ácido fórmico 1% em metanol	Obelisc R	PQ	Cevada, Batatas, Cereais e lentilha.	LC-MS/MS
BORDIN et al.	2016	Brasil	QuEChERS	Shim-pack XR-ODS II (3.0 mm × 100 mm, 2.2µm)	PQ	Farinha de trigo integral	LC-MS/MS

Tabela 3 - Principais trabalhos analíticos com análise por MS/MS, citados na literatura relativos aos agrotóxicos polares e substâncias afins que são estudadas no presente trabalho em matriz de origem vegetal

Referência	ANO	País	Método de extração	Coluna cromatografica	Compostos	Matriz/Alimento	Deteção
XIAN et al.	2016	China	QuEChERS	Waters ACQUITY UPLC HILIC chromatographic column (50 mm × 2.1 mm, 1.7µm)	QAC	Leite	UPLC-MS/MS
Friedle, et al.	2012	Austria	Solução de ácido fórmico 0,1% em acetonitrila:água (7:3, v/v)	Kinetex XB-C18 (100A; 2.6 µm; 50x 2.1mm)	QAC	Frutas e vegetais	LC-MS/MS
MARCHESE, et al.	2009	Italia	ASE (do inglês <i>Accelerated Solvent Extraction</i>)	SCX 50 X 4.6 mm	CQ	Trigo	HPLC-MS/MS
ESPARZA, et al.	2009	Espanha	Solução de formato de amônio e extração em fase sólida	BEH Hilic 150 mm×2.1 mm, 3µm	CQ	Pão e Cerveja	HPLC-MS/MS
POLGÁR et al.	2012	Hungria/Espanha	QuEChERS	C18 4.6mm × 50mm, 1,8µm	CQ	Uvas e Vegetais	HPLC-TOF e LC-MS/MS
HANOT, et al.	2015	Bélgica	Solução de metanol-água (95:5, v/v).	C18 1.7µm;2.1×100mm	CQ	Laranjas e Alfaces	UPLC-MS/MS

4.3.3 Métodos de extração

Na atualidade, as extrações de agrotóxicos em matriz de origem vegetal, são realizadas rotineiramente através do método QuEChERS (do Inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*). A evolução do método original QuEChERS permitiu utilizar sais com efeito de tampão. Dessa forma, são aceitos como oficiais três métodos de extração QuEChERS. O método original foi publicado por Anastassiades et al. (2003), no qual não temos o uso de nenhuma substância de efeito tamponante. Porém, outros dois métodos derivaram desse primeiro, dessa vez com uso de um tampão acetato de sódio ou um tampão citrato, respectivamente sendo reconhecidos com o método oficial AOAC 2007.01 e método Europeu EN,15662. Os métodos apresentam basicamente variações no tamanho da amostra utilizada para extração, na formulação dos sais de dispersão e tampão (LEHOTAY et al., 2005).

A literatura é rica em trabalhos que utilizam a extração QuEChERS para as mais diferentes substâncias químicas, esta flexibilidade é um dos atrativos para utilização do conceito “QuEChERS” (KOWALSKY; COCHRAM, 2017; (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011). Han et al. (2016) utilizaram na etapa de limpeza final da extração, em matriz vegetal, nanotubos de carbono, com resultados satisfatório para a análise multi resíduos de 169 agrotóxicos; Cloutier et al. (2016) utilizou a extração QuEChERS, combinada com uma limpeza final dos extratos através de cromatografia de Permeação em Gel, obtendo resultados satisfatórios para 100% dos das substâncias multi classes propostas (dibenzodioxinas policloradas, dibenzofuranos policlorados hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados (PCB), éteres difenílicos polibromados). Liu et al. (2016), fez uso da combinação de acetato de sódio, florisil e C18 para que os agrotóxicos pH dependentes tivessem recuperação satisfatória, o procedimento adotado mostrou-se eficiente nas análises dos 74 agrotóxicos do estudo.

Apesar do sucesso da extração QuEChERS, temos a limitação de análise para substâncias químicas que apresentem uma polaridade elevada, como é o caso daquelas propostas no atual estudo, exceção para os QAC. Os avanços da Química Analítica com a utilização de equipamentos cada vez mais seletivos e sensíveis permitiram a miniaturização e automatização de procedimentos de análise (Prestes, et al., 2011). Recentemente tivemos a divulgação do método QuPPE (do inglês, *Quick Method for the Analysis of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin*

via LC-MS/MS) usado para análise de resíduos de substâncias polares através de uma etapa de extração com uma solução de ácido fórmico em metanol e posterior análise por LC-MS/MS. O método prevê um mesmo procedimento de extração para diversos analitos polares. Entretanto, a etapa de cromatografia é realizada normalmente com colunas de carbono ou Hilic e envolve o uso de diferentes eluentes e fase estacionária de acordo com propriedades das substâncias químicas (ANASTASSIADES, et al., 2016). Apesar da facilidade de extração, o fato do uso de múltiplas colunas para cromatografia dificulta o uso deste método como uma estratégia rápida para fins de triagem (EDISON et al., 2011). Lara et al. (2017), tem uma das propostas mais recentes para análise de substâncias de alta polaridade, através da realização de uma extração nos termos do método QuPPE, porém com a análise espectrométrica através de DART (do inglês, *Direct Analys in Real Time*), dispensando o uso de colunas cromatográficas na etapa inicial de screening dos agrotóxicos. Todavia é necessária uma etapa de quantificação com uso de cromatografia líquida para separação das substâncias químicas de interesse.

4.4 Garantia da qualidade analítica

Garantir os resultados obtidos é fundamental na aplicação de qualquer método de análise (TELLES, 2001). Na avaliação do método analítico são estabelecidos critérios de desempenho necessários à comprovação de atendimento a um requisito especificado, as características de desempenho do método são expressas em termos de parâmetros ou variáveis analíticas, esses critérios são conhecidos como parâmetros de validação (RIBANI et al., 2004).

No Brasil, a Norma NBR ISO/IEC 17025/2017 estabelece os requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração e o atendimento aos seus requisitos é de fundamental importância para os laboratórios que pretendem requerer acreditação junto ao Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) - reconhecimento formal de que o laboratório está operando com sistema da qualidade documentado, é tecnicamente competente e capaz de produzir resultados confiáveis (PAIVA; SAIKE, 2003).

Sem a validação de métodos de análise não há confiabilidade dos resultados, por isso mesmo a comunidade Europeia buscou harmonizar os conceitos relevantes

para área de análises de resíduos de agrotóxicos. As orientações contidas neste documento destinam-se aos laboratórios envolvidos no controle oficial dos resíduos de pesticidas nos gêneros alimentícios e alimentos para animais em toda a União Europeia e descreve os requisitos de validação do método e de controle de qualidade analítico (do inglês, *Analytical Quality Control* - AQC) para apoiar a validade dos dados comunicados no âmbito dos controles oficiais de resíduos de pesticidas e para verificar a conformidade com os LMRs (SANTE, 2015).

O sistema brasileiro de inspeção para área de produtos de origem vegetal, representado pelo MAPA, também elabora manuais com o objetivo de estabelecer parâmetros e critérios de aceitação aplicáveis a validação de métodos analíticos e a rotina analítica de laboratórios, visando garantir a qualidade metrológica dos resultados, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade. Os esforços a nível mundial e nacional visam, inclusive de forma complementar, atender aos requisitos técnicos da norma ISO IEC 17025 (BRASIL, 2011; SANTE, 2015).

Por fim, a aceitação de resultados internacionalmente demanda padronização para que diferentes dados possam ser comparados, aceitos ou descartados. Essa situação é bastante evidente nos processos de credenciamento de laboratórios como forma de garantir o resultado analítico (TELLES, 2001). De acordo com o exposto, todos os métodos utilizados no desenvolvimento da presente pesquisa serão validados em conformidade com os requisitos internacionais de acreditação para ensaios químicos.

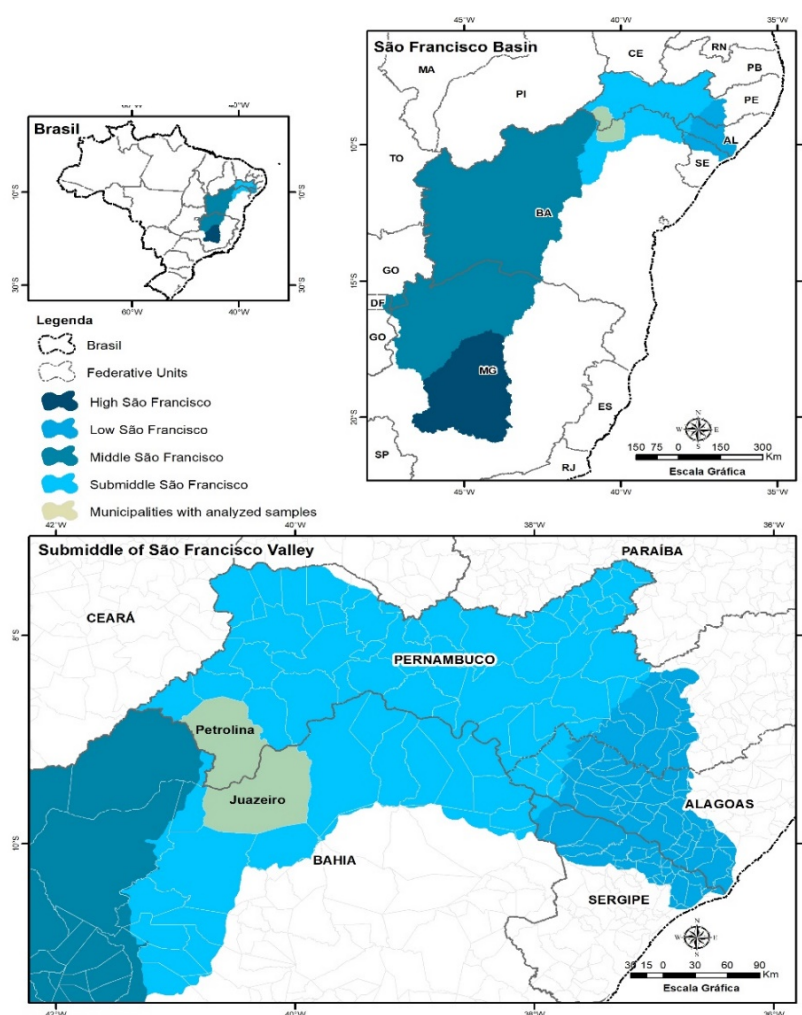
4.5 Fruticultura no Vale do São Francisco

Na última década, a região do VSMSF, que está localizada nos Estados de Pernambuco e Bahia, no denominado “Bioma Caatinga”, vem passando por importantes mudanças em sua matriz produtiva, destacando-se, neste contexto a implantação e desenvolvimento de projetos relacionados a fruticultura e vitivinicultura. A maior parte daqueles frutos produzidos na região é destinada à exportação, sendo de interesse estratégico para o Estado de Pernambuco o desenvolvimento desse setor agrário.

A Região apresenta como características geoambientais pluviosidade baixa e irregular em torno de 750 mm por ano, concentrada em 3 a 5 meses. A estiagem é

caracterizada por precipitação pluviométrica de cerca de 450-500 mm por ano. As temperaturas são altas, com taxas elevadas de evapotranspiração e balanço é negativo durante parte do ano. A insolação é muito forte, 2800 horas/ano e está aliada a baixa umidade relativa. Os solos são oriundos de rochas cristalinas, predominantemente rasos, pouco permeáveis, sujeitos a erosão de razoável fertilidade natural. Fica evidente a necessidade de um suprimento de água utilizada para irrigar cerca de 110 mil hectares a fim de permitir a produtividade de 2,5 safras anuais desse polo produtor. O manejo com alta tecnologia complementa o conjunto de fatores que garantem a alta produtividade e peculiaridades quanto a qualidade dos frutos produzidos naquela região (BRASIL 2017; SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA, 2015).

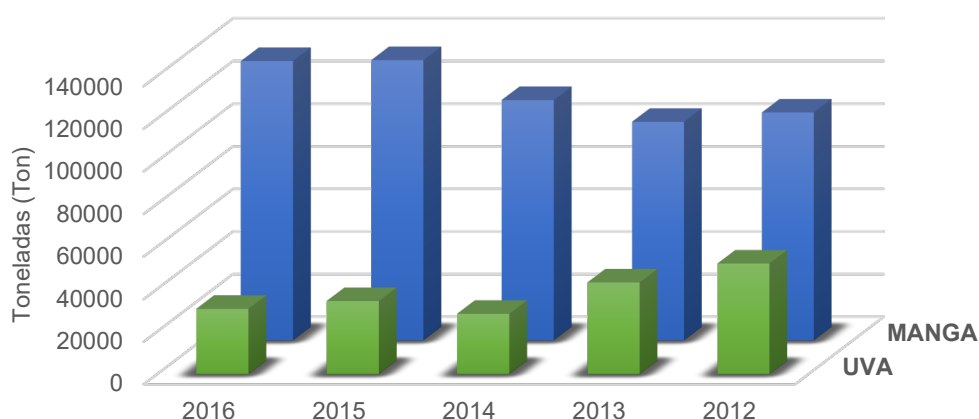
Figura 15 - Mapa das sub-regiões do VSMSF



Fonte: LABGEO/ITEP

A exportação das frutas produzidas tem efeito graças a garantia de rastreabilidade dos frutos que envolve desde a produção até a sua embalagem e transporte. Há distintas exigências feitas por diferentes importadores quanto a qualidade da manga e uva que são exportadas, mesmo estes frutos sendo considerados adequados para o mercado local podem ter avaliação contrária e particular ao país importador. Os produtores têm utilizado estratégias múltiplas para ajuste as exigências do mercado. O constante crescimento e manutenção as exportações de uva e manga, demonstra que essas estratégias têm sido efetivas para consolidação do VSMSF como polo de produção para fruticultura brasileira (CAVALCANTI, 1997; CARVALHO: MIRANDA, 2017).

Figura 16 - Gráfico da exportação de uva e manga da região do VSMSF



Fonte: Aliceweb, 2017.

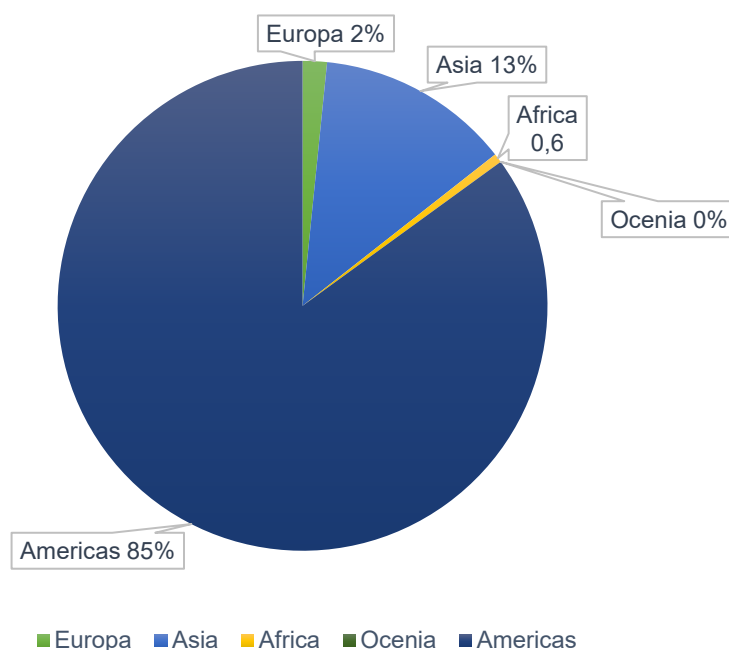
4.6 Cultivo da soja

A Soja (*Glycine Max* (L.) Merr.), tem sua origem na china e é plantada a aproximadamente 5000 anos (GUAN et al., 2010). De acordo com o Departamento de Agricultura Americano - USDA (2013), a soja contém tipicamente 36,5% de proteína, 19,9% de lipídeos, 8,5% de água e 9,3% de fibras.

A importância econômica da soja decorre antes mesmo de sua produção, pois são necessários uma série de insumos e implementos agrícolas, o que caracteriza uma cadeia de agroindústria, além do mais, para que a soja possa ser utilizada precisa passar por um processo de industrialização, o que gera vários produtos como o óleo de soja, o farelo de soja, isolados de soja, dentre outros.

De acordo com a FAO as américas concentram 85% da produção de soja, estando os Estados Unidos (EUA) em primeiro lugar, seguido do Brasil e Argentina. A safra de 2015/2016 de soja no mundo atingiu a produção de 312,362 milhões toneladas, sendo os EUA, responsável por 106,934 milhões de toneladas, o Brasil vem logo em seguida atingindo cerca de 95,631 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2017). Juntos os EUA e o Brasil são os principais exportadores de mais que 80% das exportações do grão de soja a nível mundial (JORNALISMO AGROPECUARIO, 2015).

Figura 17 - Principais produtores de Soja no Mundo (1994-2014)

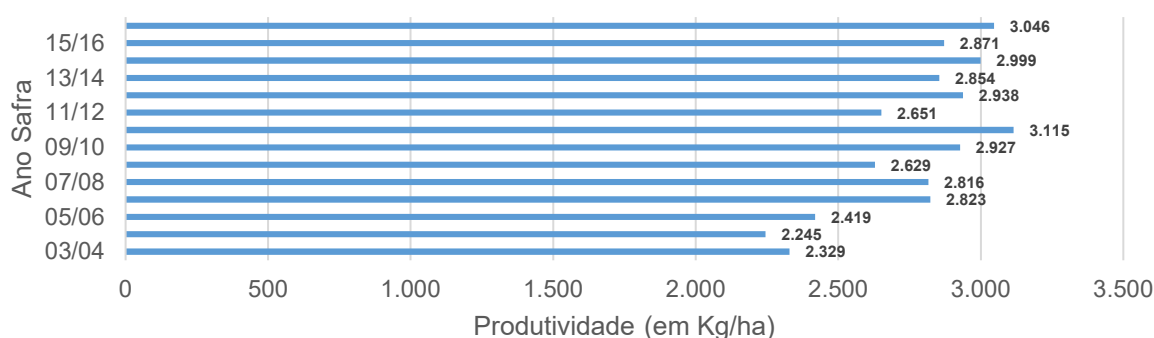


Fonte: FAO, 2017.

Dados da CONAB para a safra 2016/2017 brasileira, indicaram uma produção acima de 100 milhões de toneladas, com intervalos entre 101,9 e 104 milhões de toneladas (CONAB 2017). A soja foi considerada uma colheita rentável e no Estado

de São Paulo está se estendendo devido a vantagens como a melhoria do solo e retorno quase garantido do investimento devido a demanda mundial pelo grão. A expansão da área de produção acompanhou o desenvolvimento tecnológico, o manejo e a eficiência na produção, conforme apresentado no gráfico de produtividade a seguir.

Figura 18 - Evolução da produtividade da Soja no Brasil



Fonte: CONAB, 2017.

Segundo a APROSOJA (Associação dos Produtores de Soja) (2017), o principal destino do grão de soja brasileira é a exportação *in natura* que corresponde a 44% do volume total de produção, entretanto outros 49% são destinados a indústria de processamento. Sendo os 7% restantes utilizados como estoque. No processamento da soja, temos como principal produto o farelo de soja (79%) e a produção de óleo vegetal (21%). Os produtos processados têm como destino final o mercado interno ou a exportação (APROSOJA, 2014).

Apesar de relevante economicamente as importações de soja limitam-se a poucos países. A China é quem mais importa o grão *in natura* representando 65% das importações mundiais de soja, ou seja, oscilações econômicas na china compromete sobremaneira a oferta e demanda mundial dessa *commodity*. Os subprodutos da soja, como o seu óleo são importados principalmente pela Índia, que representou 21,3% na safra 2014/15, já para o farelo de soja temos a EU representando cerca de 35% do total nas últimas cinco safras (JORNALISMO AGROPECUARIO, 2015).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Matriz de análise, área de estudo e substâncias químicas

O VSMSF foi a região de estudo definida para as análises de manga e uva, uma vez que são de elevada expressão para fruticultura no Estado de Pernambuco e por serem aquelas matrizes nas quais os produtores poderiam estar utilizando o Fosetil Al e Etefom, respectivamente. Já para MOR, DEA e TEA, os frutos tiveram procedência de distintos Estados do Brasil.

A soja utilizada nesse estudo teve sua origem de vários estados do Brasil, para essa matriz foram analisadas as substâncias químicas: CQ, PQ, DQ e Glifosato.

As amostras foram recebidas ao longo do ano de 2016 a 2019 por livre demanda dos clientes, o que se dá normalmente em períodos distintos meses do ano.

A seguir é apresentado um quadro resumo com as matrizes de análises, região de estudo e substâncias químicas de interesse.

Tabela 4 - Matriz de análise, região de Estudo e Substância Química de interesse analisadas

Matriz	Área do Estudo	Substância Química
Manga	VSMSF	Fosetil Al, ácido fosfônico
Uva	VSMSF	Etefom
Soja	Brasil	CQ, DQ, PQ, Glifosato
Mamão	Brasil	MOR, DEA, TEA
Manga	Brasil	MOR, DEA, TEA
Uva	Brasil	MOR, DEA, TEA

5.2 Substâncias químicas e reagentes

As substâncias químicas de referências do PQ, CQ, DQ Glifosato e ETH apresentaram certificado ISO guide 34 e foram adquiridos do fabricante Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemanha), as substâncias: Fosetil-Al, DEA e TEA do

fabricante Chem Service (West Chester, EUA), MOR do fabricante Alfa Aesar (Tewksbury, EUA) e o Ácido fosfônico do fabricante Sigma Aldrich (Missouri, EUA), Ácido Fórmico, Ácido Clorídrico, Acetonitrila, Metanol, Formiato de amônio (JT. Baker, Phillipsburg, NJ, USA), todos com grau CLAE. A água ultrapura utilizada foi purificada com sistema MilliQ® (Millipore, Molsheim, France).

Tabela 5 - Características químicas dos padrões das substâncias químicas de referência do estudo

Substância Química	Fórmula molecular	Massa monoisotópica	LogKow*
Ácido fosfônico	H ₃ O ₃ P	81.981.979	1.15
Clormequate	C ₅ H ₁₃ ClN	122.073105	-3.80
Diethanolamine	C ₄ H ₁₁ NO ₂	105.078.979	-1,43
Diquate	C ₁₂ H ₁₂ N ₂	184.098.953	-4.60
Etefom	C ₂ H ₆ ClO ₃ P	143.974.304	-0.22
Fosetyl-Al	C ₆ H ₁₈ AlO ₉ P ₃	353.997.894	-2.1
Glifosato	C ₃ H ₈ NO ₅ P	169.014.008	-3.40
Morpholine	C ₄ H ₉ NO	87.068.413	-0.86
Paraquate	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ N ₂	256.053.406	-4.5
Trietanolamina	C ₆ H ₁₅ NO ₃	149.105.194	-1.00

*Coeficientes de partição octanol-água (KOW) utilizados para prever a sorção do solo e a bioconcentração de pesticidas não iônicos a partir de sistemas aquosos (BOWMAN; SANS, 1983).

5.3 Soluções padrão

As soluções estoque das substâncias químicas de referência foram preparadas a partir da solubilização do padrão sólido em metanol na concentração de 1 mg.mL⁻¹, exceto para o Glifosato e Fosetil Al que foram preparados a uma concentração de 0,2 mg.mL⁻¹. Todas foram armazenadas em frasco Schoot® âmbar com batoque de teflon®, com exceção do Glifosato e PQ que foram armazenadas em frascos plásticos devido suas propriedades de adsorções em superfícies de vidro.

5.3.1 Soluções das curvas de calibração

A partir das soluções estoque foram preparadas soluções de trabalho para uso no preparo da curva de calibração em vários níveis (três ou mais concentrações).

A curva de calibração para o Glifosato, Fosetil Al foi preparada em extrato da matriz. Para tanto, uma solução de trabalho foi preparada a uma concentração de $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em solução de ácido fórmico 1%. Para o preparo da curva de calibração foram utilizados a solução de trabalho, branco da matriz e solução de ácido fórmico 1% em água, conforme indicação da tabela a seguir.

Tabela 6 - Curva de calibração em matriz para análise de Glifosato, Fosetil Al e ácido fosfônico

	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Volume da solução de trabalho (mL)	0,025	0,05	0,1
Volume da amostra branco da matriz (mL)	0,1	0,1	0,1
Volume da solução de ácido fórmico 1% (mL)	0,875	0,850	0,8
Concentração final obtida ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$)	2,5 0,05	5,0 0,1	10 0,2

As determinações para o Ácido Fosfônico (produto de degradação do Fosetil Al) foram realizadas a partir da fortificação da amostra a $2 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, ou seja, uma adição de padrão pontual na própria amostra a ser analisada. Para isso, foi adicionado o volume de 0,1 mL de uma solução de ácido fosfônico preparada em solução de ácido fórmico 1% com concentração de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 0,9mL da amostra ao final de sua extração.

Para as substâncias químicas CQ, DQ e PQ e Glifosato a curva de calibração foi extraída (do inglês, *procedural standart calibration*). Para tanto são feitas extração de amostras fortificadas antes da extração com concentração conhecida do padrão de análise. Volumes definidos (tabela 7) da mistura de trabalho a $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ preparada em solução metanólica de ácido fórmico 1% foram adicionados em 2 g da matriz soja e a seguir, a amostra foi extraída de acordo com o procedimento de extração. Ao final

alíquotas do extrato, foram transferidas para *inserts* de plástico e utilizadas como níveis de calibração.

Tabela 7 - Curva de calibração extraída para análise CQ, DQ, PQ e Glifosato

	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5
Volume da mistura de trabalho (mL)	0,02	0,04	0,05	0,1	0,4
Massa da amostra de soja (g)	2	2	2	2	2
	1	2	2,5	5	20
Concentração final obtida (ng.mL ⁻¹ mg.Kg ⁻¹)	0,01	0,02	0,025	0,05	0,2

A curva de calibração para a MOR, DEA e TEA foi preparada em solução de ácido fórmico a 1% com utilização dos respectivos padrões internos. Para tanto, foram utilizados volumes definidos de uma mistura de trabalho com essas substâncias conforme a tabela 8, cada uma com concentração de 1,0 µg.mL⁻¹ e o volume de 0,1mL dos padrões internos deuterados a 1,0 µg.mL⁻¹ foi adicionado a cada um dos níveis de calibração (tabela 8).

Tabela 8 - Curva de calibração para análise de Morfolina, Dietanolamina e Trietanolamina

	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4
Volume da mistura de trabalho MOR, DEA e TEA (mL)	0,05	0,1	0,25	0,5
Volume da mistura de trabalho do padrão interno MOR, DEA e TEA (mL)	0,1	0,1	0,1	0,1
	5	10	25	50
Concentração final obtida (ng.mL ⁻¹ mg.Kg ⁻¹)	0,01	0,02	0,05	0,1

5.4 Equipamentos

O Sistema de cromatografia líquida foi um UPLC ACQUITY UPLC™ (Waters Corp. Milford, Massachusetts, EUA). Os espectrômetros de massa foram o Quattro Premier e Xevo TQS ambos fabricados pela Waters® (Waters Corp. Milford, Massachusetts, EUA). A homogeneização da amostra foi realizada em sistema Geno/Grinder® 2010 (SPEX SamplePrep. Gardens, Sanmore, UK) e o Banho Maria Aquecedor MPC-106A (Huber Kältemaschinenbau AG, Germany).

As colunas cromatográficas utilizadas respectivas a cada substância química analisada neste estudo encontra-se na tabela a seguir.

Tabela 9 - Coluna cromatográfica, característica da cromatografia e substância química

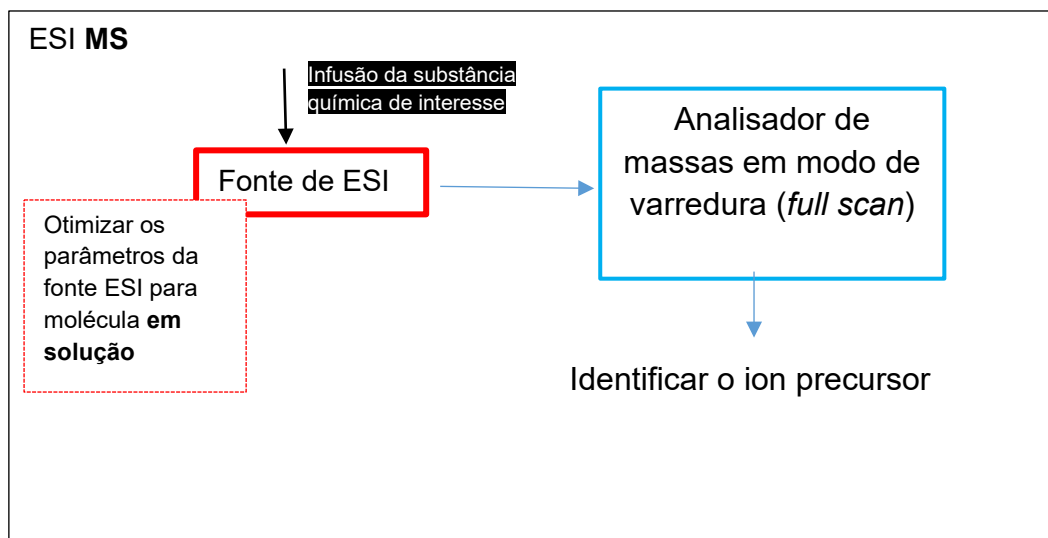
Coluna cromatográfica	Cromatografia	Substância
Acclaim™ Trinity™ P1 (100mm x 2.1 mm id, partícula de 3µm)	HILIC	MOR, DEA e TEA
Acquity UPLC® BEH Hilic (100mm x 2.1µm, partícula de 1,7µm)	HILIC	CQ, DQ e PQ
Thermo Scientific Hypercarb (100mm x 2.1µm, partícula de 5µm)	Carbono	Glifosato, Etefom, Fosetil AI, Ácido fosfônico

5.5 Otimização do método de análise espectrométrica (ESI-MS/MS).

Para a definição das condições de operação da fonte de ESI e do analisador de massas, inicialmente foi feita infusão das soluções padrões individualizadas, no espectrômetro de massas, com uma concentração de 1 µg.mL⁻¹ ou 0,1 µg.mL⁻¹, todas preparadas em solução de ácido fórmico 0,1% em metanol, respectivamente ao sistema Waters Quattro Premier XE® e Waters Xevo TQS®. O fluxo da infusão foi de 10 µL min⁻¹.

Resumidamente o esquema inicial de otimização utilizado encontra-se na figura 26. Nesta fase o analisador de massas foi definido para modo de varredura (*Full Scan*).

Figura 19 - Esquema de otimização dos parâmetros da fonte de ionização de ESI como o analisador de massas funcionado no modo de varredura



Os parâmetros iniciais da fonte de ESI recomendados pelo fabricante e usados neste estudo encontra-se descrito na tabela a seguir.

Tabela 10 - Parâmetros da fonte ESI recomendados pelo fabricante

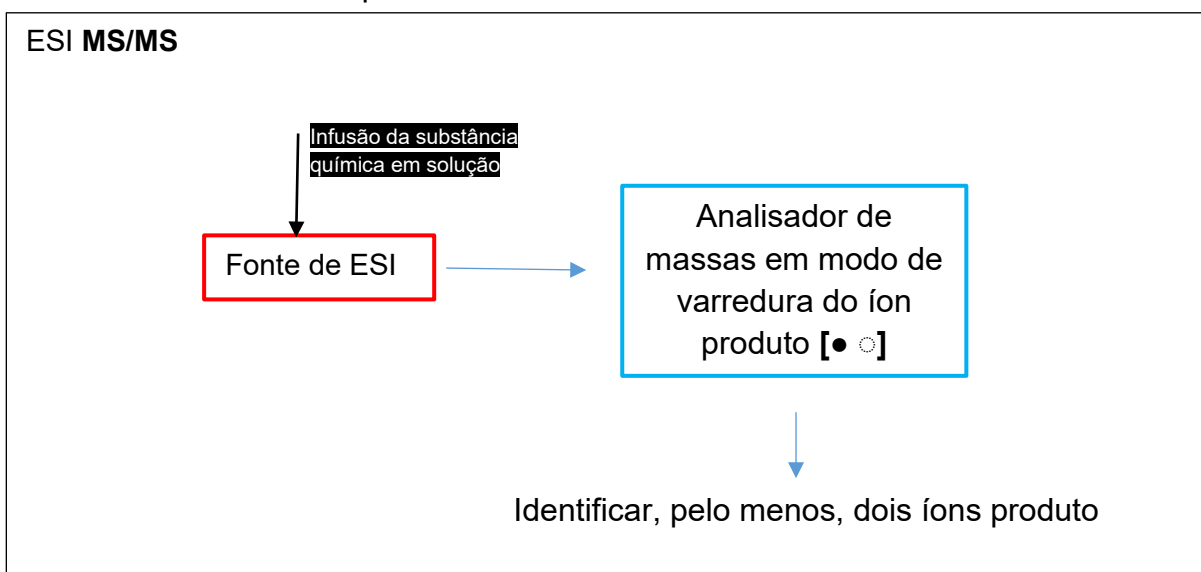
Parâmetro	Valor recomendado
Capilar (kV)	3
Cone (V)	50
Extrator (V)	5
RF Lens (V)	0
Temperatura da fonte (°C)	120
Temperatura de Dessolvatação (°C)	400
Fluxo do gás de dessolvatação (L.Hr ⁻¹)	700
Fluxo do cone (L.Hr ⁻¹)	50
LM Resolução 1	15
HM Resolução 1	15
Ion Energy 1	0.5
Entrance	20
Collision	2
Exit	20
LM Resolução 2	15
HM Resolução 2	15
Ion energy 2	3
Multiplier	650

Todos os parâmetros listados foram otimizados a fim de obter espectros de massas reprodutíveis e com sensibilidade satisfatória ao uso pretendido para cada uma das substâncias químicas estudadas.

5.5.1 Fragmentação dos íons precursor

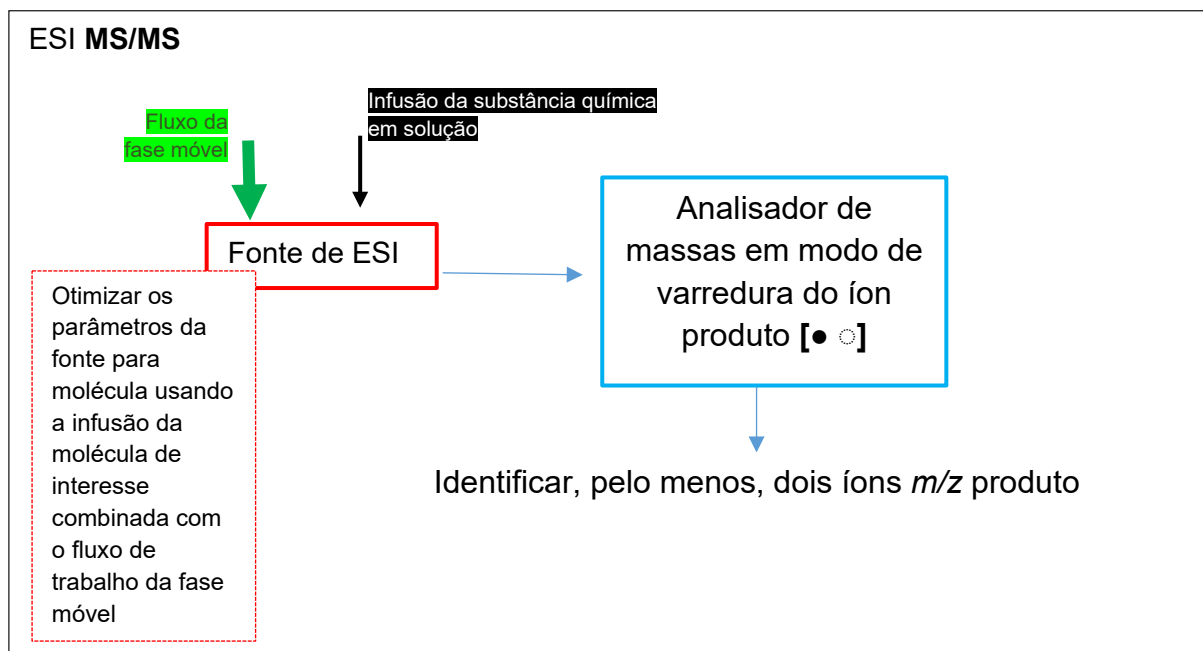
A seguir foram realizados testes para identificar os íons produtos com o analisador de massas operando em modo de varredura do íon produto (*Product ion scan*). Nesta etapa foi determinada a energia de colisão (V) utilizada para fragmentação do íon precursor. Pelo menos dois (2) íons foram selecionados como íons de quantificação e qualificação das substâncias de interesse.

Figura 20 - Esquema de otimização dos parâmetros para o analisador de massas funcionado no modo íon produto



A etapa final de otimização consistiu na otimização dos parâmetros da fonte de ESI associados a temperatura utilizada para dessolvatação das substâncias quando foram utilizados os eluentes da fase móvel, visando obter a maior intensidade de sinal nas condições de análise cromatográficas definidas.

Figura 21 - Esquema de otimização dos parâmetros para a fonte de ionização (ESI) com o analisador de massas funcionado no modo íon produto.



5.5.2 Parâmetros do analisador de Massas (MS/MS)

O analisador de massas foi ajustado para obter a melhor resolução dos íons de baixa massa (*LM resolution*) ou de alta massa (*HM resolution*). Por fim, foi otimizado o valor da energia aplicada nas lentes posicionadas entre os quadrapolos e a multiplicadora, utilizada para refocalizar os íons formados (*Ion Energy*).

5.6 Método de análise cromatográfico

As condições de análise cromatográfica utilizadas para separação das substâncias químicas estudadas foram baseadas em métodos descritos na literatura, entretanto otimizados para obter uma redução do tempo de análise sem comprometimento da seletividade e sensibilidade do método. Dessa forma, as condições utilizadas encontram-se nas tabelas a seguir.

Tabela 11 - Condição de análise de Etefon, Fosetil-Al, Acido Fosfonico e Glifosato para o sistema Acquity® UPLC

Coluna	Hypercarb 2.1x 100 mm 5µm (P/N 35005-102130)		
Pré-coluna	Hypercarb Guard 2.1 x 10 mm 5µm (P/N 35005-102101) ou C18 4x3mm Phenomenex		
Temperatura da coluna	40 °C		
Eluente A	Solução de ácido acético 1% em água + 5% de metanol		
Eluente B	Solução de ácido acético 1% em metanol		
Gradiente	%A	Fluxo(mL/min)	Tempo (min)
	100	0,25	0
	100	0,25	3,5

Tabela 12 - Condição de análise de MOR, DEA, TEA para o sistema Acquity® UPLC

Coluna	Acclaim Trinity P1 2.1x100 mm (3 µm) (P/N 071389);		
Pré-coluna	Acclaim Trinity P1 2.1 x 10 mm (3 µm) (P/N 071391)		
Temperatura da coluna	40 °C		
Eluente A	Solução de formato de amônio 50mM (pH 3,0)		
Eluente B	Acetonitrila		
Gradiente	%A	Fluxo(mL/min)	Tempo (min)
	5	0.4	0
	5	0.4	4.5
	30	0.4	7.0
	5	0.4	7.1
	5	0.4	12

Tabela 13 - Condição de análise de CQ, DQ e PQ para o sistema Acquity® UPLC

Coluna	Acquity UPLC® BEH Hilic		
Pré-coluna	Acquity UPLC® BEH Hilic Guard 2.1 x 10 mm		
Temperatura da coluna	40 °C		
Eluente A	Solução de formiato de amônia 150mM + 1% de ácido fórmico		
Eluente B	Acetonitrila		
Gradiente	%A	Fluxo(mL/min)	Tempo (min)
	40	0,3	0
	40	0,3	0.01
	80	0,3	3.5
	40	0,3	3.51
	40	0,3	6

5.7 Método de extração das amostras

O método de extração de referência para análise das substâncias químicas de alta polaridade propostos neste trabalho foi publicado pela EU, também conhecido pela sigla QuPPE (do inglês *Quick Method for the Analysis of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS/MS*). É o método padrão utilizado nos laboratórios de referência da EU responsáveis pela avaliação da conformidade dos alimentos.

Quando aplicável a análise de alimentos com baixo teor de água, como é o caso dos grãos, os resíduos das substâncias de interesse são extraídos após a adição de água a porção de ensaio, posteriormente é realizada a adição de uma solução de ácido fórmico em metanol para extração. Temos a seguir a etapa de homogeneização e centrifugação da amostra. Ao final é retirada uma alíquota a ser analisada nos sistemas de UPLC-MS/MS (ANASTASSIADES, et al 2016). Do contrário, como é o caso dos frutos *in natura*, não é necessário adicionar a água. A seguir são descritas a marcha analítica de acordo com a substância de interesse e a matriz de análise.

Para as análises de resíduos dos herbicidas CQ, DQ e PQ foi utilizado o método modificado a partir do proposto por Pizzutti et al (2016), no qual é realizada digestão ácida com o HCl para a extração dessas substâncias na soja, conforme especificado no item 5.7.3.

5.7.1 Extração de Glifosato para matriz com baixo teor de água (Grãos de Soja)

A 2 g de uma amostra de soja previamente triturada em moinho, acompanhados de amostra “branco” e adicionado, foram adicionados 10 mL de água; após aguardar 15 min, foram adicionados 10 mL de uma solução de ácido fórmico 1%, com consecutiva homogeneização em homogeneizador mecânico por 2 min a 1050 rpm. O extrato foi levado para centrifugação a 5000rpm por 3 min. A seguir uma alíquota de aproximadamente 1 mL do sobrenadante é filtrada em membrana Millex de 0,22 µm e transferida para *insert* de plástico para análise por UPLC-MS/MS.

5.7.2 Extração de Etefom, Fosetil-Al, Morfolina Dietanolamina, Trietanolamina, para matriz com alto teor de água (frutas in natura)

A 10 g de uma amostra de manga ou uva previamente trituradas, acompanhados de amostra “branco” foram adicionados 10 mL de uma solução de ácido fórmico 1%, com consecutiva agitação em homogeneizador mecânico por 2 min a 1050rpm. O extrato foi centrifugado a 5000rpm por 3 min. Ao final, uma alíquota de aproximadamente 1 mL do sobrenadante foi filtrada em membrana Millex® de 0,22 µm e transferida para um *vial* e submetido a análise por UPLC-MS/MS.

5.7.3 Extração de CQ, DQ e PQ para matriz com baixo teor de água (Grãos de Soja)

A 2 g de uma amostra de soja previamente triturada em moinho, acompanhados de amostra “branco” e adicionado, foram adicionados 10mL de água;

após aguardar 15 min, foram adicionados 10 mL de uma solução de ácido clorídrico 0,5 M preparado em solução de metanol/água (6:4, v/v). A seguir foi realizada agitação em homogeneizador mecânico por 2 min a 1050 rpm.

Os tubos contendo os extratos são transferidos para banho Maria a uma temperatura de 80°C onde permanecem por um período de 15min. Após atingir temperatura ambiente o extrato é mais uma vez submetido a agitação por 2 min a 1050 rpm. Logo depois é levado para centrifugação a 5000 rpm por 3 min.

Por fim, uma alíquota de aproximadamente 1mL do sobrenadante foi filtrado em membrana Millex® de 0,22 µm e transferida para *insert* de plástico para análise por UPLC-MS/MS.

5.8 Validação dos métodos propostos

5.8.1 Especificidade

A Especificidade/Seletividade do método foi estabelecida através da determinação de amostras reconhecidamente isentas das substâncias químicas de interesse, cultivados sem a adição dos agrotóxicos ou substâncias afins, também para verificar este parâmetro foram analisadas amostras branco dos reagentes. A presença de pico interferente com sinal de até 30% no tempo de retenção do composto quando comparado ao menor nível de calibração foi considerada como aceitável (SANTE, 2015).

5.8.2 Limites quantificação

Os limites de quantificação praticado foi estabelecido para o menor nível adicionado dos compostos de interesse para o qual a precisão e exatidão do método foi considerada como aceitável de acordo com critérios do SANTE (2015).

5.8.3 Linearidade

Foram realizadas avaliação da linearidade para as curvas de calibração das substâncias químicas propostas em extrato da matriz ou em solução de acordo com o item 5.3.1. O intervalo de concentração proposto foi definido em função da aplicação do método.

Para cada teste construiu-se um gráfico da concentração versus área sob a curva obtida. O coeficiente de correlação linear (r) foi calculado utilizando-se programa MassLynx®, próprio do sistema de espectrometria de massas. Os resíduos de recuperação foram aceitos nos níveis de calibração com até 20% (SANTE, 2015).

No caso do Ácido fosfônico, Glifosato, BAC, DDAC foi realizada a calibração de nível único (do inglês *single level calibration*).

5.8.4 Veracidade/Recuperação

A veracidade foi determinada por intermédio de ensaios de recuperação, onde as amostras foram adicionadas da substância química de interesse em pelo menos dois níveis, um deles próximo ou igual ao LMR definido na legislação. Foram preparadas, pelo menos cinco réplicas autênticas, para uma mesma concentração adicionada nas amostras branco da matriz. O fator de recuperação foi calculado considerando o quociente entre a quantidade obtida da substância de interesse na matriz adicionada e a quantidade teoricamente adicionada na amostra. No caso de substâncias químicas de uso na agricultura são aceitos valores de recuperação entre 70 e 120% (SANTE, 2015; BRASIL, 2011).

5.8.5 Precisão

5.8.5.1 Repetitividade

O grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições de medição foi calculado a partir das réplicas

autênticas adicionadas das substâncias químicas de interesse. A partir do desvio padrão das medições e do valor médio das medições foi realizado o cálculo dos coeficientes de variação (CV%) de repetitivade são considerados adequados aqueles iguais ou menores que 20% (SANTE, 2015; BRASIL, 2011).

5.8.5.2 Reprodutibilidade

A precisão intermediária (Reprodutibilidade) foi obtida da mesma forma que a repetitividade, porém foi avaliada em dia diferente, por um outro analista do laboratório (SANTE, 2015; BRASIL, 2011).

6 RESULTADOS

6.1 Ajustes da cromatografia

Os compostos estudados apresentaram alta polaridade e por isso não podem ser analisados utilizando fase reversa, a qual é muito comum em análises multiresíduos de agrotóxicos, neste caso foram otimizadas as condições em colunas adequadas como a Hypercarb® e Hilic.

Inicialmente, as condições de análise cromatográfica utilizando a coluna de carbono (Hypercarb®) para os compostos Glifosato, Etefom, Fosetil Al, ácido fosfônico seguiram os parâmetros descritos no método QuPPE (método 1.3). A partir desta condição, buscou-se reduzir ao máximo o tempo de análise. Para tanto foram realizadas mudanças na proporção dos eluentes da fase móvel e também alterações do fluxo da fase móvel. O mesmo procedimento foi feito para as análises de MOR, DEA e TEA usando a coluna Acclaim™ Trinity™ P1 e nas análises de CQ, DQ e PQ com coluna BEH Hilic.

A cada mudança dos parâmetros cromatográficos, era injetado um branco da matriz, seguido de um padrão de calibração preparado na matriz de interesse a 100ng mL⁻¹ e, ao final, foi injetado um branco do solvente para confirmar a completa eluição dos compostos e/ou possíveis interferentes da matriz que pudessem ficar retidos na coluna causando problemas na injeção seguinte.

6.2 Otimização dos parâmetros de ionização ESI-MS/MS

Os parâmetros de operação da fonte de ESI foram otimizados inicialmente a partir da seleção de moléculas protonadas $[M+H]^+$ ou desprotonadas $[M-H]$, moléculas que formaram cátions em solução M^+ ou o íon radicalar contendo elétrons desemparelhados em seu estado fundamental $M^{(+)(\bullet)}$.

A sonda de ESI transfere as moléculas ionizadas em solução para formação de um *spray* líquido e ao final uma fase gasosa dessolvatada pela ação de gases secantes. Três parâmetros foram otimizados nessa situação: Gás de nebulização, fluxo do gás de dessolvatação e a temperatura de dessolvatação.

Estes dois últimos parâmetros foram otimizados para maximizar a intensidade do sinal do íon formado para a substância química de interesse. O gás de nebulização já foi definido de acordo com o próprio fabricante para sua condição ótima de operação. A seguir foram otimizados a voltagem do capilar (Kv) para produção de gotas com alta densidade de carga. O ajuste da voltagem do cone (Kv) também foi realizado para um valor suficiente a atração dos íons carregados para a região inicial de baixa pressão (*ion block*). Foi realizado o ajuste para a voltagem do extrator (Kv) que é aplicada ao segundo cone presente no *ion block*, tipicamente 1 a 3 volts. A voltagem para a lente final que focaliza os íons no analisador de massas (*RF lens*) foi definida para valores típicos entre 0.1 V e 0.5 V. Dessa forma, foram identificadas as melhores condições para ionização na fonte de ESI, utilizando o íon precursor formado, com o analisador de massas operando em modo de varredura.

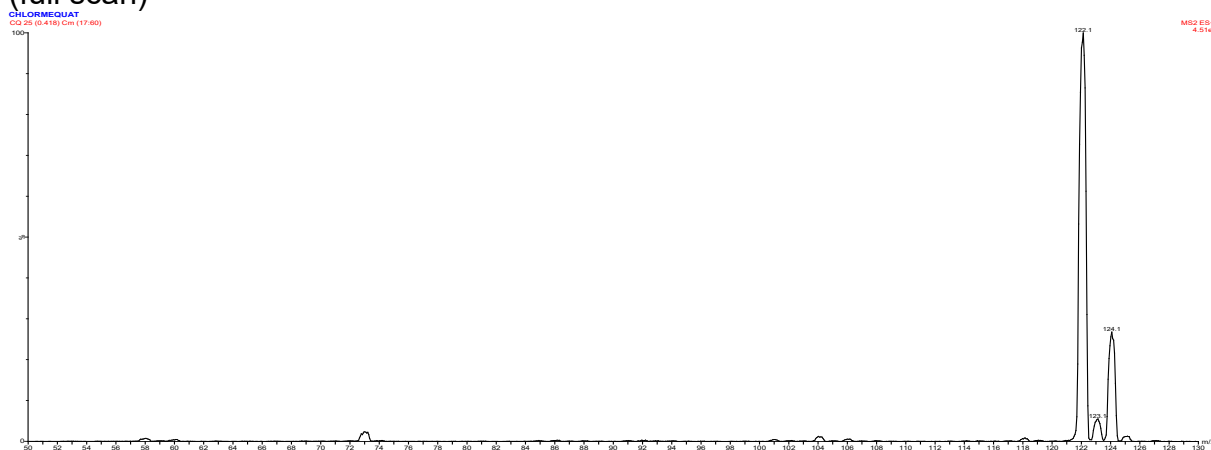
A etapa seguinte consistiu em adequar os parâmetros do analisador de massas de forma a obter os íons produtos.

A seguir são apresentados os resultados para otimização de cada uma das substâncias do presente estudo.

6.2.1 CQ

O CQ teve como íon precursor o seu cátion M^+ de razão massa carga (m/z 122).

Figura 22 - Espectro de massas para o CQ (ESI^+) analisador em modo de varredura (full scan)

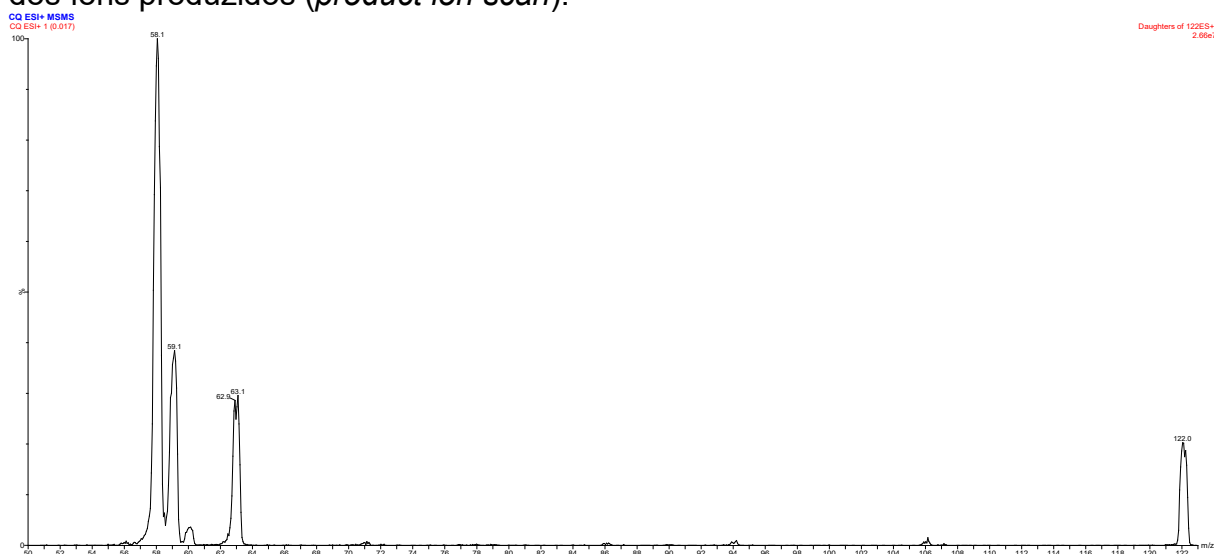


Os fragmentos mais intensos obtidos a partir do íon precursor do CQ e a energia de colisão utilizada na geração dos fragmentos são apresentados a seguir (tabela 16).

Tabela 14 - Transições de massas, voltagem de cone energia de colisão para a molécula de CQ

Composto	Transição (m/z)	Cone (V)	Colisão (V)
Clormequat	122.2>59.3 (quan)	30	15
	122.2>63.2 (qual)	30	15

Figura 23 - Espectro de massas para o CQ (ESI^+) analisador em modo de varredura dos íons produzidos (*product ion scan*).



6.2.2 PQ

O PQ teve como íon precursor o seu dicátion M^{2+} de razão massa carga (m/z 93) e também a sua molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ com m/z 186.

Figura 24 - Espectro de massas para o PQ (ESI⁺) analisador em modo de varredura (full scan)

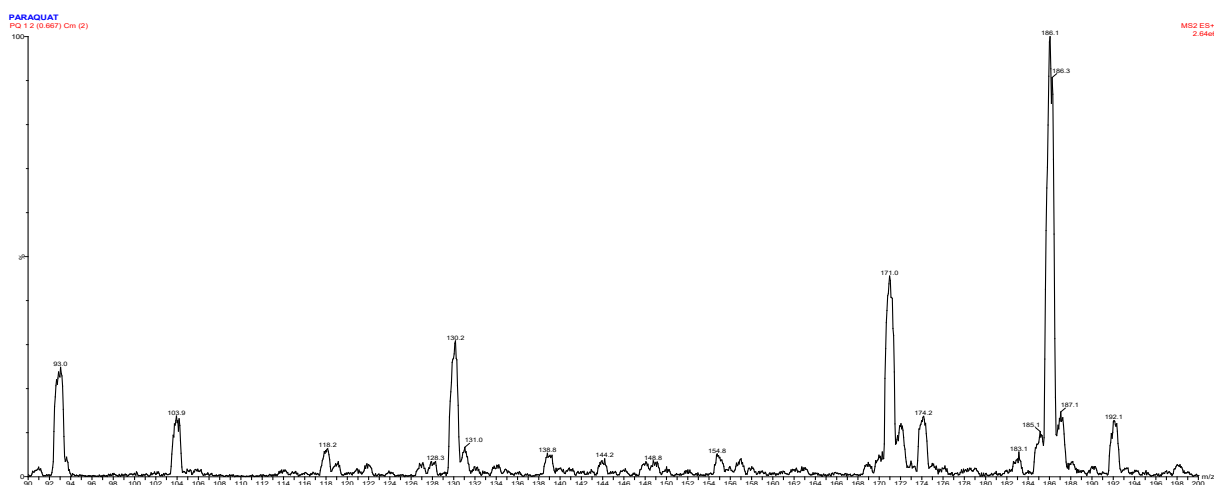


Tabela 15 - Transições de massas, voltagem de cone energia de colisão para a molécula de PQ

Composto	Transição (m/z)	Cone (V)	Colisão (V)
Paraquate	93.2>171.2 (quan)	30	14
	186.2>171.2 (qual)	30	15

Figura 25 - Espectro de massas para o PQ (ESI⁺) analisador em modo de varredura dos íons produzidos (*product ion scan*)

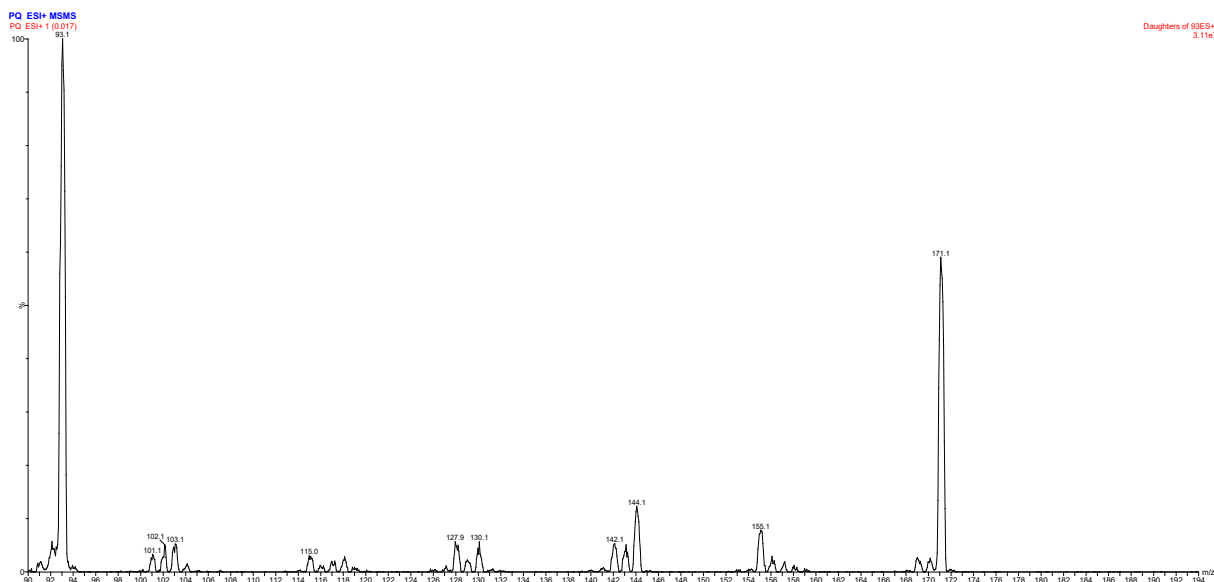


Figura 25 – Continuação Espectro de massas para o PQ (ESI⁺) analisador em modo de varredura dos íons produzidos (*product ion scan*)



6.2.3 DQ

O DQ teve como íon precursor o seu cátion radicalar M^{•+} de razão massa carga (m/z 183).

Figura 26- Espectro de massas para o DQ (ESI⁺) analisador em modo de varredura (full scan)

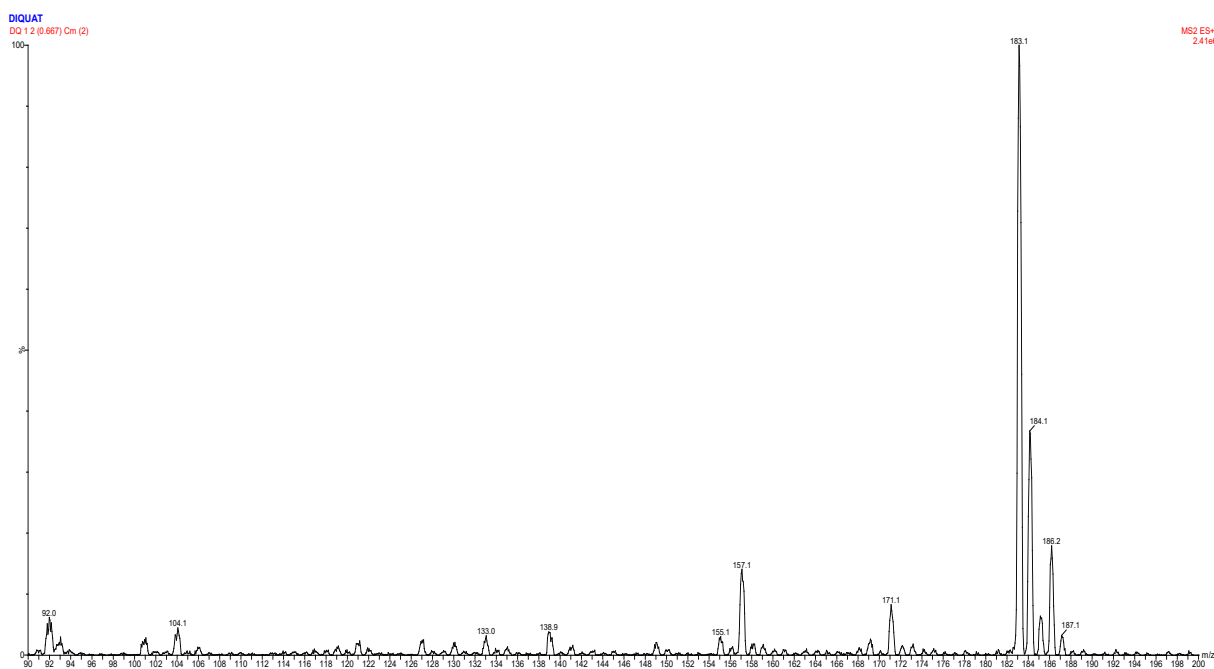
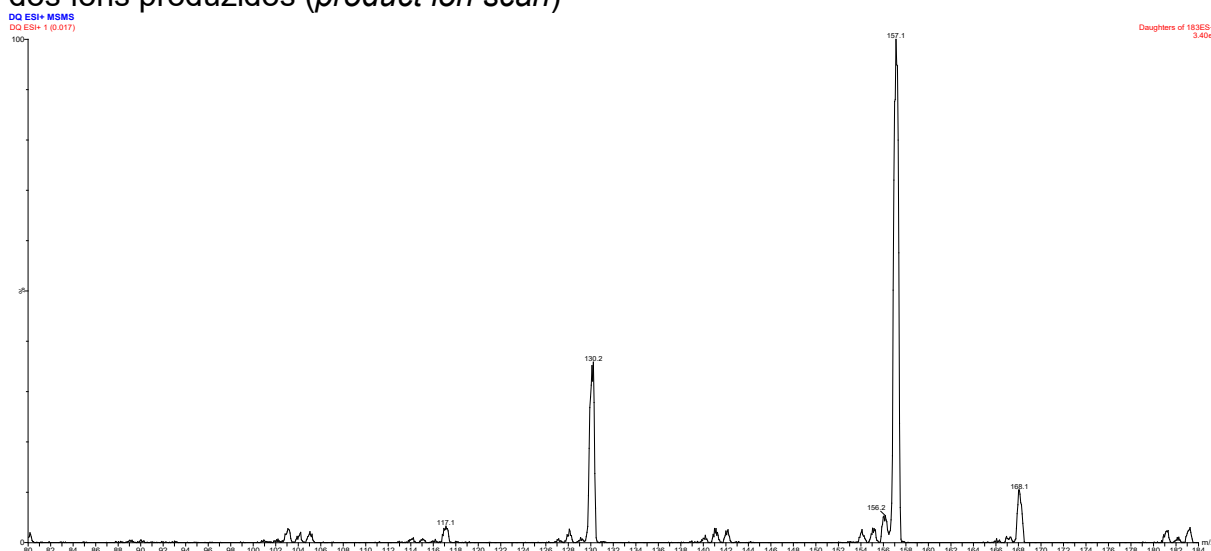


Figura 27 - Transições de massas, voltagem de cone energia de colisão para a molécula de DQ

Composto	Transição (m/z)	Cone (V)	Colisão (V)
Diquate	183>157 (quan)	30	18
	183>130.2 (qual)	30	29

Figura 28 - Espectro de massas para o DQ (ESI⁺) analisador em modo de varredura dos íons produzidos (*product ion scan*)



6.2.4 Fosetil

O Fosetil teve como íon precursor a sua molécula desprotonada [M-H]⁻ razão massa carga (m/z 109).

Figura 29 - Espectro de massas para o Fosetil (ESI⁻) analisador em modo de varredura (full scan).

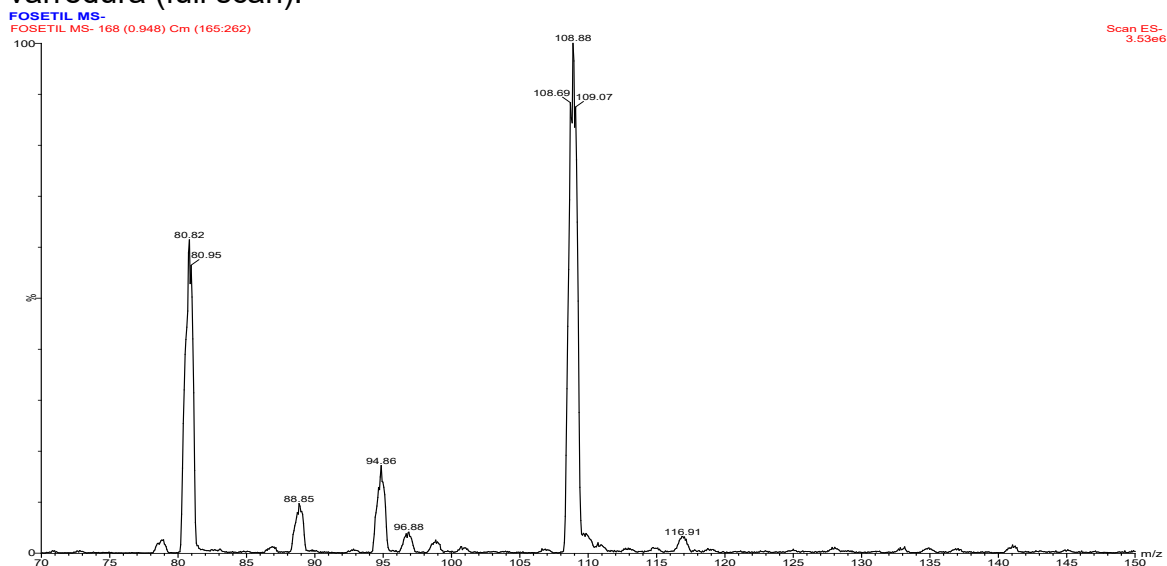
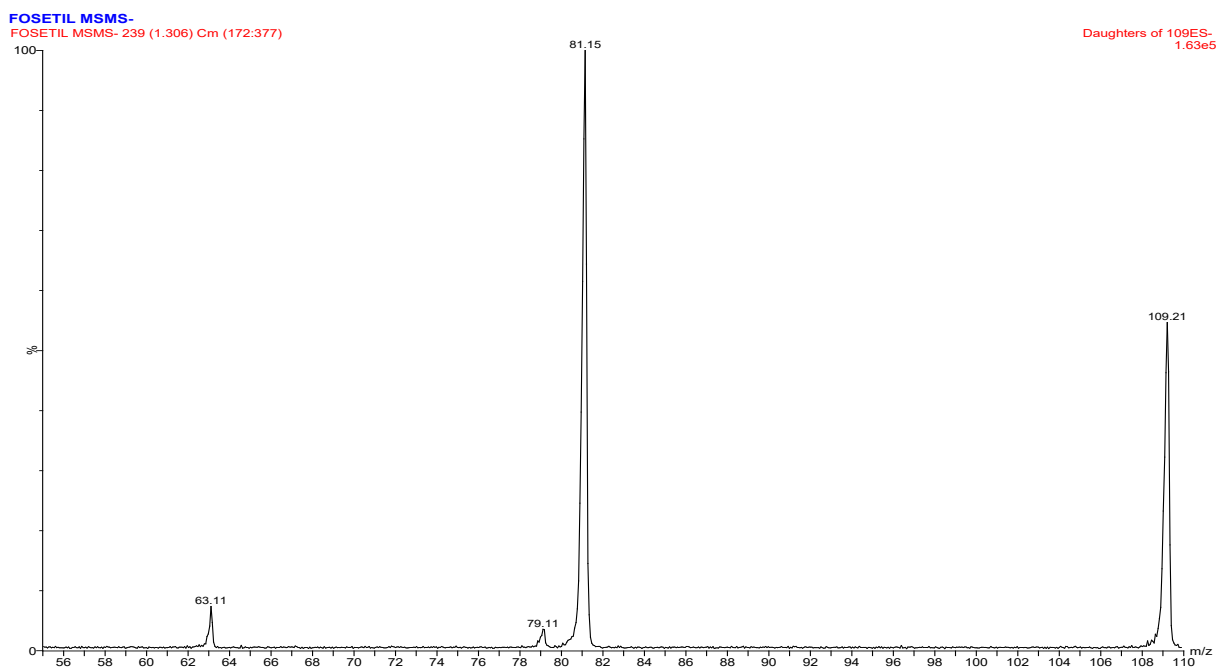


Tabela 16 - Transições de massas, voltagem de cone energia de colisão para a molécula de Fosetil

Composto	Transição (m/z)	Cone (V)	Colisão (V)
Fosetil Al	109>81 (quan)	20	12
	109>63 (qual)	20	12

Figura 30 - Espectro de massas para o Fosetil (ESI⁻) analisador em modo de varredura dos íons produzidos (*product ion scan*)



6.2.5 Etefom

O Etefom teve como íon precursor a sua molécula desprotonada $[M-H]^-$ de razão massa carga (m/z 143), porém devido a presença de Cl na molécula foi utilizada também o ânion de razão massa carga (m/z 145) que corresponde ao isótopo de massa 37 do Cl.

Figura 31 - Espectro de massas para o Etefom (ESI⁺) analisador em modo de varredura (full scan)

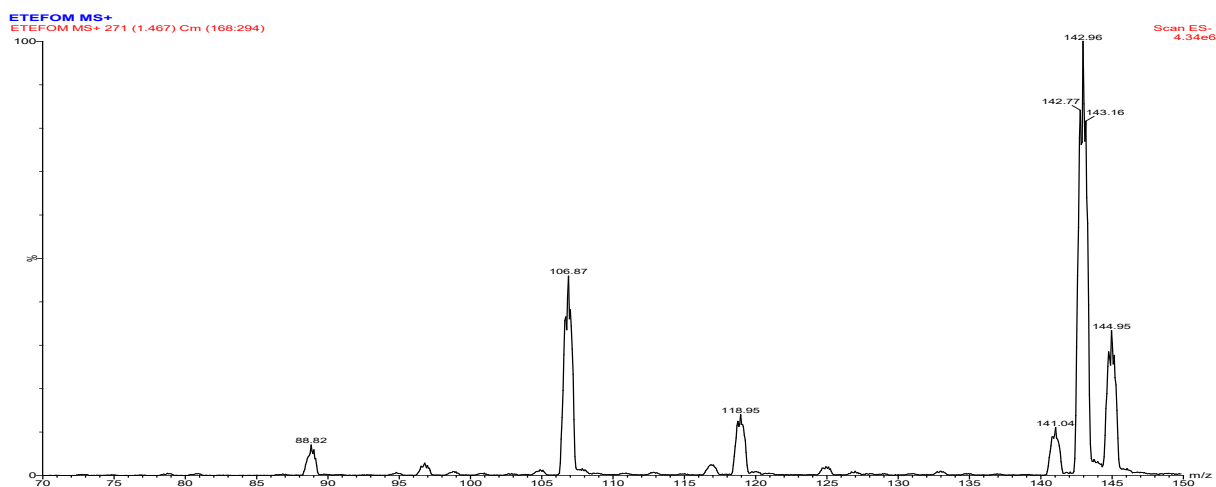
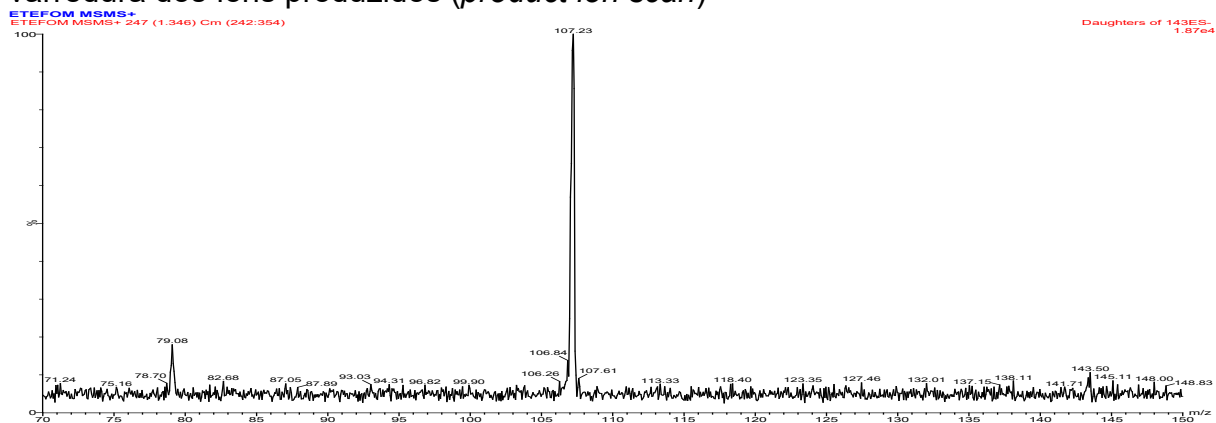


Tabela 17 - Transições de massas, voltagem de cone energia de colisão para a molécula de Etefom

Composto	Transição (m/z)	Cone (V)	Colisão (V)
Etefom	143>107 (quan)	15	10
	145>107 (qual)	15	10

Figura 32 - Espectro de massas para o Etefom (ESI⁺) analisador em modo de varredura dos íons produzidos (*product ion scan*)



6.2.6 MOR

A MOR teve como íon precursor a sua molécula protonada $[M+H]^+$ de razão massa carga (m/z 88).

Figura 33 - Espectro de massas para o MOR (ESI⁺) analisador em modo de varredura full scan)

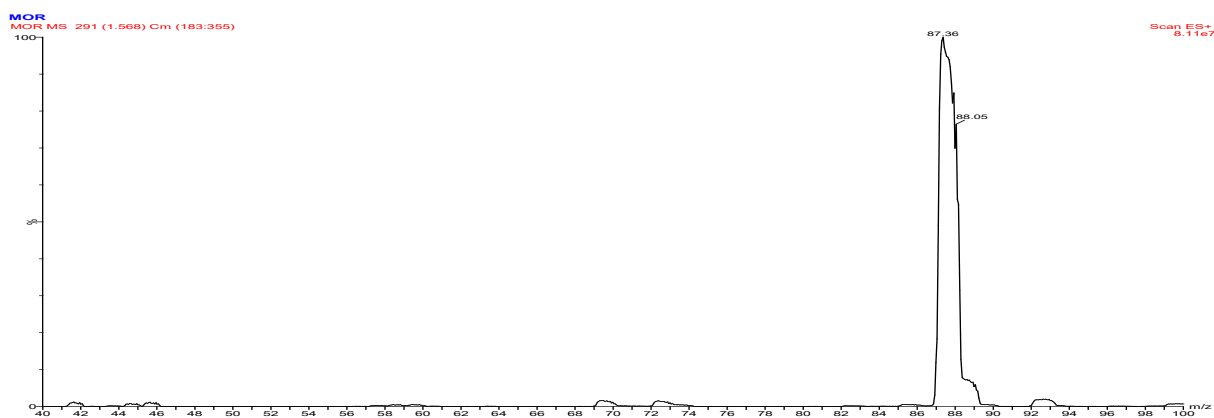
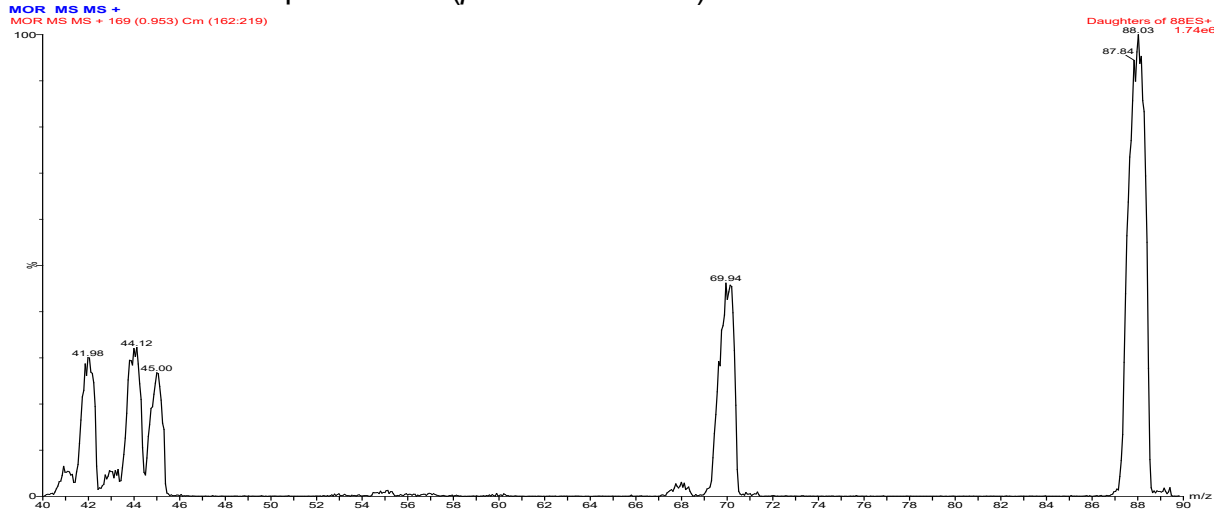


Tabela 18 - Transições de massas, voltagem de cone energia de colisão para a molécula de MOR

Composto	Transição (m/z)	Cone (V)	Colisão (V)
MOR	88>88 (quan)	29	4
	88>70 (qual)	29	12

Figura 34 - Espectro de massas para o MOR (ESI⁺) analisador em modo de varredura dos íons produzidos (*product ion scan*)



6.2.7 DEA

O DEA teve como íon precursor a sua molécula protonada [M+H]⁺ de razão massa carga (m/z 106).

Figura 35 - Espectro de massas para o DEA (ESI⁺) analisador em modo de varredura full scan)

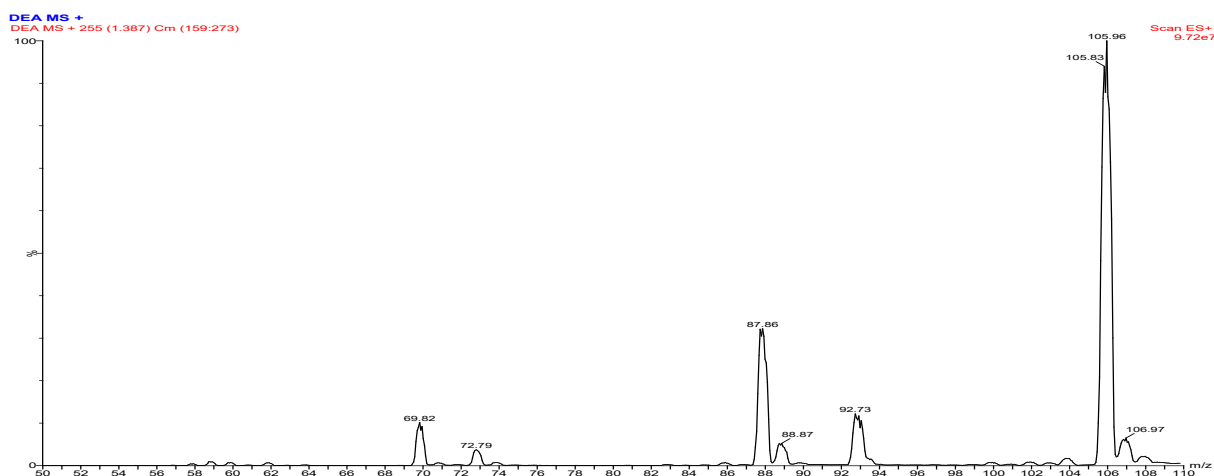
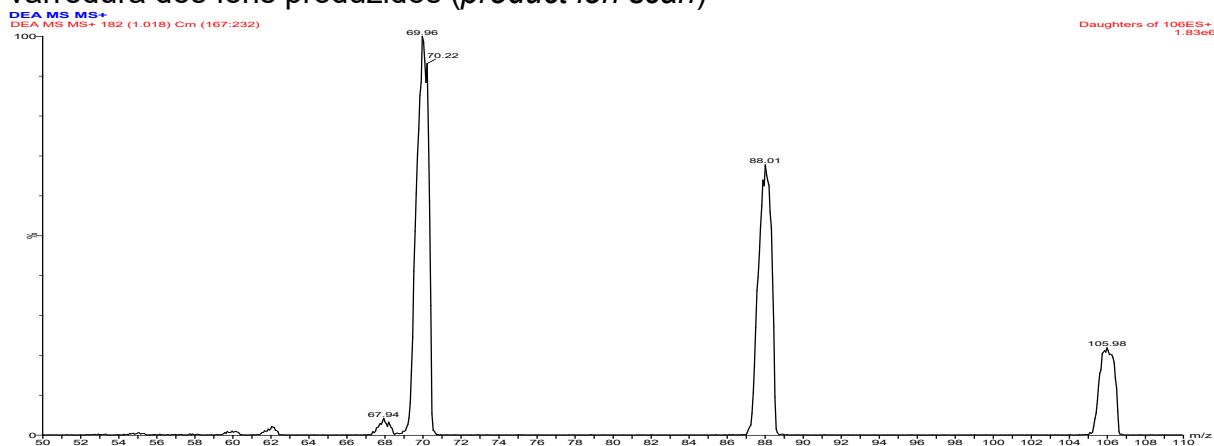


Tabela 19 - Transições de massas, voltagem de cone energia de colisão para a molécula de DEA

Composto	Transição (m/z)	Cone (V)	Colisão (V)
DEA	106>88 (quan)	9	11
	106>70 (qual)	9	12

Figura 36 - Espectro de massas para o DEA (ESI⁺) analisador em modo de varredura dos íons produzidos (*product ion scan*)



6.2.8 TEA

O TEA teve como íon precursor a sua molécula protonada [M+H]⁺ de razão massa carga (m/z 150).

Figura 37 - Espectro de massas para o TEA (ESI⁻) analisador em modo de varredura (full scan)

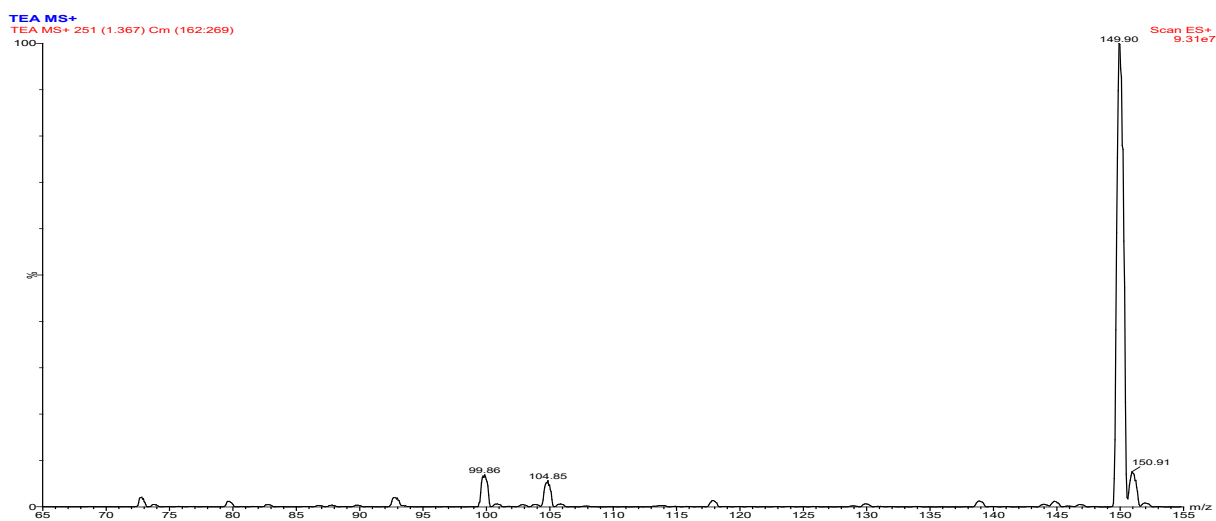
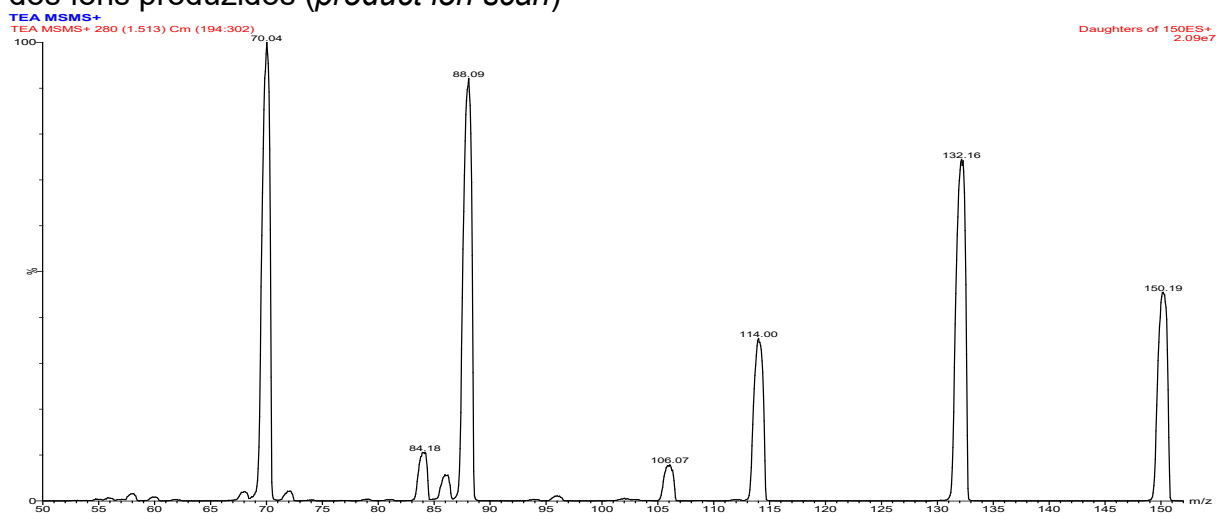


Tabela 20 - Transições de massas, voltagem de cone energia de colisão para a molécula de TEA

Composto	Transição (m/z)	Cone (V)	Colisão (V)
TEA	150>132 (quan)	27	14
	150>88 (qual)	27	16

Figura 38 - Espectro de massas para o TEA (ESI⁻) analisador em modo de varredura dos íons produzidos (*product ion scan*)



A abundância relativa dos íons formados depende dos equipamentos de espectrometria, fonte de ionização, além disso os efeitos de supressão ou ganho de sinal podem estar associados a matriz e fase móvel utilizada. Todos estes parâmetros

devem ser avaliados a fim de obter resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido.

As transições obtidas foram adequadas sendo possível analisar todas as substâncias químicas. Destaca-se o atendimento ao critério qualitativo utilizado na análise de resíduos de contaminantes em alimentos, onde é necessária obtenção de dois íons para cálculo do quociente da área entre eles, a fim de comparar a razão de íons entre as amostras e o padrão de análise. Os dois fragmentos (íons produtos) mais intensos foram utilizados nas transições de quantificação e confirmação das substâncias químicas de interesse.

Definidas as condições ótimas para análise, estas foram utilizadas para elaboração do método de análise com o espectrômetro operando em modo de aquisição MRM, para tanto foi preciso identificar o tempo de retenção das substâncias de interesse a partir das condições cromatográficas estabelecidas, uma vez que o tempo para monitoramento (do inglês, *Dwell time*) de cada transição é estabelecido de acordo com o número de transições em um determinado intervalo de tempo.

6.2.9 Parâmetros de análise obtidos de acordo com os sistemas de espectrometria ESI-MS/MS.

A seguir são apresentados os resultados obtidos para os parâmetros otimizados da fonte de ionização ESI. Dentro da perspectiva de racionalização, os métodos foram então agrupados em um mesmo sistema analítico de UPLC-MSMS, quando para a cromatografia dessas substâncias foi utilizada a mesma coluna cromatográfica. Sendo assim, os resultados apresentados são respectivos aos sistemas de espectrometria de massas Premier® ou Xevo TQS®.

Tabela 21 - Condição de análise de Etefon, Fosetil-Al, Acido Fosfônico e Glifosato para o sistema PREMIER MS/MS

Parâmetro	Condição
Modo de ionização	ESI negativo
Voltagem do capilar	4 KV
Voltagem do extrator	3 V
RF lens	0,2 V
Temperatura da fonte	110 °C
Fluxo do gás de dessolvatação	800 L/h
Temperatura do gás de dessolvatação	500 °C
Fluxo do gás do cone	50 L/h
LM Resolution 1	10,4
HM Resolution 1	9
Íon energy 1	1
LM Resolution 2	9
HM Resolution 2	7,2
Íon energy 2	1
Multiplicadora	804
Gás de colisão	Argônio
Pressão do gás de colisão	$3,54 \times 10^{-3}$ m bar
Fluxo do gás de colisão	0,2 mL/min
Volume de injeção	5 µL

Tabela 22 - Condição de análise de MOR, DEA, TEA para o sistema PREMIER MS/MS

Parâmetro	Condição
Modo de ionização	ESI positivo
Voltagem do capilar	0.5 KV
Voltagem do extrator	3 V
RF lens	0,1 V
Temperatura da fonte	110 °C
Fluxo do gás de dessolvatação	800 L/h
Temperatura do gás de dessolvatação	500 °C
Fluxo do gás do cone	50 L/h
LM Resolution 1	11
HM Resolution 1	11
Íon energy 1	1
LM Resolution 2	11
HM Resolution 2	11
Íon energy 2	1
Multiplicadora	650
Gás de colisão	Argônio
Pressão do gás de colisão	$3,54 \times 10^{-3}$ m bar
Fluxo do gás de colisão	0,16 mL/min

Tabela 23 - Condição de análise de PQ, DQe CQ para o sistema XEVO TQS MS/MS

Parâmetro	Condição
Modo de ionização	ESI positivo
Voltagem do capilar	0.3 KV
Source off set	30 V
Temperatura da fonte	140 °C
Fluxo do gás de dessolvatação	800 L/h
Temperatura do gás de dessolvatação	400 °C
Fluxo do gás do cone	150 L/h
LM Resolution 1	3
HM Resolution 1	15
Íon energy 1	0.1
LM Resolution 2	3
HM Resolution 2	15
Íon energy 2	2.5
Gás de colisão	Argônio
Pressão do gás de colisão	$3,54 \times 10^{-3}$ m bar
Fluxo do gás de colisão	0,25 mL/min

6.3 Validação do método de análise

As substâncias químicas que tiveram a validação completa realizada foram o CQ, DQ, PQ, Fosetil Al, Etefom, MOR, DEA, TEA. Todos os resultados obtidos mostraram o atendimento do método aos critérios de desempenho analítico estabelecidos no SANTE (2017). A tabela 24 traz um resumo dos resultados para os parâmetros de validação testados.

Tabela 24 – Resultados para os parâmetros de validação obtidos após a análise estatística dos dados.

Parâmetros de validação	Critério de aceitação SANTE 11945/2015)	Resultado
Linearidade	Resíduos < $\pm 20\%$ *Calibração de nível único $R \geq 0,98$	CQ, DQ e PQ Curva linear para faixa de trabalho $0,01 \text{ mg Kg}^{-1}$ - $0,2 \text{ mg Kg}^{-1}$ Fosetil Al Curva linear para faixa de trabalho $0,02 \text{ mg Kg}^{-1}$ - $0,2 \text{ mg Kg}^{-1}$ *Ácido fosfônico Quantificação em um nível de calibração através do método de adição de padrão. Ácido fosfônico adicionado na amostra para fins de recuperação (dentro

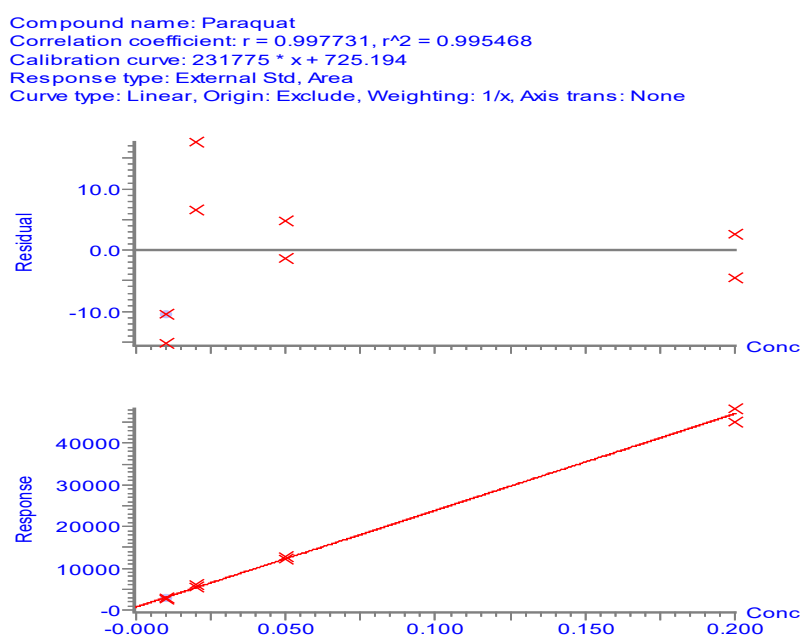
Linearidade	Resíduos < ± 20% *Calibração de nível único R≥0,98	de ± 30%) amostras reais são fortificadas com 2 mg Kg ⁻¹ do ácido fosfônico. Etefom Curva linear para faixa de trabalho 0,05 mg Kg ⁻¹ - 2,0 mg Kg ⁻¹ MOR, DEA, TEA Curva linear para faixa de trabalho 0,01 mg Kg ⁻¹ -0,1 mg Kg ⁻¹ *Glifosato 0,05-0,2 mg Kg ⁻¹ Quantificação *Ácido Fosfônico 0,05-0,2 mg Kg ⁻¹ Quantificação																														
LOQ	Por definição Menor nível da substância de interesse para o qual foi possível obter uma relação s/r de pelo menos 10x e para o qual temos uma precisão satisfatória.	CQ, DQ e PQ LOQ: 0,02 mg Kg ⁻¹ <u>LMR ANVISA em soja:</u> CQ (proibido); DQ (0,1 mg Kg ⁻¹); PQ (0,2 mg Kg ⁻¹) <u>LMR EU em soja</u> CQ: (0,1 mg Kg ⁻¹); DQ (0,3 mg Kg ⁻¹); PQ (proibido) Fosetil AI LOQ: 0,02 mg Kg ⁻¹ <u>LMR ANVISA em manga:</u> Proibido <u>LMR EU em manga:</u> 2,0 mg Kg ⁻¹ (definição de resíduo inclui o ácido fosfônico no somatório) Ácido fosfônico LOQ: 0,03 mg Kg ⁻¹ <u>LMR ANVISA em manga:</u> sem definição <u>LMR EU em manga:</u> 2,0 mg Kg ⁻¹ Etefom LOQ: 0,05 mg Kg ⁻¹ <u>LMR ANVISA em Uva:</u> 0,1 mg Kg ⁻¹ <u>LMR EU em Uva:</u> 1,0 mg Kg ⁻¹ MOR, DEA, TEA LOQ: 0,01 mg Kg ⁻¹ <u>LMR ANVISA em frutas:</u> Proibido <u>LMR EU em frutas:</u> Proibido																														
Recuperação	70-120%	<table><tr><td colspan="2">CQ, DQ e PQ</td></tr><tr><td>0,02 mg Kg</td><td>0.05 mg Kg</td></tr><tr><td>87,8 % - 90,5 %</td><td>91,5 % - 113,4 %</td></tr><tr><td colspan="2">Fosetil AI</td></tr><tr><td>0.02 mg Kg</td><td>0.1 mg Kg</td></tr><tr><td>88,1 %</td><td>94,4 %</td></tr><tr><td colspan="2">Etefom</td></tr><tr><td>0.05 mg Kg</td><td>1.5 mg Kg</td></tr><tr><td>90,8 %</td><td>88,8 %</td></tr><tr><td colspan="2">MOR, DEA, TEA</td></tr><tr><td>0.05</td><td>0.1</td></tr><tr><td>110,3% - 118,2%</td><td>88,6% - 107,5%</td></tr></table>	CQ, DQ e PQ		0,02 mg Kg	0.05 mg Kg	87,8 % - 90,5 %	91,5 % - 113,4 %	Fosetil AI		0.02 mg Kg	0.1 mg Kg	88,1 %	94,4 %	Etefom		0.05 mg Kg	1.5 mg Kg	90,8 %	88,8 %	MOR, DEA, TEA		0.05	0.1	110,3% - 118,2%	88,6% - 107,5%						
CQ, DQ e PQ																																
0,02 mg Kg	0.05 mg Kg																															
87,8 % - 90,5 %	91,5 % - 113,4 %																															
Fosetil AI																																
0.02 mg Kg	0.1 mg Kg																															
88,1 %	94,4 %																															
Etefom																																
0.05 mg Kg	1.5 mg Kg																															
90,8 %	88,8 %																															
MOR, DEA, TEA																																
0.05	0.1																															
110,3% - 118,2%	88,6% - 107,5%																															
Repetitividade	≤ 20%	<table><tr><td colspan="2">CQ, DQ e PQ</td></tr><tr><td>0,02 mg Kg</td><td>0.05 mg Kg</td></tr><tr><td>4,0 % - 6,5 %</td><td>2,7 % - 3,3 %</td></tr><tr><td colspan="2">Fosetil AI</td></tr><tr><td>0.02 mg Kg</td><td>0.1 mg Kg</td></tr><tr><td>0,6 %</td><td>3,0 %</td></tr><tr><td colspan="2">Etefom</td></tr><tr><td>0.05 mg Kg</td><td>1.5 mg Kg</td></tr><tr><td>1,2 %</td><td>1,4 %</td></tr><tr><td colspan="2">MOR, DEA, TEA</td></tr><tr><td>0.05</td><td>0.1</td></tr><tr><td>4,5%-9,1%</td><td>3,8%-7,6%</td></tr><tr><td colspan="2">Glifosato e Ácido Fosfônico</td></tr><tr><td>0.05</td><td>0.1</td></tr><tr><td colspan="2">Procedural calibration – sem avaliação da recuperação</td></tr></table>	CQ, DQ e PQ		0,02 mg Kg	0.05 mg Kg	4,0 % - 6,5 %	2,7 % - 3,3 %	Fosetil AI		0.02 mg Kg	0.1 mg Kg	0,6 %	3,0 %	Etefom		0.05 mg Kg	1.5 mg Kg	1,2 %	1,4 %	MOR, DEA, TEA		0.05	0.1	4,5%-9,1%	3,8%-7,6%	Glifosato e Ácido Fosfônico		0.05	0.1	Procedural calibration – sem avaliação da recuperação	
CQ, DQ e PQ																																
0,02 mg Kg	0.05 mg Kg																															
4,0 % - 6,5 %	2,7 % - 3,3 %																															
Fosetil AI																																
0.02 mg Kg	0.1 mg Kg																															
0,6 %	3,0 %																															
Etefom																																
0.05 mg Kg	1.5 mg Kg																															
1,2 %	1,4 %																															
MOR, DEA, TEA																																
0.05	0.1																															
4,5%-9,1%	3,8%-7,6%																															
Glifosato e Ácido Fosfônico																																
0.05	0.1																															
Procedural calibration – sem avaliação da recuperação																																

Reprodutibilidade	≤ 20%	CQ, DQ e PQ	
		0,02 mg·Kg	0,05 mg·Kg
		3,7% - 6,6%	3,5 % - 14,8
		Fosetil Al	
		0,02 mg·Kg	0,1 mg·Kg
		1,8 %	11,6 %
		Etefom	
		0,05 mg·Kg	1,5 mg·Kg
		6,7 %	2,2 %
		MOR, DEA, TEA	
		0,05	0,1
		5,1 % - 9%	5,7 % - 8,6 %

* Glifosato, DDAC e BAC serão validados no segundo semestre, pois é a previsão de recebimento de amostras para análise, porém estão sendo avaliados atualmente em amostras reais através de calibração de nível único (*do inglês, single level calibration*).

Na figura 54 tem-se um exemplo de uma das curvas analíticas obtidas para o PQ. Verifica-se a adequação do modelo linear utilizado, assim como os resíduos aceitáveis ≤ 20%.

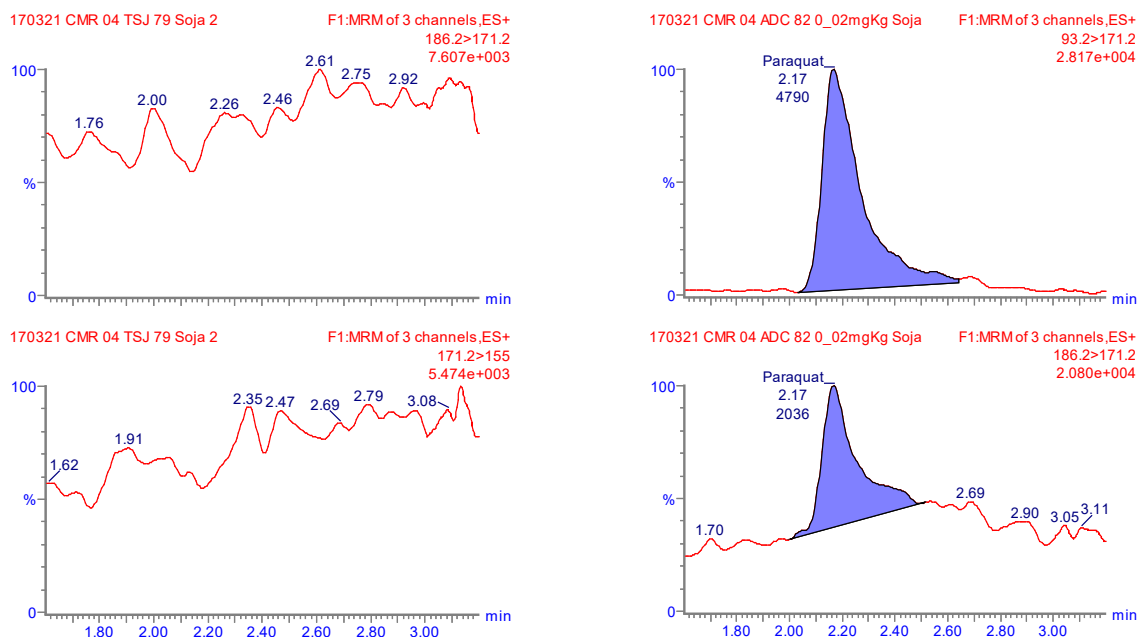
Figura 39 - Gráfico de resíduos e curva de calibração para o PQ: gráfico de resíduos (acima) e a curva de calibração (abaixo).



A especificidade atendeu ao critério do SANTE (2017), onde são permitidos sinais de interferentes endógenos da matriz de até 30% daquele obtido no menor nível de calibração. Para todas as substâncias avaliadas não foram identificados sinais

analíticos de interferentes endógenos no branco da matriz no mesmo tempo de retenção do analito. Na figura 55 temos um exemplo para a adequação da especificidade de o método, onde é comparada o cromatograma para o Branco da matriz e matriz fortificada no LOQ do método.

Figura 40 - Cromatogramas do para a testemunha de soja (esquerda) e na amostra fortificada com PQ (direira)



6.4 Uso do método desenvolvido para a análise de amostras reais

A etapa inicial de desenvolvimento dos métodos de análise foi concluída para todas as substâncias químicas propostas neste estudo.

Este estudo foi desenvolvido em parceria com o Núcleo de Alimento Seguro e Sustentável do Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP-PE), no Laboratório de Agrotóxicos e Contaminantes em Alimentos (LABTOX). As amostras recebidas foram de livre demanda. Considerando o período de 2016 a 2018 e a substância química a qual se pretendia analisar foi possível avaliar a aplicação dos métodos em amostras reais, conforme indicado na tabela a seguir.

Tabela 25 - Matriz , Substância Química determinada e quantidade de amostras analisadas de acordo com o período

Matriz	Substância Química	Número de determinações	Período
Uva	Etefom	1048	2016-2018
Manga	Fosetil e ácido fosfônico	109	2016
Maça, Mamão, Manga e uva	MOR, DEA e TEA	170	2016-2018
Soja	PQ, DQ e CQ	42	2018
Soja	Glifosato	16	2017-2019

Os resultados obtidos são discutidos nas próximas seções.

6.4.1 Frutos do VSMF

6.4.1.1 Determinações de Etefom

Durante o período 2016-2018, foi realizada uma pesquisa da ocorrência de resíduos de ETH em uvas. Um total de 1048 amostras de uvas foram obtidas e analisadas pelo método QuPPE com modificações. Em 484 amostras (46%) o nível de ETH foi inferior ao LOQ do método, enquanto 547 amostras (53%) continham resíduos abaixo do LMR da UE de 1,0 mg Kg⁻¹. Estas amostras foram principalmente uvas exportadas para a Europa, assim foram detectadas violações em 17 amostras (2%) do total. Quanto à regulamentação brasileira, onde o LMR é de 0,1 mg Kg⁻¹, dez vezes inferior ao LMR europeu, um total de 420 (40%) amostras de uvas não obedeceram a regulamentação.

Comparando os resultados do primeiro ano de monitoramento com os resultados de 2017 e 2018, a taxa de amostras positivas teve uma ligeira queda de 64% para 53% e 52%, respectivamente. Da mesma forma, a taxa de amostras com acima do LMR da UE diminuiu de 3% em 2016 para 2% em 2017 e nenhuma violação

foi identificada em 2018. Na tabela 28 são apresentados os resultados quanto a incidência e o nível de ETH nas uvas provenientes de SMSF.

Tabela 26 - Incidência e concentração dos resíduos de ETH encontrados nas amostras de uva analisadas durante os anos de 2016, 2017 e 2018.

Ano de monitoramento	positivas/total	Positiva (%)	No. de amostras			Etefom (mg kg ⁻¹)		
			≤ 0,1mgKg	> EU MRL	>BR MRL	Média	Mediana	Max
2016	185/288	64	21	7	156	0,25	0,14	1,88
2017	153/310	53	41	10	112	0,16	0,01	1,53
2018	233/450	52	81	0	152	0,11	0,05	0,96

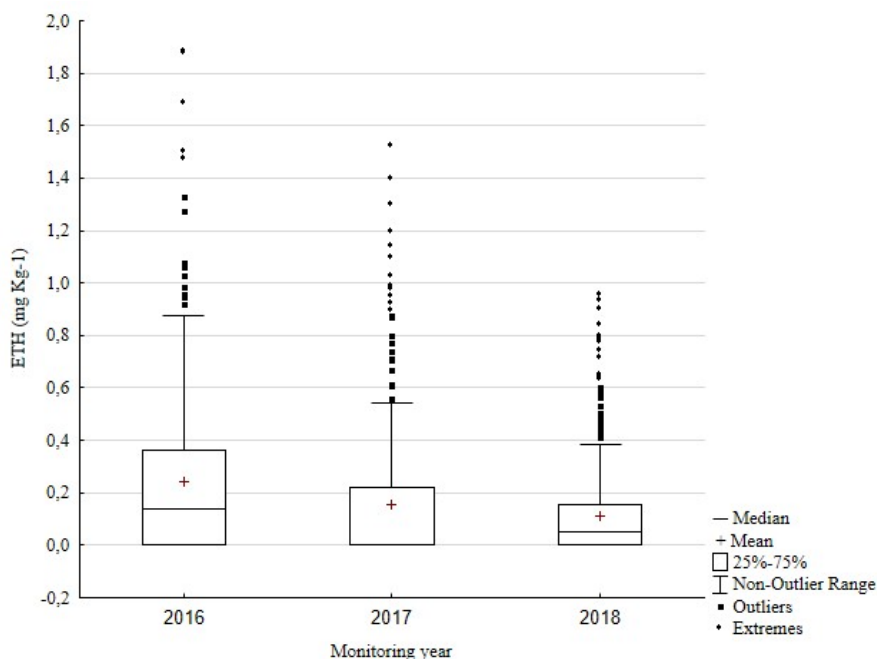
> EU LMR = acima do LMR UE (1,0mg/Kg); > BRLMR = acima do LMR do Brasil (0,1mg/Kg)

O teste estatístico de Kruskal-Wallis com um nível significativo (α) de 0,05 foi utilizado para comparar o nível médio de ETH entre os três anos consecutivos. A hipótese nula foi rejeitada e as diferenças para a concentração média de ETH foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Para esclarecimento das observações, foi utilizado o teste da média-Whitney com nível significativo (α) de 0,05 para avaliar as diferenças entre dois anos independentes. Os resultados mostraram que a magnitude entre as médias dos níveis de ETH nas amostras foi estatisticamente significativa quando o primeiro ano de monitoramento foi comparado com 2017 ou 2018 ($p < 0,05$). Essas diferenças podem ser atribuídas a uma alta incidência (64%) de ETH em 2016.

Conforme demonstrado nos boxplots (figura 2), o nível de ETH em 2016 foi mais disperso do que nos outros anos. A diferença entre a média e a mediana indica que existem algumas amostras de uvas com valores extremos que elevaram a média. Utilizando a mesma análise, mas aplicada para comparar o ano de 2017 com 2018, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Figura 41 - Dispersão dos resultados obtidos para o ETH em amostras de uvas nos três anos de monitoramento. A parte inferior do box plot defini os percentis 25 e 75, a linha horizontal dentro da caixa corresponde ao valor da mediana e as linhas verticais são um indicador da variabilidade dos dados.



Uma explicação para a maior incidência e níveis médios de ETH em 2016 pode ser consequência do período inicial de monitoramento do ETH pelos produtores. Nas etapas de produção agrícola, devem ser realizadas análises sistemáticas para conhecer os efeitos dos tratamentos ETH pré-colheita na qualidade das uvas (FRACARO ET AL. 2004; FERRARA ET AL. 2016; KOK E BAL 2017). Provavelmente, em safras subsequentes, os produtores fizeram esforços para diminuir a quantidade de ETH presente nas uvas. De fato, como discutido acima, os anos 2017 e 2018 mostraram uma redução comparável no nível de ETH, indicando um direcionamento na prevenção contínua de resíduos de ETH acima do LMR após o ano 2016.

Na Tunísia, estudos sobre a ocorrência de resíduos de pesticidas mostraram um alto índice de contaminação de uvas de mesa produzidas naquele país, quase 50% das amostras foram positivas para resíduos de mais de um pesticida. Além disso, 94% no período da colheita apresentaram resultados insatisfatórios devido à superação dos LMRs (BOUAGGA ET AL. 2019). Outra pesquisa realizada na Argélia sobre contaminação de frutas e vegetais por resíduos de pesticidas em 13 tipos

diferentes de culturas detectou taxas de 57% de amostras com resíduos de pesticidas, mas a taxa de amostras não conformes foi de 12,5% (MEBDOUA ET AL. 2017).

Os dados da literatura mostram que não há estudos sobre a presença de ETH em frutas do SMSF, além disso, são limitados a relatórios de programas de monitoramento. Geralmente, esses relatórios pertencem a regiões específicas e abrangem commodities de frutas nacionais e importadas (POULSEN 2017). Um exemplo desses relatórios é a autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) de 2012, que mencionou a análise de ETH em 393 amostras de uvas sendo detectado em 19% das amostras. Duas amostras excederam o LMR, uma da África do Sul e outra de uma região não identificada (EFSA 2014). Na sequência destas investigações, em 2015, a EFSA pesquisou ETH em 475 amostras de frutas nas quais 20% apresentaram resíduos de ETH e em seis delas LMR da UE foi excedido (EFSA 2017). Além disso, em 2016, de acordo com o Laboratório de Referência da UE para métodos específicos (CVUA), dentre 99 amostras de uvas analisadas, nenhuma delas apresentou concentração de ETH acima do LMR (SCHERBAUM et al. 2016).

No Brasil, desde 2001, a Agência Nacional de Vigilância (ANVISA) implementou o primeiro programa de monitoramento da Análise de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (PARA). Foram coletadas amostras para monitoramento de resíduos em supermercados locais e distribuidores de alimentos (Jardim et al., 2018). Este Programa é contínuo e, portanto, nem todas as *commodities* são analisadas a cada ano, o que é semelhante ao procedimento utilizado pelos programas de monitoramento da UE (POULSEN, 2017).

Os dados mais recentes publicados pela ANVISA sobre ETH em amostras de uvas são de 2009, onde cerca de 165 amostras de uvas foram coletadas nos estados brasileiros. Em 22,4% das amostras, foram detectados resíduos de ETH e a maior concentração encontrada foi de 1,12 mg Kg⁻¹. O relatório não é claro sobre quantas amostras excederam o LMR BR.

Em resumo, a ocorrência de resíduos de ETH em uvas observada foi de acordo com os dados encontrados em relatórios de monitoramento anteriores. Por conseguinte, pode concluir-se que a incidência de resíduos de ETH em uvas provenientes de VSMSF analisadas antes da sua importação foi superior a dos relatórios de monitoramento da UE para amostras de uvas importadas. Outros estudos de ETH aqui citados foram baseados em amostras importadas coletadas na chegada

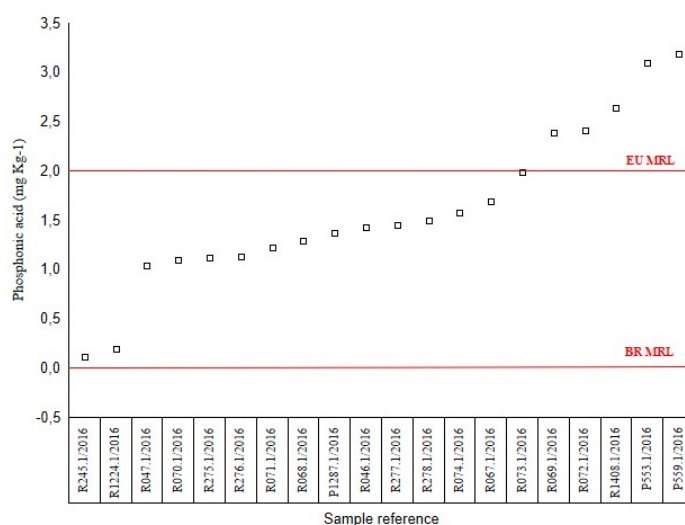
ao porto de distribuição, supermercados e centros de distribuição de hortaliças. Uma peculiaridade do presente estudo foi avaliar as frutas frescas coletadas pelo produtor no seu local de produção. Nesse sentido, os níveis e a incidência de compostos encontrados nas frutas devem ser maiores, pois compostos polares como ETH apresentam um período ótimo a ser aplicado na pré-colheita para evitar níveis elevados de resíduos, uma vez que a sua concentração residual diminuiu rapidamente até o momento da colheita do fruto (Ferrara et al., 2016).

6.4.2 Determinações de Fosetil Al e ácido Fosfônico

No ano de 2016 foram analisadas 109 amostras de manga procedentes do VSMSF quanto à presença de fosetil e seu metabólito o ácido fosfônico.

Em 20 (18%) amostras, foi detectado apenas o ácido fosfônico em concentrações que variaram de 0,12 a 3,2 mg Kg⁻¹ e nenhuma das amostras foi positiva para o fosetil. Na europa o LMR refere-se à soma do fosetil, do ácido fosfônico e seus respectivos sais, todos expressos como fosetil. Neste contexto, cinco amostras (5%) apresentaram valores superiores ao LMR da UE de 2 mg Kg⁻¹. A Figura 47 mostra os resultados obtidos para amostras positivas de manga neste estudo.

Figura 42 – Resultados obtidos para determinação de ácido fosfônico em manga



EU LMR = LMR UE (1,0mg/Kg); BRLMR = LMR do Brasil

Esses resultados foram comparados com investigações semelhantes realizadas pela UE. De acordo com Bauer (2013), a taxa média de agrotóxicos nas uvas aumentou dez vezes em 2012 devido à inclusão do monitoramento fosetil, em sua pesquisa foram detectados níveis entre 0,028 e 45,5 mg kg⁻¹. Além disso, foram encontrados resíduos de fosetil até mesmo na produção orgânica, sendo relacionados ao uso de fertilizantes fosfonatos. Estudos semelhantes foram realizados com outros produtos de origem vegetal. Wieland et al. (2014) analisaram 2340 amostras de frutas e vegetais e encontraram resíduos de fosetil em 40% deles. Segundo o autor, 95% das amostras apresentaram ácido fosfônico e 5% fosetil. Portanto, conforme encontrado no presente levantamento, pode-se concluir que o alto teor de ácido fosfônico é frequente em produtos de origem vegetal. Nas árvores frutíferas, o metabolismo do fosetil foi investigado, sendo o ácido fosfônico o principal produto de importância toxicológica (BRANCATO et al. 2018)

As frutas produzidas no VSMSF possuem um rigoroso controle sobre o uso de agrotóxicos autorizados para a cultura. Devido à importância no processo de certificação das frutas é fundamental demonstrar a segurança e rastreabilidade de seus produtos até o consumo (DÖRR E GROTE, 2009).

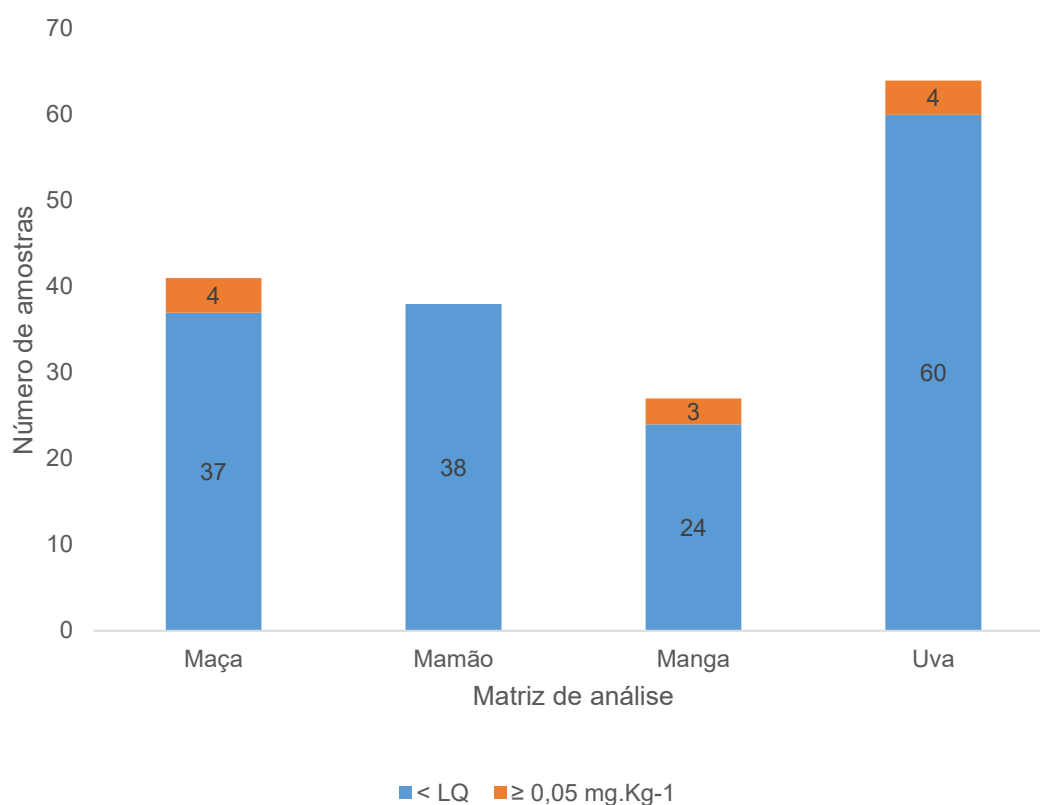
A ANVISA não autoriza o uso de fosetil em manga e não possui LMR oficial para o ácido fosfônico, conseqüentemente os resíduos de ácido fosfônico encontrados possivelmente são resultantes do uso de fertilizantes, o que poderia se assemelhar ao tratamento com fosetil (EFSA, 2017). Apesar deste fato, o ácido fosfônico pode ser utilizado como fungicida em culturas alimentares (THAO 2009). Na Alemanha, o ácido fosfônico deixou de ser incluído como adubo foliar devido à sua ação predominante como fungicida (WIELAND 2014). O presente estudo forneceu evidências importantes para a atualização da definição de resíduos de fosetil na legislação brasileira, considerando a ocorrência de ácido fosfônico, independentemente de sua origem, conforme discutido acima. A ausência de ácido fosfônico entre os produtos a serem monitorados pode comprometer a avaliação dos alimentos exportados, tornando-se uma barreira à comercialização de frutas brasileiras.

6.4.3 Frutos produzidos no Brasil

6.4.3.1 Determinações de MOR, DEA e TEA

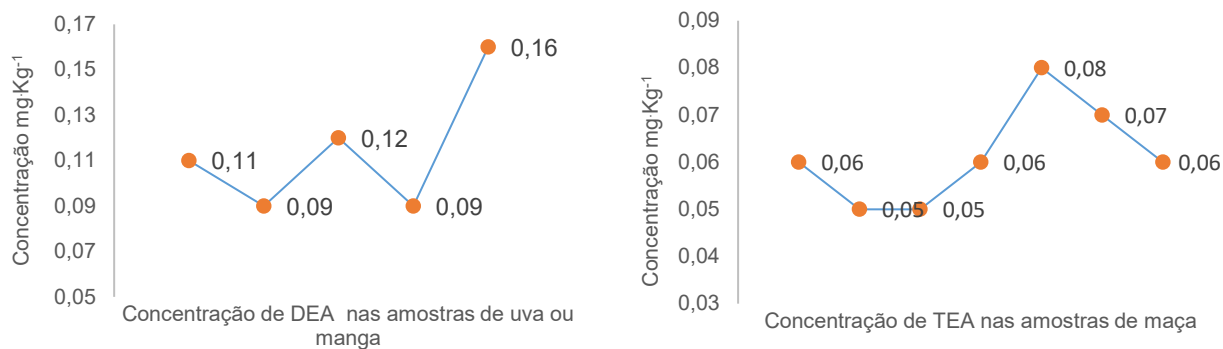
O método validado foi empregado para análise de 170 amostras com etapa única de extração e determinação por LC-MS/MS para a análise simultânea de MOR, DEA e TEA durante o período de 2016-2018.

Figura 43 - Quantitativo de amostras com resíduos de MOR, DEA ou TEA quantificáveis (laranja) e <LOQ



A pesquisa dessas substâncias no Brasil é inédita, ainda mais se consideramos que o levantamento incluiu os principais estados produtores de frutas do país. Nenhuma das amostras analisadas quanto a presença da MOR apresentou resíduos quantificáveis dessa substância, porém 11 (6,5%) das amostras apresentaram resultado positivo para DEA ou TEA.

Figura 44 - Concentrações (mg.Kg⁻¹) de DEA (esquerda) e TEA (direita) determinadas nas amostras de frutas



● Amostra com resultado positivo

A detecção de DEA e TEA em algumas das matrizes avaliadas indica a necessidade de monitorar este tipo de substância química a fim de garantir a segurança alimentar destes produtos. Porém, não temos ainda uma situação na qual o uso dessas substâncias encontra-se em níveis elevados. É importante que o Brasil inclua a MOR, DEA e TEA, como compostos a ser monitorados o mais breve, haja vista ser de uso na cadeia de produção de frutos, conforme constatou o estudo.

Um levantamento do Centro de Controle e Saúde Animal alemão (CVUA-Stuttgart) entre outubro de 2010 a maio de 2012 para um total de 256 amostras de frutas analisadas quanto a presença de MOR, DEA e TEA demonstrou que entre as *commodities* com resíduos dessas substâncias as mais contaminadas foram a manga, o limão e o mamão. No caso específico do Brasil a TEA em manga foi a principal contaminação (KOLBERG et al., 2013).

De acordo com o BVL da Alemanha (Escritório Federal de Proteção aos Consumidores e Segurança Alimentar), a TEA pode ser utilizada como co-formulante em agrotóxicos autorizados, o que torna o seu julgamento complicado, e eventualmente poderão gerar mais uma barreira fitossanitária.

No Brasil, assim como na Europa não existe LMR de resíduo em frutos para essas substâncias, portanto seu uso não é permitido em nenhuma matriz de alimentos.

6.4.4 Soja produzida no Brasil

6.4.4.1 Determinações de Glifosato

Foram analisadas um total de 16 amostras de soja quanto a presença do Glifosato. Em todas foram detectadas resíduos dessa substância conforme apresentado na tabela.

Tabela 27 – Resultados (mg Kg⁻¹) para os resíduos de glifosato encontrados nas amostras de soja analisadas.

Ref. Amostra	Mês/ano	mg/Kg
SOJ01	mar/17	2,880
SOJ02	mar/17	0,429
SOJ03	abr/17	4,639
SOJ04	jun/17	2,021
SOJ05	jul/17	0,202
SOJ06	ago/17	2,905
SOJ07	ago/17	1,184
SOJ08	ago/17	2,905
SOJ09	mar/18	0,122
SOJ010	mar/18	0,116
SOJ011	abr/18	2,887
SOJ012	mai/18	0,687
SOJ013	jun/18	2,35
SOJ014	fev/19	0,374
SOJ015	mar/19	2,015
SOJ016	jul/19	3,790

O resultado positivo para 100% das amostras foi dentro do esperado, uma vez que a dessecação da soja com o glifosato é uma prática agronômica comum e visa uniformizar a área da soja, reduzir plantas daninhas e adiantar a sua colheita (EMBRAPA, 2018). No Brasil cerca de 92% da área de soja plantada é transgênica, para a qual é aplicado o glifosato na pré e pós-emergência das plantas infestantes. De acordo com ANVISA, o limite máximo de resíduo (LMR) para este herbicida na soja, é de 10 mg Kg⁻¹ e o intervalo de segurança para a cultura da soja geneticamente modificada é de 56 dias em qualquer modalidade de emprego.

A concentração do glifosato nas amostras analisadas variou de 0,116 mg Kg⁻¹ a 4,639 mg Kg⁻¹, ou seja, abaixo do LMR no Brasil. A sua época de aplicação na cultura deve ser anterior ao ponto de maturidade fisiológica dos grãos de soja, pois sendo translocável do seu ponto de aplicação tem uma ação sistêmica no vegetal alterando o desenvolvimento da planta. As amostras analisadas tiveram origem de plantios comerciais de soja, portanto a obtenção do máximo rendimento é uma característica a ser alcançada a cada safra, assim condições ambientais e estágio fisiológico da soja são observados. Albrecht et al. (2011) conclui que os o desempenho agrônômico e os teores de proteínas na soja podem ser potencialmente alterados com aplicação de glifosato em doses elevadas.

Na Argentina, a ocorrência de glifosato em na soja transgênica foi avaliada por Arregui et al (2003) e foram encontrados resíduos entre 0,1 mgKg⁻¹ a 1,8 mg Kg⁻¹ nos grãos de soja, ainda segundo o estudo a concentração do glifosato foi maior quanto mais próximo da colheita, sendo a concentração detectada nos grãos cerca de 40-50% menores do que nas folhas e caules.

Alimentos infantis produzidos no Brasil a base de soja foram avaliados por Rodrigues e Souza (2017), em cerca de 50 (50,5%) foram detectados resíduos de glifosato. Os teores mais altos foram encontrados em extratos isolados de soja chegando a 1,08mg Kg⁻¹. Por outro, lado alimentos preparados a base de proteína de soja apresentaram valor máximo de 0,17mg Kg⁻¹.

Segundo nota técnica da ANVISA as intoxicações agudas por glifosato apresentam grande magnitude, mas não causam sequelas. A letalidade do Glifosato é principalmente em virtude do baixo grau de informação dos usuários (ANVISA, 2018). De acordo com o presente levantamento não foram evidenciados níveis acima do permitido do glifosato nas amostras analisadas, porém o monitoramento contínuo deve ser implementado, principalmente por o glifosato ser o agrotóxico mais consumido no Brasil, estando diretamente relacionado ao plantio de soja. A Anvisa incluiu em seu relatório de monitoramento 2013-2015 a necessidade de pesquisar agrotóxicos como o glifosato, priorizando-se as culturas em que essas substâncias são mais utilizadas (ANVISA, 2016), porém ressaltou a dificuldade diante dessas análises necessitar de métodos dedicados.

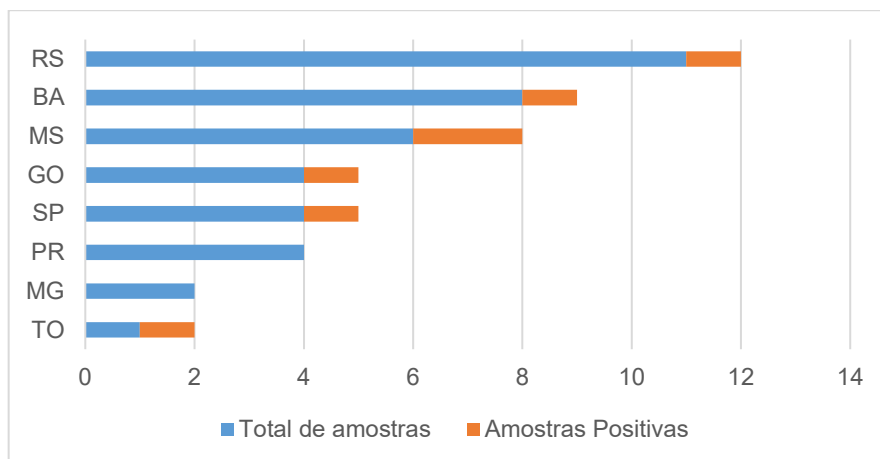
6.4.4.2 Determinações de PQ, DQ e CQ

Durante o ano de 2018 foram realizadas análises de 43 amostras de soja quanto a presença do PQ, DQ e CQ. Em nenhuma delas foram detectados resíduos de DQ e CQ. Entretanto, foram encontrados resíduos de PQ em 10 (23%) das amostras variando entre $0,02 \text{ mg Kg}^{-1}$ e $0,04 \text{ mg Kg}^{-1}$, ou seja, abaixo do LMR vigente de acordo com a ANVISA para a Soja.

O PQ tem sido amplamente utilizado em outras culturas como trigo, cevada, lentilhas, soja, etc. dentre as suas vantagens o uso do herbicida PQ não altera o rendimento e a qualidade fisiológica de sementes de soja, independente da época de aplicação (Daltro et. Al, 2010), temos também a antecipação da colheita (Lacerda et. Al 2003). A ocorrência de resíduos do PQ pode estar relacionada a sua aplicação em intervalos pré-colheita e com a fase de maturação dos grãos de soja. Assim sendo, pode-se obter teores adequados do PQ respeitando a esses critérios (almeida et al. 1991). Segundo o Ministério da Agricultura o PQ foi em 2014 o oitavo agrotóxico mais comercializado no Brasil com aproximadamente 33 milhões de toneladas comercializada (Agrofit/MAPA, 2014).

No presente estudo, as amostras tiveram origem de diferentes estados no Brasil e correspondem a lotes distintos. Com exceção de MG e BA, todos os outros estados pesquisados apresentaram pelo menos uma amostra positiva para o PQ (Figura 45).

Figura 45 - Quantidade de amostras analisadas segundo o estado onde foram coletadas as amostras e total de amostras positivas para o herbicida PQ.



É importante notar que o presente estudo objetivou uma avaliação do uso do método proposto na rotina analítica de um laboratório de alta demanda para análise de resíduos de agrotóxicos empregando cromatografia HILIC, até então uma análise não efetuada por nenhum laboratório no Brasil. Dessa forma não se objetivou um plano de amostragem.

Não foram encontrados dados na literatura para o monitoramento de Quats em soja no Brasil, porém no trabalho realizado por Zuma et al. (2018) para 20 amostras comerciais de cevada e trigo provenientes do BR quanto a presença do PQ, DQ e CQ, foram detectadas amostras positivas para o PQ (4 de cevada e 8 de trigo), sendo todas as amostras consideradas não conformes. As técnicas para determinação de compostos polares evoluíram nos últimos anos e espera-se que com a sua difusão a implantação de programas permanentes de monitoramento para segurança alimentar da população brasileira. Os resíduos encontrados de PQ, a baixas concentrações, na soja neste trabalho, pode ser um indicativo do uso reduzido desses herbicidas nos locais de produção da soja, assim como o tratamento empregado nas lavouras respeitou a sua carência e período de aplicação. Contudo, no meio ambiente o PQ apresenta um alto potencial para contaminação através de transporte associado a sedimento ou a água (MILHOME ET AL. 2009). A maior preocupação está no fato de que o Paraquat, aderido às partículas sólidas, pode ser carregado por águas de escoamento superficial (ABREU *et al.*, 2008).

O PQ terá sua proibição de uso em 2020 no Brasil, todavia é importante consolidar o monitoramento de resíduos em grãos, incluindo a soja, haja vista os dados de comercialização e pela presença desse herbicida, mesmo que em níveis reduzidos, conforme encontramos no presente estudo.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo, um método de extração para a determinação Fosetil, Ácido Fosfônico, Etefom, MOR, DEA, Glifosato, PQ, DQ eCQ e em fruta foi empregado juntamente com a otimização do método de cromatográfico e espectrométrico na análise de frutas e soja. Apesar da diversidade de matrizes testadas o método foi validado proporcionando linearidade, recuperação, precisão e LQ adequados ao uso pretendido.

O método proposto permitiu uma etapa única de extração para as substâncias supracitadas, no entanto a cromatografia foi realizada utilizando diferentes colunas cromatográficas devido a características químicas inerentes as substâncias químicas estudadas.

Finalmente o método foi empregado para análise de amostras reais, nas quais foi possível identificar a contaminação dos frutos.

De um total de 1157 amostras de frutos destinadas à exportação, apenas 1,9% comunicaram ter excedido os LMR da UE.

Os resultados obtidos indicaram uma boa prática agrícola relevante na utilização de ETH para a produção de uvas no âmbito do SMSF. Observou-se uma diminuição da incidência e dos níveis médios de etefão entre 2016 e 2018, demonstrando a utilização correta do regulador de crescimento desta planta nas culturas de uva.

O monitoramento do fosetil, juntamente com o ácido fosfônico, atende aos requisitos de exportação da UE, mas também mostra a importância de relatar o ácido fosfônico para auxiliar o órgão regulador brasileiro na revisão da definição de resíduos de fosetil.

A metodologia de análise para MOR, DEA, TEA foi aplicada para 170 amostras. O uso dessas substâncias no Brasil não é regulamentado e para a EU são proibidas em alimentos. Através de nossa pesquisa foram identificadas 6,5% das amostras com resíduos de DEA ou TEA, foram encontrados em concentrações de até 0,16 mg·Kg⁻¹.

Os resultados para as análises de PQ e Glifosato mostraram que estes herbicidas estão sendo utilizado no cultivo da soja, mas há uma perspectiva de

controle do uso desses produtos, já que não foram identificadas amostras não conformes.

Por outro lado, a presença de substâncias proibidas ou acima do LMR nos frutos analisados indica a necessidade da constante avaliação da qualidade dos frutos produzidos como forma controle de qualidade e garantia da inocuidade quanto a presença de contaminantes para a segurança de alimentos.

REFERÊNCIAS

ADAMS, Stuart et al. Development and Validation of Ion Chromatography–Tandem Mass Spectrometry-Based Method for the Multiresidue Determination of Polar Ionic Pesticides in Food. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 65, n. 34, p.7294-7304, 21 abr. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00476>.

AFEK, U.; SZTEJNBERG, A.. Effects of fosetyl-Al and phosphorous acid on scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus to *Phytophthora citrophthora*. **Phytopathology**, Rehovot,, v. 1, n. 79, p.736-739, dez. 1989.

AG, Paraquat Information Center On Behalf Of Syngenta Crop Protection (Ed.). **The science of paraquat**. 2017. Disponível em: <<http://paraquat.com/knowledge-bank/chemistry-and-biochemistry/the-science-of-paraquat>>. Acesso em: 02 fev. 2017.

ALICEWEB (Brasil). **Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior**. 2017. Disponível em: <<http://aliceweb.mdic.gov.br/>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

ALLICEWEB (Brasil). **Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior**. 2017. Disponível em: <<http://aliceweb.mdic.gov.br/>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

ALLICEWEB. **Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior**. 2017. Disponível em: <<http://aliceweb.mdic.gov.br/>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

ALVES FILHO, José Prado. **Receituário agrônomo: a construção de um instrumento de apoio a gestão dos agrotóxicos e sua constroevérsia**. 2000. 235 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência Ambiental, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2000.

ALVES, Renata Domingos et al. Fast determination of four polar contaminants in soy nutraceutical products by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 408, n. 28, p.8089-8098, 5 set. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-016-9912-2>.

ALVES, Renata Domingos et al. Fast determination of four polar contaminants in soy nutraceutical products by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 408, n. 28, p.8089-8098, 5 set. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-016-9912-2>.

AMARANTE JUNIOR, Ozelito Possidônio de et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.589-593, jul. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422002000400014>.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile

extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412–431, 2003.

ANASTASSIADES, Michelangelo et al. **Quick Method for the Analysis of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS**. 2016. Disponível em: <http://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPE-PO_EurlSRM.pdf>. Acesso em: 01 fev. 2017.

ANDRIGUETO, José Rozalvo; KOSOSKI, Adilson Reinaldo. Certificação garante produção integrada e alimento seguro. **Revista Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 1, n. 7, p.56-60, jan. 2007. Semestral.

ANERJEE, Kaushik et al. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1173, n. 1-2, p.98-109, nov. 2007. Elsevier BV

ANGOLA CHEMICALS (Angola). **Trietanolamina (TEA)**. Luanda: Angola Chemical, 2017. 3 p.

ANVISA. Consulta Pública nº 77, de 2007. Alterar a Classificação Toxicológica (de Classe IV para Classe I), na monografia do ingrediente ativo G01 – GLIFOSATO, publicada por meio da Resolução - RE Nº 165, de 29 de agosto de 2003, DOU de 02 de setembro de 2003.. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**.

ANVISA. Consulta Pública nº 77, de 2007. Alterar a Classificação Toxicológica (de Classe IV para Classe I), na monografia do ingrediente ativo G01 – GLIFOSATO, publicada por meio da Resolução - RE Nº 165, de 29 de agosto de 2003, DOU de 02 de setembro de 2003.. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 24 ago. 2007.

ANVISA. Nota Técnica nº 02/17, de 2017. **Posicionamento da Anvisa Referente à Recomendação 028/2016 Aprovada em Reunião Plenária do Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – Consea**.

APROSOJA. **Uso da Soja**. 2014. Disponível em: <<http://aprosojabrasil.com.br/2014/sobre-a-soja/uso-da-soja/>>. Acesso em: 05 fev. 2017.

ARAUJO, Josinaldo Lopes et al. Interação fosfito e fosfato no crescimento e na nutrição fosfatada do feijoeiro em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s.l.], v. 37, n. 2, p.482-490, abr. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-06832013000200019>.

ARAUJO, Leonardo et al. Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**, [s.l.], v. 33, n. 2, p.148-152, abr. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1982-56762008000200009>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. ABNT NBR ISO 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração, 2 ed., 2005.

BABBITT, J. K; POWERS, M. J.; PATTERSON, M. E.. Effects of growth-regulators on cellulase, polygalacturonase, respiration, color, and texture of ripening tomatoes. **Amer Soc Hort Sci J**, Alexandria, v. 98, n. 1, p.77-81, jan. 1973.

BADEN-MAYER, Alexis. **Monsanto's Roundup. Enough to Make You Sick**. 2015. Divulgado por Organic Consumers Association. Disponível em: <<https://www.organicconsumers.org/news/monsantos-roundup-enough-make-you-sick>>. Acesso em: 05 mar. 2017.

BAUER, Anna et al. Determination of Fosetyl and Phosphonic Acid at 0.010 mg/kg Level by Ion Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 66, n. 1, p.346-350, 20 dez. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03464>.

BERTRAND, A.. Etude des proprietes d'une nouvelle famille de fongicides: les monoethyl phosphites metalliques. caracteristiques physico chimiques et proprietes biologiques. **Phytiatrie-phytopharmacie**, França, v. 1, n. 26, p.3-17, jan. 1977.

BORDIN, Aline B. et al. Determination of Pesticide Residues in Whole Wheat Flour Using Modified QuEChERS and LC–MS/MS. **Food Analytical Methods**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.1-9, 28 maio 2016. Springer Nature.

BOTERO-COY, A.m. et al. Direct liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1313, p.157-165, out. 2013. Elsevier BV.

BOTITSI, Helen; TSIPI, Despina; ECONOMOU, Anastasios. Current Legislation on Pesticides. **Applications In High Resolution Mass Spectrometry**, [s.l.], p.83-130, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-809464-8.00004-x>.

BOUAGGA, A. et al. Pesticide residues in Tunisian table grapes and associated risk for consumer's health. **Food Additives & Contaminants: Part B**, [s.l.], v. 12, n. 2, p.135-144, 14 fev. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19393210.2019.1571532>.

BRASIL. Anvisa. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Anvisa Monografias**. 2017c. Disponível em: <<https://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>>. Acesso em: 07 fev. 2017.

BRASIL. ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos: RELATÓRIO DAS ANÁLISES DE AMOSTRAS MONITORADAS NO PERÍODO DE 2013 A 2015**. Brasília: Anvisa, 2016. 246 p.

BRASIL. EMBRAPA. **A região do vale do rio São Francisco**. 2017. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/prod_int/regiaosf.html>. Acesso em: 03 abr. 2017.

BRASIL. Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 12 jul. 1989.

BRASIL. Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 12 jul. 1989.

BRASIL. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF,

BRASIL. MAPA. **MAPA altera registros de agrotóxicos destinados às pragas do trigo e da cevada**. 2017a. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/mapaalteraregistrosdeagrototoxicosdestinados-aspragasdotrigoecevada>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de garantia da qualidade analítica**. Brasília: Mapa, 2011. 227 p.

BRASIL. Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992. Ratificar os termos das "Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins - no 1, de 9 de dezembro de 1991", publicadas no D.O.U. em 13 - 12 -91. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 03 1992.

BRASIL. SIDRA-IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática**. 2017b. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 05 abr. 2017.

BRASILIA. CODEVASF. **Cadastro Frutícola do Vale do São Francisco**: 1999. Brasília: Codevasf, 1999.

BRASILIA. CODEVASF. **Cadastro Frutícola do Vale do São Francisco**: 1999. Brasília: Codevasf, 1999.

BURG, Stanley P.; BURG, Ellen A.. Ethylene action and the ripening of fruits. **American Association For The Advancement Of Science**, Washington Dc, v. 148, n. 3674, p.1190-1196, 28 maio 1965.

BUS, James S. et al. A mechanism of paraquat toxicity in mice and rats. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.501-513, mar. 1976. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-008x\(76\)90073-9](http://dx.doi.org/10.1016/0041-008x(76)90073-9).

BUSZEWSKI, Bogusław; NOGA, Sylwia. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 402, n. 1, p.231-247, 31 ago. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>.

CARMONA, Marcelo; SAUTUA, Francisco. Os fosfitos no manejo de doenças nas culturas extensivas. **Revista Plantio Direto**, São Paulo, v. 1, n. 2011, p.19-22, 26 dez. 2011.

CARMONA-RIBEIRO, Ana; CARRASCO, Letícia de Melo. Cationic Antimicrobial Polymers and Their Assemblies. *International Journal Of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 14, n. 5, p.9906-9946, 10 maio 2013. MDPI AG.<http://dx.doi.org/10.3390/ijms14059906>.

CARNEIRO, Fernando Ferreira et al (Org.). **Dossiê Abrasco**: Um aletra sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: Expressão Popular, 2015. 628 p.

CARON, Vanessa Cristina; JACOMINO, Angelo Pedro; KLUGE, Ricardo Alfredo. Conservação de cenouras 'Brasília' tratadas com cera. **Horticultura Brasileira**, [s.l.], v. 21, n. 4, p.597-600, dez. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-05362003000400003>.

CARSON, Rachel. **Silent Spring**. New Yorker: Houghton Mifflin Company, 1962. 400 p.

CARVALHO, José Márcio; MIRANDA, Diogo Leitão. As exportações brasileiras de frutas: um panorama atual. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 47., 2009, Rn. **Anais...**Porto Alegre: As Exportações Brasileiras de Frutas: Um Panorama Atual, 2009. p. 1 - 20.

CARVALHO, Leonardo Bianco. **Plantas Daninhas**. Lages: Matologiaexperimental, 2013. 92 p.

CAVALCANTI, Josefa Salete Barbosa. Frutas para o mercado global. **Estudos Avançados**, Recife, v. 11, n. 29, p.79-73, jun. 1997.

CHAMKASEM, Narong; HARMON, Tiffany. Direct determination of glyphosate, glufosinate, and AMPA in soybean and corn by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 408, n. 18, p.4995-5004, 5 maio 2016. Springer Nature

CHEN, Dawei et al. Novel Dispersive Micro-Solid-Phase Extraction Combined with Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry To Determine Morpholine Residues in Citrus and Apples. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 63, n. 2, p.485-492, 21 jan. 2015. American Chemical Society (ACS).

CHEN, Ming-xue et al. Direct determination of glyphosate and its major metabolite, aminomethylphosphonic acid, in fruits and vegetables by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion-exchange liquid chromatography coupled with electrospray

tandem mass spectrometry. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1272, p.90-99, jan. 2013. Elsevier BV

CLOUTIER, Pierre-luc et al. QuEChERS extraction for multi-residue analysis of PCBs, PAHs, PBDEs and PCDD/Fs in biological samples. **Talanta**, [s.l.], v. 165, p.332-338, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.080>.

CONAB. **Levantamentos de Safra**. 2017. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

DELAFLANE, Keith S.. **Pesticide Usage in the United States: History, Benefits, Risks, and Trends**. Georgia: U.s. Department Of Agriculture Extension Service National Agriculture Pesticide Impact Assessment Program Special Project, 1996. 6 p.

DEUBER, Robert. **Ciência das Plantas infestantes: Fundamentos**. 5. ed. Londrina: dos Autores, 2005. 591 p.

DEUBER, Robert. **Ciência das Plantas infestantes: Fundamentos**. 5. ed. Londrina: dos Autores, 2006. 591 p.

DEUBER, Robert. **Ciência das Plantas infestantes: Fundamentos**. 5. ed. Londrina: Editora dos Autores, 2006. 591 p.

DORWEILER, Kelly. **Pesticide Residue Testing of Food Ingredients: Monitoring for Compliance and Safety**. 2014. Food Safety magazine online. Disponível em: <<http://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/december-2013january-2014/pesticide-residue-testing-of-food-ingredients-monitoring-for-compliance-and-safety/>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

DUKE, Thomas W.. Estuarine pesticide Research. In: PROCEEDINGS OF THE GULF AND CARIBBEAN FISHERIES INSTITUTE, 22., 1970, Florida. **Proceedings...**Gulf Breeze: Gulf And Caribbean Fisheries Institute, 1970. p. 146 - 153.

EBERLIN, M. N.. (Org.). **Espectrometria de massas: princípios e aplicações**. Campinas: Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas, 2011. Disponível em: <<http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=8&codassunto=63&numero=9>>. Acesso em: 08 abril 2017.

ECHA. **How can I use chemicals safely?** 2017. Disponível em: <<https://echa.europa.eu/chemicals-in-our-life/how-can-i-use-chemicals-safely>>. Acesso em: 07 abr. 2017.

EDISON, Sara. E. et al. Surface swabbing technique for the rapid screening for pesticides using ambient pressure desorption ionization with high-resolution mass spectrometry. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.127-139, 14 dez. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.4831>.

EFSA. Evaluation of monitoring data on residues of didecyldimethylammonium chloride (DDAC) and benzalkonium chloride (BAC). **Efsa Supporting Publications**, [s.l.], v. 10, n. 9, p.1-30, set. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.2903/sp.efsa.2013.en-483>.

ESPARZA, X.; MOYANO, E.; GARCERAN, M.t.. Analysis of chlormequat and mepiquat by hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry in food samples. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1216, n. 20, p.4402-4406, maio 2009. Elsevier BV

ESPARZA, X.; MOYANO, E.; GARCERAN, M.t.. Analysis of chlormequat and mepiquat by hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry in food samples. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1216, n. 20, p.4402-4406, maio 2009. Elsevier BV

ESTADOS UNIDOS. JAMES R. ROBERTS. **Recognition and Management of Pesticide Poisonings**. 6. ed. Washington: Epa, 2013. 277 p.

ESTADOS UNIDOS. USEPA. (Org.). **Recognition and Management of Pesticide Poisonings**. 6. ed. Washington: Epa, 2013. 277 p.

ESTADOS UNIDOS. USEPA. **Food and Pesticides**. 2017. Disponível em: <(ESTADOS UNIDOS, 2017)>. Acesso em: 05 fev. 2017.

ESTADOS UNIDOS. USEPA. **Food and Pesticides**. 2017. Disponível em: <<https://www.epa.gov/safepestcontrol/foodandpesticides>>. Acesso em: 05 fev. 2017.

EU UNIÃO EUROPEIA. Diretiva nº 2003/112/EC, de 01 de dezembro de 2003. Amending Council Directive 91/414/EEC to include paraquat as an active substance (Text with EEA relevance). **Official Journal**. Seção 321, p. 0032-0035.

EU. Diretiva nº 2003/112/EC, de 01 de dezembro de 2003. Amending Council Directive 91/414/EEC to include paraquat as an active substance (Text with EEA relevance). **Official Journal**. Seção 321, p. 0032-0035.

EU. Diretiva nº 91/414/EEC, de 11 de julho de 2007. APPLICATION for annulment of Commission Directive 2003/112/EC of 1 December 2003 amending Council Directive 91/414/EEC to include paraquat as an active substance (OJ 2003 L 321, p. 32). **Judgment**: Legal framework. EU, 11 jul. 2007.

EUROPEAN COMMISSION SANTE. **11945/2015**: Method Validation & Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food & Feed. Eu: Dg Sante, 2015. 46 p. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2017.

EVANGELISTA, José. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2000. 652 p.

FAO, 2010, Roma. **Empres Food Safety**: Emergency Prevention System for Food Safety. Roma: Fao, 2010. 44 p.

FAO, 2016, Roma. **Risk Based Imported Food Control Manual**. Roma: Fao, 2016. 169 p.

FAO. **FAOSTAT**. 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/>>. Acesso em: 05 mar. 2017.

FENN, M. E.; COFFEY, M. D.. Quantification of Phosphonate and Ethyl Phosphonate in Tobacco and Tomato Tissues and Significance for the Mode of Action of Two Phosphonate Fungicides. **Phytopathology**, [s.l.], v. 79, n. 1, p.76-82, 1989. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-79-76>.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2016, Roma. **Risk Based Imported Food Control Manual**. Roma: Fao, 2016. 169 p.

FRACARO, Antonio Augusto et al. Efeitos do ethephon sobre a produção da uva 'Niagara Rosada' (*Vitis labrusca* L.), produzida na entressafra na região de Jales-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.82-85, abr. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452004000100022>.

FRACARO, Antonio Augusto et al. Efeitos do ethephon sobre a produção da uva 'Niagara Rosada' (*Vitis labrusca* L.), produzida na entressafra na região de Jales-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.82-85, abr. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452004000100022>.

Friedle, A., Nitsopoulos, A., Lach, G., & Bruns, S. (2012, June). Determination of quaternary ammonium compounds (QAC) in food products. In *9th European Pesticide Residue Workshop, Vienna, Austria*.

GASKELL, Simon J.. Electrospray: Principles and Practice. **Journal Of Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 32, n. 7, p.677-688, jul. 1997. Wiley-Blackwell. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9888\(199707\)32:73.0.co;2-g](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1096-9888(199707)32:73.0.co;2-g).

GUAN, Rongxia et al. Genetic diversity comparison between Chinese and Japanese soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.) revealed by nuclear SSRs. **Genetic Resources And Crop Evolution**, [s.l.], v. 57, n. 2, p.229-242, 31 jul. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10722-009-9465-8>.

HANOT, V.; GOSCINNY, S.; DERIDDER, M.. A simple multi-residue method for the determination of pesticides in fruits and vegetables using a methanolic extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Optimization and extension of scope. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1384, p.53-66, mar. 2015. Elsevier BV

HANOT, V.; GOSCINNY, S.; DERIDDER, M.. A simple multi-residue method for the determination of pesticides in fruits and vegetables using a methanolic extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Optimization and extension of scope. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1384, p.53-66, mar. 2015. Elsevier BV

HANOT, Vincent et al. Rapid Determination of Ethephon in Grapes by Hydrophilic Interaction Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.524-530, 26 jun. 2014. Springer Nature.

HAYES, R. P. **Microbiologia e Higiene de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia Editorial, 1993. 376 p.

HENGEL, Matt J.; JORDAN, Rick; MAGUIRE, Wesley. Development and Validation of a Standardized Method for the Determination of Morpholine Residues in Fruit Commodities by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 62, n. 17, p.3697-3701, 30 abr. 2014. American Chemical Society (ACS).

HIRAI, Roberto D. **Mais produtividade na uva**. 2001. Elaborado por Revista Cultivar. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/artigos/maisprodutividade-nauva>>. Acesso em: 30 mar. 2017.

Huntsman Corporation. **Morpholine**. Texas: Huntsman Corporation, 2005. 29 p.

ITÁLIA. FAO. **Revised guidelines on environmental criteria for the registration of pesticides**. Roma: Fao, 1989. 51 p.

IVIC, Dario (Ed.). Curative and Eradicative Effects of Fungicides. In: CARISSE, Odile. **Fungicides**. Rijeka: Intechopen, 2010. p. 3-22. Disponível em: <www.intechopen.com>. Acesso em: 05 mar. 2017.

IVIC, Dario (Ed.). Curative and Eradicative Effects of Fungicides. In: CARISSE, Odile. **Fungicides**. Rijeka: Intechopen, 2010. p. 3- 2. Disponível em: <www.intechopen.com>. Acesso em: 05 mar. 2017.

JACKSON; BURGESS; COLQUHOUN. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.147-154, fev. 2000. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00422.x>.

JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes; ANDRADE, Juliano de Almeida; QUEIROZ, Sonia Claudia do Nascimento de. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.996-1012, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422009000400031>.

JORNALISMO AGROPECUÁRIO, 2015, Cuiaba. **Entendendo o Mercado da Soja**. Cuiaba: Jornalismo Agropecuario, 2015. 48 p.

KACZYŃSKI, Piotr. Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 230, p.524-531, set. 2017. Elsevier BV

KING, Michaela et al. Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. **Molecular Genetics And Genomics**, [s.l.], v.

284, n. 6, p.425-435, 30 set. 2010. Springer
Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00438-010-0579-7>.

KMELLÁR, B. et al. Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1215, n. 1-2, p.37-50, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.121>.

KOK, Demir; BAL, Erdinc. Enhancing Skin Color and Phenolic Compounds of Cv. Red Globe Table Grape (V. Vinifera L.) Utilizing of Different Preharvest Treatments. **Erwerbs-obstbau**, [s.l.], v. 60, n. 1, p.75-81, 23 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10341-017-0352-8>.

KOLBERG, Diana I. S. et al. Development and independent laboratory validation of a simple method for the determination of paraquat and diquat in potato, cereals and pulses. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 404, n. 8, p.2465-2474, 1 set. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-012-6340-9>.

KOLBERG, Diana I. S. et al. Development and independent laboratory validation of a simple method for the determination of paraquat and diquat in potato, cereals and pulses. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 404, n. 8, p.2465-2474, 1 set. 2012. Springer Nature.

KOLBERG, Diana I. S.. Morpholine, Diethanolamine and Triethanolamine Prohibited Additives in the EU. In: EPRW, 1., 2012, Vienna. **Poster**. Vienna: Eprw, 2012. p. 1 - 1.

KOWALSKI, Julie; COCHRAN, Jack. QuEChERS: Beyond the Basics. **Separationscience**, Europa, v. 5, n. 4, p.2-6, jan. 2013. Disponível em: <[http://www.sepscience.com/docs/Bespoke/Editions/SepSci/Sepsci0413eu.pdf?utm_source=iContact&utm_medium=email&utm_campaign=eLearningNewsletter - Europe Sep Sci&utm_content=>](http://www.sepscience.com/docs/Bespoke/Editions/SepSci/Sepsci0413eu.pdf?utm_source=iContact&utm_medium=email&utm_campaign=eLearningNewsletter-EuropeSepSci&utm_content=>)>. Acesso em: 20 mar. 2017.

LANÇAS, Fernando M.. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente. **Scientia Chromatographica**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.27-46, 2013. Editora Cubo Multimidia. <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2013.005>.

LANÇAS, Fernando M.. Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (HILIC). **Scientia Chromatographica**, [s. L.], v. 2, n. 1, p.49-57, jun. 2010.

LARA, Francisco J. et al. Evaluation of direct analysis in real time for the determination of highly polar pesticides in lettuce and celery using modified Quick Polar Pesticides Extraction method. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1496, p.37-44, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.03.020>.

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

LEITE, G. H. P.. **Maturação induzida, alterações fisiológicas, produtividade e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar**. 2005. 141 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Produção Vegetal, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

LI, B et al. Determination of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid Residues in Foods Using High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry. **Chinese Journal Of Chromatography**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.486-490, jul. 2007. China Science Publishing & Media Ltd.

LI, Pingping et al. Multiresidue Analysis of 113 Pesticides in Different Maturity Levels of Mangoes Using an Optimized QuEChERS Method with GC-MS/MS and UHPLC-MS/MS. **Food Analytical Methods**, [s.l.], v. 11, n. 10, p.2742-2757, 24 abr. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-018-1263-5>.

LIPORINI, Amanda Quatrocchio. **Avaliação de diferentes técnicas de preparo de amostras e perspectiva de síntese de um polímero seletivo para a concentração de-nitroso dietanolamina em matrizes cosméticas**. 2016. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Analítica e Inorgânica, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

LIU, Xiao-qin et al. A multi-residue method for simultaneous determination of 74 pesticides in Chinese material medica using modified QuEChERS sample preparation procedure and gas chromatography tandem mass spectrometry. **Journal Of Chromatography B**, [s.l.], v. 1015-1016, p.1-12, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.01.029>.

MACAU. FOOD SAFETY INFORMATION. **What are Plant Growth Regulators?** Disponível em: <<https://www.foodsafety.gov.mo/e/faq/detail.aspx?id=05340389-cc12-409c-9341-1ff5d57524f7>>. Acesso em: 01 abr. 2017.

MACHEREY-NAGEL (Alemanha). **NUCLEODUR® HILIC and NUCLEOSHELL® HILIC Useful complements to conventional C18 HPLC phases**. 2017. Disponível em: <<http://www.mn-net.com/tabid/11124/default.aspx>>. Acesso em: 03 fev. 2017.

MAHMOOD, Isra et al. Effects of Pesticides on Environment. **Plant, Soil And Microbes**, [s.l.], p.253-269, 2016. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_13.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O Estado da Arte da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência. **Quím. Nova**, v.32, n.1, p. 214-222. 2009

MARCHESE, Stefano et al. Pressurized Liquid Extraction Coupled with LC-ESI-MS-MS for the Determination of Herbicides Chlormequat and Mepiquat in Flours. **Chromatographia**, [s.l.], v. 70, n. 5-6, p.761-767, 12 ago. 2009. Springer Nature.

MARUR, C. J.. Fotossíntese e translocação de carboidratos em algodoeiros submetidos a déficit hídrico após aplicação de cloreto de mepiquat. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 10, n. 1, p.59-64, jan. 1998.

MEBDOUA, Samira et al. Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from Algeria. **Food Additives & Contaminants: Part B**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.91-98, 17 jan. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19393210.2016.1278047>.

MEDINA-PASTOR, Paula et al. Comparative Study of the Main Top-down Approaches for the Estimation of Measurement Uncertainty in Multiresidue Analysis of Pesticides in Fruits and Vegetables. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 59, n. 14, p.7609-7619, 27 jul. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf104060h>.

MEIN, Douglas. Glyphosate now the most used agricultural chemical ever. **Newsweek**. New York, p. 01-03. 02 fev. 2016.

MIYAGI, Fumie; TIMENETSKY, Jorge; ALTERTHUM, Flávio. Avaliação da contaminação bacteriana em desinfetantes de uso domiciliar. **Revista de Saúde Pública**, [s.l.], v. 34, n. 5, p.444-448, out. 2000. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-89102000000500003>.

NASCIMENTO, Henry Mendes; DELGADO, Denise Aparecida; BARBARIC, Ivana Filomena. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. **Revista Ceciliana**, São Paulo, v. 2, n. 1, p.11-13, jun. 2010.

NEMESTOTHY, G.s.; GUEST, D.i.. Phytoalexin accumulation, phenylalanine ammonia lyase activity and ethylene biosynthesis in fosetyl-Al treated resistant and susceptible tobacco cultivars infected with *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*. **Physiological And Molecular Plant Pathology**, [s.l.], v. 37, n. 3, p.207-219, set. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0885-5765\(90\)90012-m](http://dx.doi.org/10.1016/0885-5765(90)90012-m).

NEULS, Gisele (Ed.). **Ministério Público quer banir glifosato do Brasil**. 2015. Elaborado por Fernanda Farias do Canal Rural. Disponível em: <<http://www.canalrural.com.br/noticias/agricultura/ministeriopublicoquerbanir-glifosatobrasil56002>>. Acesso em: 02 mar. 2017.

OLIVEIRA JUNIOR, Rubem Silvério de (Ed.). Introdução ao Controle Químico. In: OLIVEIRA JUNIOR, Rubem Silvério D; CONSTANTIN, Jamil; INOUE, Miriam Hiroko (Ed.). **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Curitiba: Omnipress, 2011. Cap. 6. p. 125-140.

OLIVER, Richard; HEWITT, H. G.. **Fungicides in Crop Protection**. 2. ed. Oxfordshire: Cabi, 2014. 200 p.

PAIVA, R. P; SAIKI, M. Implantação do sistema de gestão da qualidade no laboratório de análise por ativação neutrônica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE METROLOGIA, 3., 2003, Recife. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Metrologia, 2003.

PARANJAP, Kalyane et al. **The Pesticide Encyclopedia**. Estados Unidos: Stylus Pub Llc, 2014. 640 p.

PERES, F., and MOREIRA, JC., orgs. **É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003. 384 p

PELEGRI, Rosa et al. The metabolism of fosetyl-aluminium and the evolution of residue levels in oranges and tangerines. **Pesticide Science**, [s.l.], v. 39, n. 4, p.319-323, 1993. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.2780390412>.

PICO, Yolanda. **Food Contaminants and Residue Analysis**. Oxford: Elsevier B.v., 2008. 51 v.

PINHEIRO, Aline Batista. Sanitização de frutas e hortaliças na indústria de alimentos. In: VI JORNADA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO E SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS, 6., 2011, Goiás. **Anais...**Goiás: Uego, 2011. p. 1 - 6.

PIZZUTTI, Ionara R. et al. Determination of paraquat and diquat: LC-MS method optimization and validation. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 209, p.248-255, out. 2016. Elsevier BV.

POKORNY, Robert. New Compounds. Some Chlorophenoxyacetic Acids. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 63, n. 6, p.1768-1768, jun. 1941. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja01851a601>.

POLGÁR, László et al. Retrospective screening of relevant pesticide metabolites in food using liquid chromatography high resolution mass spectrometry and accurate-mass databases of parent molecules and diagnostic fragment ions. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1249, p.83-91, ago. 2012. Elsevier BV

PORTOCARRERO, Márcio Antônio; KOSOSKI, Adilson Reinaldo. **Alimento seguro e produção integrada: uma parceria salutar**. 2015. Elaborada por Revistaq Alimentare. Disponível em: <<http://revistaalimentare.com.br/alimentoseguroe-producaointegradaumaparceriasaluta>>. Acesso em: 07 jan. 2017.

POULSEN, Mette Erecius et al. Results from the Danish monitoring programme for pesticide residues from the period 2004–2011. **Food Control**, [s.l.], v. 74, p.25-33, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.022>.

PRESTES, Osmar Damian. **Método Rápido para Determinação Simultânea de Resíduos de Agrotóxicos e Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal por LC-MS/MS**. 2011. 130 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

PRESTES, Osmar Damian; ADAIME, Martha Bohrer; ZANELLA, Renato. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.51-64, 2011. Editora Cubo Multimidia. <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2011.004>.

R, Deube. **Ciência das Plantas infestantes: Fundamentos**. 5. ed. Londrina: dos Autores, 2005. 591 p.

RAMOS, Marins Bianca (Org.). **Segurança alimentar no contexto da vigilância sanitária: reflexões e práticas**. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, 2014. 288 p.

RESEARCH, Market. **Plant Growth Regulators Market worth 1.91 Billion USD by 2020**. 2017. Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/plant-growth-regulators.asp>>. Acesso em: 07 fev. 2017.

RIBANI, Marcelo et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, [s.l.], v. 27, n. 5, p.771-780, out. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000500017>.

ROBERTO, Sergio Ruffo et al. Ethephon use and application timing of abscisic acid for improving color of 'Rubi' table grape. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 48, n. 7, p.797-800, jul. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2013000700013>.

ROBERTS, James R.; REIGART, J. Routt (Org.). **Recognition and Management of Pesticide Poisonings**. 6. ed. Washington: Epa, 2013. 277 p.

SANTE. **11945/2015**: Method Validation & Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food & Feed. Eu: Dg Sante, 2015. 46 p. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2017.

SARWAR, Muhammad. The Killer Chemicals as Controller of Agriculture Insect Pests: The Conventional Insecticides. **International Journal Of Chemical And Biomolecular Science**. Boston, p. 141-147. mar. 2015.

Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W. A., Schloss, J. V., Amrhein, N., Evans, J. N. S., & Kabsch, W. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98(4), 1376–1380. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/PNAS.98.4.1376>

SCHRÜBBERS, Lars C. et al. Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in leaves from Coffea arabica using high performance liquid chromatography with quadrupole mass spectrometry detection. **Talanta**, [s.l.], v. 146, p.609-620, jan. 2016. Elsevier BV..

SEIZE, Oga; CAMARGO, Marcia Maria de A.; BATISTUZZO, José Antônio de O.. **Fundamentos de Toxicologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu Sp, 2014. 685 p.

SILVA, Cassiano Oliveira da et al. **Segurança Alimentar e Nutricional**. [s. L.]: Rubio, 2015. 264 p.

SILVA, Marcelo de Almeida et al. Uso de reguladores de crescimento como potencializadores do perfilhamento e da produtividade em cana-

soca. **Bragantia**, [s.l.], v. 66, n. 4, p.545-552, 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0006-87052007000400003>.

Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior. **Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior**. 2017. Disponível em: <<http://aliceweb.mdic.gov.br/>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior. **Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior**. 2017. Disponível em: <<http://aliceweb.mdic.gov.br/>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

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

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA (Brasil). **Indicação Geográfica Vale do Submédio São Francisco**. 2015. Disponível em: <<http://sna.agr.br/indicacao-geografica-vale-do-submedio-sao-francisco/>>. Acesso em: 01 mar. 2017.

SUIÇA. WHO. **IARC Monographs Volume 112: evaluation of ve organophosphate insecticides and herbicides**. 112. ed. Genebra: Who, 2015. 2 p.

TAGUCHI, Vince Y. et al. Determination of diquat and paraquat in water by liquid chromatography-(electrospray ionization) mass spectrometry. **Journal Of The American Society For Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 9, n. 8, p.830-839, ago. 1998. Springer Nature. [http://dx.doi.org/10.1016/s1044-0305\(98\)00043-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1044-0305(98)00043-9).

TELLES, DANUZA LEAL. Inseticidas organoclorados e bifenilos policlorados (PCBs), na regioa estuarina de Itamaraca, PE: aspectos analiticos e ambientais. 2001. 167 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Oceanografia, UFPE, Recife, 2001.

THAO, Hoang Thi Bich; YAMAKAWA, Takeo. Phosphite (phosphorous acid): Fungicide, fertilizer or bio-stimulator?. **Soil Science And Plant Nutrition**, [s.l.], v. 55, n. 2, p.228-234, abr. 2009. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1747-0765.2009.00365.x>.

TOMLIM, C.. **The pesticide manual: incorporating the agrochemicals handbook**. Hampshire: Surrey: British Crop Prot. Publish, 1994. 1341 p.

TSAO, Yun-chen et al. Simultaneous Determination and Quantitation of Paraquat, Diquat, Glufosinate and Glyphosate in Postmortem Blood and Urine by LC–MS–MS. **Journal Of Analytical Toxicology**, [s.l.], v. 40, n. 6, p.427-436, 23 jun. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jat/bkw042>.

UGARE, Bharat et al. Dissipation kinetics of forchlorfenuron, 6-benzyl aminopurine, gibberellic acid and ethephon residues in table grapes (*Vitis vinifera*). **Food Chemistry**, [s.l.], v. 141, n. 4, p.4208-4214, dez. 2013. Elsevier BV

US. USDA. **Full Report (All Nutrients): 16108, Soybeans, mature seeds, raw**. Disponível em:

<<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/4845?fgcd=&manu;=&facet;=&format=Full&count;=&max=35&offset;=&sort;=&qlookup=16108>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

USDA. **Full Report (All Nutrients): 16108, Soybeans, mature seeds, raw.** 2017. Disponível em: <<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>>. Acesso em: 02 maio 2017.

USDA. **Full Report (All Nutrients): 16108, Soybeans, mature seeds, raw.** 2017. Disponível em: <<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>>. Acesso em: 02 maio 2017.

USEPA. **R.E.D. FACTS: Ethephon.** Washington Dc: Usepa, 1995. 11 p. EPA-738-F-95-004.

USEPA. **Reregistration Eligibility Decision For Chlormequat Chloride.** Washington DC, 2007

VALLEDA, Luciano. Apontado pela OMS como cancerígeno, importação de glifosato triplica no Brasil. **Rede Brasil Atual.** São Paulo, p. 1-4. 25 out. 2016.

WATERS CORPORATION (Estados Unidos). **Beginners Guide to UPLC: Ultra-Performance Liquid Chromatography.** New Jersey: Wiley, 2014. 56 p.

XIAN, Yanping et al. QuEChERS-based purification method coupled to ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC–MS/MS) to determine six quaternary ammonium compounds (QACs) in dairy products. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 212, p.96-103, dez. 2016. Elsevier BV.

ZIMDAHL, Robert L. **Fundamentals of Weed Science.** 4. ed. Colorado: Elsevier, 2013. 664 p.

APÊNDICE A - MANUSCRITO

FOOD ADDITIVES & CONTAMINANTS: PART B
<https://doi.org/10.1080/19393210.2019.1675779>



ARTICLE



Ethephon and fosetyl residues in fruits from São Francisco Valley, Brazil

Henrique Carlos Marinho Pereira da Silva, Danilo César Galindo Bedor, Adriano Nunes Cunha, Helio Oliveira dos Santos Rodrigues, Danuza Leal Telles, Adelia Cristina Pessoa Araújo and Davi Pereira de Santana

^aNúcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético/Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil; ^bLaboratório de Agrotóxicos e Contaminantes em Alimentos e Bebidas Alcoólicas, Instituto de Tecnologia de Pernambuco, Recife, Brazil

ABSTRACT

This survey describes the occurrence of Ethephon (ETH) and Fosetyl in fruits intended for export produced in the São Francisco Valley, Brazil. The determination of these compounds was carried out by the QuPPE-method (Quick Polar Pesticides Method), which was optimised and successfully validated according to the SANTE/11813/2017. From January 2016 to December 2018 a total of 1048 samples were analysed for ETH residues. In 547 (53%) of the samples, residues below the EU MRL of 1 mg kg⁻¹ were present. In 17 samples (2%) ETH residues were above 1 mg kg⁻¹. Overall, the mean ETH level decreased after 2016. Analyses of fosetyl showed that (18%) of 109 mango samples were positive for this compound. Phosphonic acid was found in concentrations ranging from 0.12 to 3.2 mg kg⁻¹ and 5% of the measurements were above the EU MRL of 2 mg kg⁻¹. The results emphasise the quality control of fruits produced in this region.

ARTICLE HISTORY

Received 23 April 2019
 Accepted 27 September 2019

KEYWORDS

Pesticides; grape; mango; Brazil; monitoring; QuPPE-method

Introduction

Fruit consumption is an important source in the prevention of chronic diseases like certain types of cancer and cardiopathies (WHO 2003; Wang et al. 2014). Brazil stands out worldwide for its great variety of fruits, ensuring several sources of nutrients and other non-nutritious substances.

Modern agriculture is characterised using new techniques and equipment, increase in the number of agricultural research and the use of a new diversity of material such as pesticides, fertilisers and additives. Due to new consumer demands for safer foods that are free of any kind contaminants harmful to human health, the international market adopted specific programmes to ensure quality control along the whole production chain. Put forward the observance of the allowed maximum limits of residues, sanitation and hygiene of the productive process, packaging and traceability (EC 2014). The European market in particular has become the most demanding and stands out as the main buyer of Brazilian fresh fruit, especially mangoes and grapes grown in the sub middle of São Francisco Valley (SMSF), as it is one of the few regions in the world with two to three harvests per year. Annually around 700 tons of mangoes and 300 tons of grapes,

from this region, are responsible for 98% of the table grapes and 95% of the mangoes exported from Brazil.

The use of high polar herbicides and plant growth regulators in agriculture has contributed to increase crop yield and to obtain fruits with desirable characteristics for the consumer, such as colour and uniformity of fruit ripening. Due to their low persistence in the environment, reduced toxicity and broad-spectrum activity, these compounds are widespread in fruit cultivation. Therefore, control of residues and verification of compliance with the MRL, according to crop and country of destination, become essential for consumer's food safety. Ethephon (ETH) and Fosetyl are highly polar compounds (HPC), frequently mentioned in residue control programmes for food of plant origin. In the past, there were many analytical difficulties and high costs involved in developing specific methods for their detection, hence the monitoring of HPCs was a rare activity (Adams et al. 2017). However, with the advancement of polar compound analysis techniques, their inspection was intensified (Bauer et al. 2018).

Ethephon (2-chloroethylphosphonic acid) is an organophosphorus plant growth regulator used in grapes during the thinning of the bunches, restriction of branch growth, intensification of the grape's colouration, increasing of the anthocyanin pigment of the wine grapes, and anticipation of maturation of the fruit (Hirai 2001). It also

CONTACT Henrique Carlos Marinho Pereira da Silva henriquecarlos@gmail.com

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/tfab.

© 2019 Taylor & Francis Group, LLC

helps the acquisition of the appropriate and homogeneous berry colouration, important characteristics, since it can easily be associated with a ripe and flavourful fruit (Fracaro et al. 2004). The versatility of this compound brought considerable gains in the production of grapes in terms of productivity and quality, being currently widely used in the cultivations of several fruits.

The fungicide fosetyl (ethyl hydrogen phosphonate) is used directly under the fungus or indirectly inducing the defence mechanism of the plant (Nemestothy and Guest 1990; Di Marco et al. 2011). The fosetyl variant used in the formulated products is the aluminium fosetyl. In the plant, fosetyl is hydrolysed in ethanol and in phosphonic acid (Pelegri et al. 1993), the latter can stay in the vegetal tissue for several years. Due to fosetyl metabolisation and the toxicological relevance of the phosphonic acid, the evaluation of residues must include both compounds (EFSA 2015).

The European Union established an MRL for ETH in grapes of 1.0 mg kg^{-1} (EC 2017a). In Brazil ETH is authorised for use in the production of grapes as a defoliant and its MRL is set at 0.1 mg kg^{-1} . The residue definition for fosetyl, according to the EC n°832/2018 resolution, includes the "sum of fosetyl, phosphonic acid and its salts, expressed as fosetyl", with MRL established of 2.0 mg kg^{-1} (EC 2018). However, in Brazil, fosetyl is prohibited in the mangoes and when authorised, the sum of its parental compounds is not included (ANVISA 2016).

Even though multiresidue methods are most appropriate for test laboratories, the introduction of specific methods is needed due to the chemical nature of polar ionic compounds (Alves et al. 2016; Adams et al. 2017). The new polar analyte method of extraction developed by Anastassiades et al. (2017) known as QuPPE-Method allowed the use of a same extraction procedure for a large number of polar ionic compounds analysed by the LC-MS/MS technique recommended to use isotopically label-deuterated internal standards (ILIS) which increases, consubstantially, the cost of individual analysis. In Brazil, there are six accredited laboratories for ETH residue analysis nevertheless, for fosetyl residue analysis, no laboratories can be found in INMETRO test laboratories accredited network (INMETRO 2018).

The purpose of this study was to investigate the presence of ETH and fosetyl in mangoes produced in the SMSF. Optimisation of the chromatographic method from the proposed QuPPE procedure was implemented and validated, using a matrix/compound combination without internal standard for both the analysis of ETH and fosetyl with metabolite phosphonic acid.

Materials and methods

Reagents, standard and materials

Acetonitrile and methanol grade pesticides were acquired from J. T. Baker Chemical (Philipsburg, USA). Formic acid was purchased at Sigma (St. Louis, USA). Ultrapure water with 18.2 M cm^{-1} resistivity was obtained from Milli-Q water system at Millipore (Bedford, USA). All reference standards were (ISO GUIDE 34) certified with >98% purity, ETH was acquired from AccuStandards® (New Haven, USA) in an acetonitrile solution at 100 µg mL^{-1} ; Fosetyl and phosphonic acid were purchased from Chem Service® (West Chester, USA). For the preparation of individual stock solutions of fosetyl and phosphonic acid, 10 mg of the standard powder was weighed with dilution, in water/methanol (3:1, v/v) and methanol, respectively, in order to obtain stock solution at a 1 mg mL^{-1} concentration. The solutions were stored at -20°C . Working solutions were prepared by diluting the stock solutions in 1% formic acid in water.

Sampling and sample preparation

All samples were from the Submiddle of São Francisco Valley located in the states of Bahia and Pernambuco (Figure 1). This region has an important role in the Brazilian export in *natura* agribusiness. The climate is semi-arid and a predominant irrigated agricultural activity. Sampling was performed in field by producers themselves and fruits were delivered in the laboratory from January to December through the years of 2016, 2017 and 2018. Sample packing and shipping to the laboratory were in boxes containing approximately 6 bunches of grapes or 10 units of mangoes and quartered according to the Codex Alimentarius procedures (FAO/WHO 1999). Samples were homogenised in Stephan® (Hamel, Germany) and two 100 g portions of each were stored in polypropylene flasks. One 100 g portion was used immediately for extraction and the other one was stored in a freezer (-22°C) for reanalysis when necessary. Around 1048 samples of grapes for ETH during three consecutive years and 109 mango samples were analysed for fosetyl/phosphonic acid in 2016.

Extraction of samples

The extraction was according to the QuPPE-method only without use of ILIS. Ten grams of homogenised sample was weighed into 50 mL polypropylene centrifuge tubes. Acidified methanol (1% formic acid) was added. The tube was homogenised in Geno/Grinder® 2010 (Metuchen, USA) for 2 min at 1000 rpm, followed by centrifugation at 5000 rpm for 5 min. Supernatant

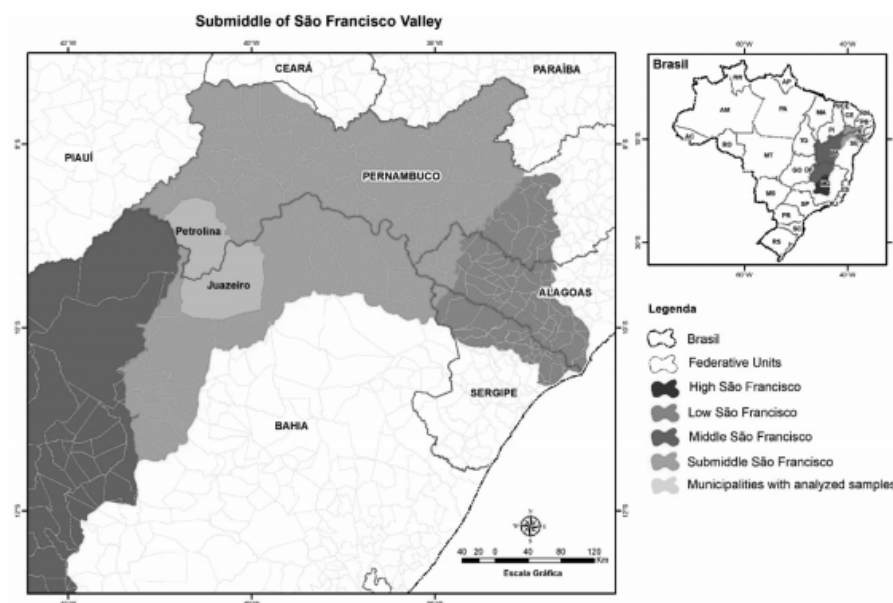


Figure 1. Map of surveyed São Francisco Valley region.

was filtered with cellulose syringe filter (0.44 μm) and final extract diluted 5 times with formic acid solution 1% (v/v) before UPLC-MS/MS analysis.

Instruments and conditions of analysis

All analyses were performed in a high-performance liquid chromatography Acquity I Class system coupled to a mass spectrometer (triple quadrupole QQQ) Xevo TQ-XS with an Electrospray source (ESI) – Z spray* by Waters Corporation (Milford, USA). The column was a Hypercarb (100 $\times$ 2.1 mm, 5 μm of the size of a particle) by Thermo Scientific (Waltham, USA). The isocratic mobile phase (A) consisted of acetic acid (1%, v/v) in water at the flow-rate of 0.25 mL/min with total running time of 5 min, temperature of 40°C and sample injection volumes of 10 μL . During the chromatographic conditions' optimisation, a mobile phase (B) acetic acid (1%, v/v) in methanol and a gradient profile of mobile phase A and B based on an official QuPPe Method were compared.

Initially, the parameters for operation of the ESI source were adjusted to maximise the intensity of the ion signal formed for the compound of interest using individualised standard solutions' infusion 0.1 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. All solutions were prepared in formic acid (0.1%, v/v) in water and infusion flow was 10 μL

min^{-1} , negative (ESI) source polarity and capillary voltage of 3 KV. Nitrogen gas source was produced by Peak Genius model NM32LA (Inchinnan, UK) system, cone gas flow was 50 L Hr^{-1} and the desolvation gas flow was 800 L Hr^{-1} . Temperatures of the source and desolvation were, 150°C and 500°C, respectively. The next step consisted of adapting the parameters of the mass analyser in order to obtain the Ion products. The compounds were detected in the Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode and Argon was used as the collision gas at a 0.15 mL min^{-1} . To determine the compounds in the MS/MS, the cone's voltage parameters were also optimised, collision energy of each of the compounds was analysed and the two more intense fragments (ion products) were used in confirmation and quantification of the chemical substances of interest (Table 1). The data were obtained with Mass Lynx V 4.2 and processed in the Target Lynx XS of Waters (Manchester, UK).

Table 1. MRM acquisition parameters of the target compounds at a cone voltage of 20 V. CE = collision energy.

Compound	Quantification m/z transition	CE (V)	Qualification m/z transition	CE (V)
Fosetyl	109 > 62.85	15	109 > 80.8	10
Phosphonic acid	80.9 > 79.0	14	80.9 > 63.1	12
Ethephon	142.9 > 106.9	27	107.1 > 79.1	11

Analytical quality control

A validation study was performed in accordance with the criteria set out in the SANTE Guidelines (European Commission SANTE/11813/2017) (EC 2017b). Linearity was evaluated for each compound individually by external standardisation using five calibration levels 0.05; 0.1; 0.2; 1.0; 2.0 mg kg⁻¹. In order to evaluate matrix effect, the calibration solutions were prepared using organic extracts of blank grape and mango, obtained from Qupe-extraction of ETH and fosetyl/phosphonic acid, respectively. Solvent calibration curve was prepared exactly the same way using formic acid (1%, v/v) in water as diluting solvent. Matrix effect was determined comparing the calibration curve slope for standards in the matrix and in solvent, the results were calculated according to equation: % ME = ((slope matrix/slope solvent)-1) x 100.

The accuracy and precision of the method were assessed using spiked blank samples. Recoveries were determined for five replicates at two spiking levels of 0.05 and 0.1 mg kg⁻¹. The precision intra-day (repeatability) and inter-day (intermediary precision) was estimated by the relative standard deviation (RSD%). The sensitivity of the method was calculated in terms of practical limit of quantitation (LOQ), corresponding the lowest spike concentration meeting performance acceptability criteria for recovery (70–120%) and RSD (≤20%). Uncertainty of measurement was estimated according to “top-down” approach on the basis of the data obtained in the validation study. Combined uncertainty was calculated from the measurement uncertainty of the lowest spiking level and the highest spiking level by using a coverage factor $k = 2$ at a confidence level of 95% (Kmellár et al. 2008; Medina-Pastor et al. 2011; Li et al. 2018). For monitoring the performance of the extraction method, within each analysis batch, 1 blank (non-spiked) sample and 1 spiked samples at LOQ were included as control samples.

Statistical analyses

Non-parametric statistical procedures were used because of the heterogeneous distribution of the data. The Kruskal–Wallis test was applied to verify significant differences in the three monitoring years among the

mean compound level, while the Mean–Whitney test was used for pair-wise comparison between the mean of all possible pairs. Statistical analyses and box plots were performed by using the program Statsoft Statistica *12.1 (CA, USA).

Results and discussion

Method quality assurance

Optimisation of the mobile phase was accomplished by investigating the chromatography in gradient and isocratic modes. The starting point was the QuPpe Protocol (Method 1.3) in which a gradient elution program using mobile phase A and B was necessary to obtain a satisfactory chromatogram in a total running time longer than 30 min. The objective, firstly then, was to reduce chromatographic run time. Alves et al. (2016) used Hypercarb® (graphitised carbon column) and a gradient of mobile phase A and B for optimum separation of the compounds giving a total running time of 10 min. In our study, compounds were analysed under isocratic conditions using only a mobile phase A.

A shorter analysis run time was achieved without compromising the method selectiveness and a mobile phase flow of 0.25 mL min⁻¹ was established reducing the total chromatographic run time to 5 min. These satisfactory results led to the method validation step.

Linearity was achieved (solvent and matrix-matched) over the concentration range of 0.05 mg Kg⁻¹ – 0.2 mg Kg⁻¹ and determination coefficients (r^2) were higher than 0.998.

The calibration curve using matrix-matched standard compared to the solvent standard indicated ion enhancement for ETH and fosetyl, while for phosphonic acid the matrix effect indicated an ion suppression (Table 2). In this work, the absence of ILIS did not affect the accuracy of the method and this procedure lowered significantly the costs to test laboratories. Recovery and the RSD calculated for spiked samples were in the range of 70–120% and ≤20%, respectively, in accordance with the SANTE 11813/2017 guideline. The sensitivity was enough to meet MRL requirements for ETH and fosetyl/phosphonic acid with a LOQ of 0.05 mg Kg⁻¹. On Table 3 a summary of the results for method validation is presented.

Table 2. Calibration curves in solvent and matrix, r^2 , matrix effect (ME) and retention time (Rt).

Compound	LOQ (mg Kg ⁻¹)	Range (mg Kg ⁻¹)	Solvent		Matrix		ME (%)	Rt (min.)
			Calibration curve	r^2	Calibration curve	r^2		
Ethephon	0.05	0.05–2	26300x+105.96	0.99	42766.2x+463.208	0.99	63	2.3
Fosetyl	0.05	0.05–2	3691.77x+16.4826	0.99	6271.04–9.02791	0.99	70	2.2
Phosphonic acid	0.05	0.05–2	68900.9x+400.731	0.99	47929.9x-34.2465	0.99	30	1.8

Table 3. Method performance data.

Table 3. Method performance data.								
Compound	Matrix	Spiked level	Intra-day (n = 5)		Intra-day (n = 5)		Inter-day RSD % (n = 10)	Uncertainty (%)
			Day 1		Day 2			
			Rec%	RSD%	Rec%	RSD%		
Ethephon	Grape	0.05	97	5.8	102	6.1	6.2	13.2
		0.5	104	2.8	105	2.9	2.7	
Fosetyl	Mango	0.05	102	7.4	105	10.6	8.8	16.8
		0.5	106	3.6	107	7.4	5.6	
Phosphonic acid	Mango	0.05	104	5.9	103	13	9.6	13.1
		0.5	103	2.4	111	2.7	4.7	

Determination of ethephon

A survey on the occurrence of ETH in grapes was realised during the period 2016–2018. A total of 1048 grape samples were obtained and analysed using a modified QuPpe method. In 484 samples, (46%) ETH level was below the LOQ of the method, while 547 samples (53%) contained residues below EU MRL of 1.0 mg Kg⁻¹. These samples were mainly grapes exported to Europe, thus violations were detected in 17 samples (2%) of the total. As for the Brazilian regulations, where MRL is 0.1 mg Kg⁻¹, 10 times lower than the European MRL, a total of 420 (40%) of grape samples did not meet regulatory requirements.

Comparing results of the first monitoring year with the results from 2017 and 2018, the rate of positive samples had a slight decrease from 64% then 53% and 52%, respectively. In the same way, the rate of samples with EU MRL exceedance decreased from 3% in 2016 to 2% in 2017 and no violation in 2018. Table 4 report incidence and level of ETH in grapes from SMSF.

The Kruskal–Wallis statistical test with a significant level (α) of 0.05 was used to compare the mean level of ETH between the three consecutive years. The null hypothesis was rejected and the differences for the mean ETH concentration were statistically significant ($p < .05$).

To clarify the observations, the Mean–Whitney test was used with a significant level (α) of 0.05 to evaluate the differences between two independent years. The results showed that the magnitude between the means of the ETH levels in the samples was statistically significant when the first year of monitoring was compared with 2017 or 2018 ($p < .05$). These differences can be attributed to a high incidence (64%) of ETH in 2016. As shown in boxplots (Figure 2), the ETH level in 2016

was more dispersed than in the other years. The difference between the mean and the median indicates that there are some samples of grapes with extreme values that increased the mean. Using the same analysis, but applied to compare the year 2017 with 2018, no statistically significant differences were found. ($p > .05$).

An explanation for the higher incidence and mean ETH levels in 2016 could be a consequence of the initial ETH monitoring period by the producers. Systematic analyses should be performed to find out the effects of ETH pre-harvest treatments on the quality of grapes (Fracaro et al. 2004; Ferrara et al. 2016; Kok and Bal 2017). Probably, in subsequent harvests, producers made efforts to decrease the amount of ETH present in the grapes. In fact, as discussed above, the years 2017 and 2018 showed a comparable reduction in the ETH level, indicating a focus on continuous prevention of non-compliant ETH residues in grape samples after the year 2016.

In Tunisia, studies on the occurrence of pesticide residues showed a high rate of contamination of table grapes produced in that country. Almost 50% of the samples were positive for residues of more than one pesticide. In addition, 94% at harvest period showed unsatisfactory results due to exceeding MRLs (Bouagga et al. 2019). A survey conducted in Algeria on fruit and vegetable contamination by pesticide residues in 13 different types of crops showed detection rates of 57%, but the rate of non-compliant samples was 12.5% (Mebdoua et al. 2017).

As a growth regulator, literature shows that there are no studies of the presence of ETH in fruits from SMSF and data are limited to monitoring programmes' reports. Generally, these reports belong to specific regions and cover national and imported fruit commodities (Poulsen et al. 2017). An example of these reports is the 2012

Table 4. Incidence and ethephon residues in grapes during 2016, 2017 and 2018.

Monitoring year	positive/total	Positive (%)	No. of samples			Ethephon (mg kg ⁻¹)		
			≤ 0,1mg/Kg	> EU MRL	>BR MRL	Mean	Median	Max
2016	185/288	64	21	7	156	0,25	0,14	1,88
2017	153/310	53	41	10	112	0,16	0,01	1,53
2018	233/450	52	81	0	152	0,11	0,05	0,96

EU MRL = 1,0 mg/Kg; BR MRL = 0,1 mg/Kg.

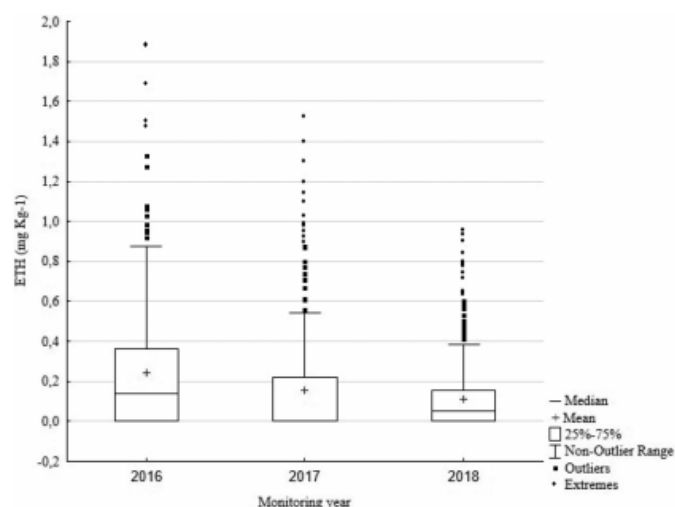


Figure 2. The distribution of ETH in grape samples of different monitoring years. The box bottom and top define the 25th and 75th percentiles, the horizontal line within the box corresponds to the median value and the vertical lines are an index of data variability.

European Food Safety Authority (EFSA) which mentioned that ETH was analysed in 393 grape samples and detected 19% of the samples. Two of them exceeded the MRL, one from south Africa and another from an unidentified region (EFSA 2014). Following these investigations, in 2015, EFSA also reported 475 residue analyses of ETH in which 20% of the samples showed ETH residues and in six of the cases, they exceeded the EU MRL (EFSA 2017). Also, in 2016, according to EU Reference Laboratory for single methods (CVUA), among 99 grape samples analysed, none of them presented MRL exceedance for ETH (Scherbaum et al. 2016).

In Brazil, since 2001 national surveillance agency (ANVISA) implemented the first monitoring programme for Pesticide Residue Analysis in Food (PARA). Samples were collected for residue monitoring in local supermarkets and food distributors (Jardim et al. 2018). This Programme is a rolling programme and so not all commodities are analysed every year which is similar to the procedure used by the EU monitoring programmes (Poulsen et al. 2017).

The most recent data published by ANVISA on ETH in grape samples are from 2009, with 165 samples of grapes collected in the Brazilian states. In 22.4% of the samples, ETH residues were detected and the highest concentration found was 1.12 mg Kg⁻¹. The report is not clear on how many samples exceeded the BR MRL.

In summary, the occurrence of ETH residues in grapes observed was in accordance with the data found in previous monitoring reports. It can therefore be concluded that the incidence of ETH residues in

grapes from SMSF analysed prior to its import was higher than EU monitoring reports for imported grapes. Other studies for ETH cited here were based on imported samples collected on arrival at the port of distribution, supermarkets and vegetable distribution centres. A peculiarity of the present study was to evaluate the fresh fruits collected by the producer at the site of fruit production. In this respect, the levels and incidence of compounds found in fruits should be higher, as polar compounds such as ETH have an optimal pre-harvest period to be applied in order to avoid residues' exceedances, since the residual concentration decreased rapidly until harvest (Ferrara et al. 2016).

Determination of fosetyl and phosphonic acid

During 2016, in total 109 mango samples from SMSF were analysed, for the presence of parent compound fosetyl and their metabolite phosphonic acid. In 20 of the samples (18%), phosphonic acid was detected in concentration ranging from 0.12 to 3.2 mg Kg⁻¹ and none of the samples were positive for fosetyl. The EU MRL refers to the sum of fosetyl and phosphonic acid and their salts, all expressed as fosetyl. In fruit trees, the metabolism of fosetyl has already been investigated, phosphonic acid being the main product of toxicological importance (Brancato et al. 2018). Given this context, five samples (5%) presented values above EU MRL of 2 mg Kg⁻¹. Figure 3 shows results obtained for positive mango samples in this study.

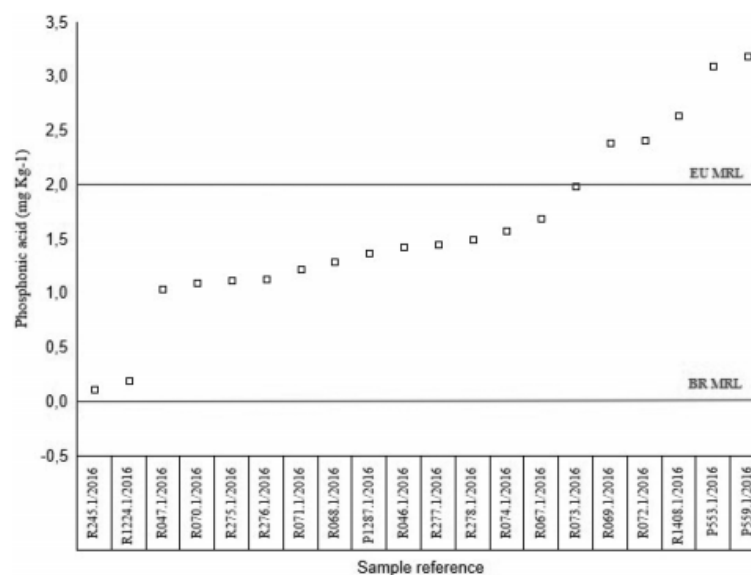


Figure 3. Phosphonic acid in mango samples.

Those results were compared with similar investigations that the EU has done. According to Bauer (2013), the average rate of pesticides in the grapes increased 10 times in 2012, due to the inclusion of fosetyl monitoring, levels between 0.028 and 45.5 mg kg⁻¹ were detected. Also, on the basis of their results, fosetyl residues were found even in organic production and were related to the use of fertilisers. Similar studies were carried out with other products of plant origin. Wieland et al. (2014) analysed 2340 samples of fruits and vegetables and found fosetyl residues in 40% of them. According to the author, 95% of the samples showed phosphonic acid and 5% fosetyl. Therefore, as found in the present survey, it can be concluded that the high content of phosphonic acid is recurrent in plant products.

The fruits produced in SMSF have a strict control over the use of pesticides authorised for the crop. Due to the importance in the process of certification of the fruits is essential to demonstrate the safety and traceability of their products until consumption (Dörr and Grote 2009). Brazilian Regulator Board, ANVISA, does not authorise fosetyl in mango and has no official MRL for phosphonic acid, consequently the phosphonic acid residues found suggest possibly resulting from the use of fertilisers, which could mimic the treatment with fosetyl (EFSA 2017). Despite this fact, phosphonic acid may be used as a fungicide in food crop (Thao and Yamakawa 2009). In Germany, it was no longer included

as a foliar fertiliser due to its predominant action as a fungicide (Wieland et al. 2014). The present study provided important evidence for updating the definition of fosetyl residues in Brazilian legislation, considering the occurrence of phosphonic acid, irrespective of its origin, as discussed above. The absence of phosphonic acid among the products to be monitored may compromise the evaluation of exported foods, becoming a barrier to the commercialisation of Brazilian fruits.

Conclusion

In this study, method optimisation showed a significant reduction in chromatographic runtime to as low as 5 min. The extraction for Fosetyl, phosphonic acid and ETH without the use of ILIS was optimised to only one step. This change did not impact in method accuracy. Due to simplification and rationalisation of procedures, the proposed method could be considered useful in routine analysis.

Out of a total of 1157 fruit samples intended for export, only 1.9% reported EU MRL exceedance.

The results obtained indicated a relevant good agricultural practice in the use of ETH for grape production in the SMSF. A decrease in the incidence and mean ethephon levels was observed from 2016 to 2018, demonstrating the correct use of this plant grow regulator in grape crops.

The monitoring of fosetyl, together with phosphonic acid, meets EU export requirements but also shows the importance of reporting phosphonic acid to assist the

Brazilian regulatory board in reviewing the definition of fosetyl residues.

References

- Adams S, Guest J, Dickinson M, Fussell RJ, Beck J, Schoutsen F. 2017. Development and validation of ion chromatography-tandem mass spectrometry-based method for the multiresidue determination of polar ionic pesticides in food. *J Agric Food Chem.* 65(34):7294–7304. doi:10.1021/acs.jafc.7b00476.
- Alves RD, Romero-González R, López-Ruiz R, Jiménez-Medina ML, Frenich GA. 2016. Fast determination of four polar contaminants in soy nutraceutical products by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 408(28):8089–8098. doi:10.1007/s00216-016-9912-2.
- Anastassiades M, Kolberg DL, Benkenstein A, Eichhorn E, Zechmann S, Mack D. 2017. Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in foods of plant origin via LC-MS/MS involving simultaneous extraction with methanol (QuPPE-Method) – version 9.3. In EU Reference Laboratory for pesticides requiring single residue methods (EURL-SRM). [accessed Jun 18]. http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=887&LabID=200&Lang=EN.
- [ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2016. Resolução RE nº 1729 de 30/06/16. DOU de 04/07/16. [accessed Nov 18]. <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>.
- [ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2018. Resolução RE nº 2.968 de 30/10/18. DOU de 01/11/18. [accessed Nov 18]. <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>.
- Bauer A, Luetjohann J, Rohn S, Kuballa J, Jantzen E. 2018. Determination of fosetyl and phosphonic acid at 0.010 mg/kg level by ion chromatography tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 66(1):346–350. doi:10.1021/acs.jafc.7b03464.
- Bouagga A, Chaabane H, Toumi K, Hamdane AM, Nasraoui B, Chaabane H, Nasraoui B. 2019. Pesticide residues in Tunisian table grapes and associated risk for consumer's health. *Food Additives & Contam B.* 12(2):135–144. doi:10.1080/19393210.2019.1571532.
- Brancato A, Brocca D, De Lentdecker C, Erdos Z, Ferreira L, Greco L, Villamar-Bouza L. 2018. Modification of the existing maximum residue levels for fosetyl-Al in tree nuts, pome fruit, peach and potato. *Efsa J.* 16:2. doi:10.2903/j.efsa.2018.5161.
- Di Marco S, Osti F, Calzarano F, Roberti R, Veronesi A, Amalfitano C. 2011. Effects of grapevine applications of fosetyl-aluminium formulations for downy mildew control on "esca" and associated fungi. *Phytopathol Mediterr.* 50 (SUPPL.):285–299.
- Domingos AR, Romero-Gonzalez R, Lopez-Ruiz R, Jimenez-Medina ML, Garrido Frenich A. 2016. Fast determination of four polar contaminants in soy nutraceutical products by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 408(28):8089–8098. doi:10.1007/s00216-016-9912-2.
- Dörr AC, Grote U. 2009. Impact of certification on fruit producers in the Sao Francisco Valley in Brazil. *Econ Appl Inf.* (2001):5–16.
- [EC] European Commission. 2014. The European Union explained: agriculture. [accessed Feb 17]. <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/946e612c-6b31-4805-89bc-b0c90fa881cf/language-pt>.
- [EC] European Commission. 2017a. Commission Regulation nº 1777/2017. [accessed Nov 18]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32017R1777&from=EN>.
- [EC] European Commission. 2017b. Document no. SANTE/11813/2017 – guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. [accessed Feb 17]. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf.
- [EC] European Commission. 2018. Commission Regulation nº 832/2018. [accessed Nov 18]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32018R0832>.
- [EFSA] European Food Safety Authority. 2014. The 2012 European Union report on pesticide residues in food. *Efsa J.* 12(12):3942. doi:10.2903/j.efsa.2014.3694.
- [EFSA] European Food Safety Authority. 2017. The 2015 European Union report on pesticide residues in food. *Efsa J.* 15:4. doi:10.2903/j.efsa.2017.4791.
- [EFSA] European Food Safety Authority. 2018. The 2016 European Union report on pesticide residues in food. *Efsa J.* 16(7). doi:10.2903/j.efsa.2018.5348.
- [FAO/WHO] Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. 1999. Recommended methods of sampling for the determination of pesticide residues for compliance with MRLs. *Codex alimentarius vol 2A.* [accessed Nov 18]. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/thematic-areas/pesticides/en/>.
- Ferrara G, Mazzeo A, Matarrese AMS, Pacucci C, Trani A, Fidelibus MW, Gambacorta G. 2016. Ethephon as a potential abscission agent for table grapes: effects on pre-harvest abscission, fruit quality, and residue. *Front Plant Sci.* 7(May):1–7. doi:10.3389/fpls.2016.00620.
- Fracaro AA, Pereira FM, Nachtigal JC, Barbosa JC. 2004. Efeitos do ETH sobre a produção da uva 'Niagara Rosada' (*Vitis labrusca* L.), produzida na entressafra na região de Jales-SP. *Revista Brasileira De Fruticultura.* 26(1):82–85. doi:10.1590/s0100-29452004000100022.
- Hirai RD. 2001. Mais produtividade na uva. *Revista Cultivar.* [accessed Nov 17]. <http://www.grupocultivar.com.br/artigos/maisprodutividade-na-uva>.
- [INMETRO] Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. 2018. Sistema de Consulta aos Escopos de Acreditação dos Laboratórios de Análises Clínicas (ISO 15189) e Laboratórios de Ensaio (ISO/IEC 17025) Acreditados (Rede Brasileira de Laboratórios de Ensaio – RBLE) [accessed Dez 18]. <http://www.inmetro.gov.br/laboratorios/rble/>.
- Kmellár B, Fodor P, Pareja L, Ferrer C, Martínez-uroz MA, Valverde A, Fernandez-alba AR. 2008. Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. 1215:37–50. doi:10.1016/j.chroma.2008.10.121.

- Kok D, Bal E. 2017. Enhancing skin color and phenolic compounds of Cv. Red globe table grape (*V. Vinifera* L.) utilizing of different preharvest treatments. *Erwerbs-Obstbau*. doi:10.1007/s10341-017-0352-8
- Li P, Duan Y, Ge H, Zhang Y, Wu X. 2018. Multiresidue analysis of 113 pesticides in different maturity levels of mangoes using an optimized QuEChERS method with GC-MS/MS and UHPLC-MS/MS. *Food Anal Methods*. 11:2742–2757. doi:10.1007/s12161-018-1263-5
- Mebdoua S, Lazali M, Ounane SM, Tellah S, Nabi F, Ounane G. 2017. Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from Algeria. *Food Addit Contam B Surveill*. 10:91–98. doi:10.1080/19393210.2016.1278047
- Medina-Pastor P, Valverde A, Pihlström T, Masselter S, Gamon M, Mezcuca M, Fernández-Alba AR. 2011. Comparative study of the main top-down approaches for the estimation of measurement uncertainty in multi-residue analysis of pesticides in fruits and vegetables. *J Agric Food Chem*. 59(14):7609–7619. doi:10.1021/jf104060h
- Nemestothy GS, Guest DI. 1990. Phytoalexin accumulation, phenylalanine ammonia lyase activity and ethylene biosynthesis in fosetyl-Al treated resistant and susceptible tobacco cultivars infected with *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*. *Physiol Mol Plant Pathol*. 37(3):207–219. doi:10.1016/0885-5765(90)90012-M
- [OECD] Organization For Economic Co-Operation and Development. 2016. Guidance document on the definition of residue. n63, Serie 31.
- Pelegri R, Gamón M, Coscollá R, Beltrán V, Cuñat P. 1993. The metabolism of fosetyl-aluminium and the evolution of residue levels in oranges and tangerines. *Pestic Sci*. 39:319–323. doi:10.1002/ps.2780390412
- Poulsen ME, Andersen JH, Petersen A, Jensen BH. 2017. Results from the Danish monitoring programme for pesticide residues from the period 2004–2011. *Food Control*. 74:25–33. doi:10.1016/j.foodcont.2016.11.022
- Scherbaum E, Hacker K, Lemke A. 2016. Residues and contaminants in fresh fruit from conventional cultivation, 2016. Report from a day in the lab. [accessed Feb. 2018]. http://www.cvuas.de/pub/beitrag.asp?subid=1&Thema_ID=5&ID=2522&Pdf=No&lang=EN
- Thao HTB, Yamakawa T. 2009. Phosphite (phosphorous acid): fungicide, fertilizer or bio-stimulator? *Soil Sci Plant Nutr*. 55(2):228–234. doi:10.1111/j.1747-0765.2009.00365.x
- Wang X, Ouyang Y, Liu J, Zhu M, Zhao G, Bao W, Hu FB. 2014. Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Br Med J*. 349:g4490. doi:10.1136/bmj.g4490
- [WHO] World Health Organization. 2003. Expert consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases (2002) Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation. [accessed Dez 2018]. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42665/WHO_TRS_916.pdf;jsessionid=7964895536BDDDE10634DD9C8F3D9DB2?sequence=1
- Wieland M, Bauer NI, Kolberg D, Wildgrube S, Anastassiades CM, Scherbaum E. 2014. Phosphonic acid : pesticide or "Foliar Fertilizier"? Residues in organic and conventional samples from the German market. European Pesticide Residue Workshop (EPRW) Dublin, Ireland 2014, EPRW.