

Determinação de nove fungicidas em suco de laranja por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas *tandem* e extração mini-Luke

Determination of nine fungicides in orange juice by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and mini-Luke extraction

Jaqueline F. Reichert

Ionara R. Pizzutti

Jonatan V. Dias

Carmem D. Cardoso*

Departamento de Química
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM
Av. Roraima 1000, Cidade Universitária
Bairro Camobi, CEP 97105-900,
Santa Maria, RS, Brasil
*carmem.dickow@ceparc.com.br

Recebido: 08 Set 2015

Aceito: 14 Dez 2015

Resumo

O Brasil é o maior produtor mundial de suco de laranja, porém, muitos dos agrotóxicos permitidos na citricultura brasileira, são proibidos pelos países importadores. Neste trabalho a extração mini-Luke e a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas *tandem* (UPLC-MS/MS) foram empregados para a determinação de nove agrotóxicos da classe dos fungicidas em sucos de laranja, todos com uso permitido no Brasil. A linearidade do método foi estudada na faixa de 0,1 a 100 ng mL⁻¹. Os resultados de recuperação e desvio padrão relativo (RSD%) ficaram dentro da faixa esperada (entre 70 a 120% e ≤ 20%, respectivamente) para todos os fungicidas, com exceção do tiofanato-metílico. Os valores de limite de quantificação de 10, 20 e 50 µg kg⁻¹ para seis, dois e um fungicidas estudados, respectivamente, são iguais ou inferiores aos valores dos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pelas legislações brasileira, americana e européia. O método validado foi aplicado na análise de amostras de suco de laranja natural e processado (concentrado, diluído e integral), perfazendo um total de 20 amostras. Todas as amostras apresentaram contaminação por piraclostrobina e trifloxistrobina; algumas amostras apresentaram contaminação por carbendazim, tebuconazol e tiofanato-metílico.

Palavras-chave: fungicidas, mini-Luke, suco de laranja, UPLC-MS/MS.

Abstract

Brazil is the largest producer of orange juice, however, many of the pesticides allowed in citrus in Brazil are not allowed by importing countries. In this study mini-Luke extraction and ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) were used for the determination of nine fungicide pesticides in orange juice, all allowed in Brazil. Method linearity was studied in the range of 0.1 to 100 ng mL⁻¹. Recovery and relative standard deviation (RSD%) were within the expected range (70 to 120% and ≤ 20%, respectively) for all fungicides, except for thiophanate-methyl. Quantification limit values were 10, 20 and 50 µg kg⁻¹ for six, two and one fungicide studied, respectively, are equal to or lower than the values of the maximum residue limits established by the Brazilian, American and European legislation. The validated method was applied in the analysis of natural and processed orange juice (concentrate, diluted and integral), in a total of 20 samples. All samples showed contamination by piraclostrobin and trifloxistrobin; some samples showed contamination by carbendazim, tebuconazole and thiophanate-methyl.

Keywords: fungicides, mini-Luke, orange juice, UPLC-MS/MS.

1. Introdução

O suco de laranja é o suco de fruta mais consumido no mundo todo, apreciado por seu sabor fresco e considerado benéfico para a saúde do consumidor devido à presença de vários compostos, tais como antioxidantes naturais e, dentre eles, vitamina C (ácido ascórbico)^[1].

O Brasil é o maior produtor mundial de laranjas, e destina mais de 80% dos frutos colhidos para a produção de sucos^[2]. Em 2012, o país teve problemas relacionados à exportação de suco de laranja concentrado devido à presença do fungicida carbendazim, permitido pela legislação brasileira, mas proibido pela legislação de outros países^[3]. Como o carbendazim, outros fungicidas também utilizados na citricultura no Brasil tem seu uso proibido em países importadores de suco de laranja brasileiro. Assim, monitoramentos são necessários para garantir a qualidade dos produtos para consumo humano e também proteger o homem, plantas, animais e ecossistemas da exposição aos agrotóxicos^[4].

Métodos multirresíduos oferecem vantagens em monitoramentos, pois são capazes de identificar simultaneamente um grande número de agrotóxicos e reduzir a quantidade de resíduos e o tempo de análise. Técnicas como cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD)^[5] e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas *tandem* (LC-MS/MS)^[4,6-10] podem ser aplicadas na maioria dos casos para a determinação de agrotóxicos polares. LC-MS/MS é uma das técnicas mais poderosas para a determinação de agrotóxicos em uma variedade de matrizes complexas, mostrando-se muito sensível para a determinação de resíduos em frutas e sucos de frutas^[9,10] e para agrotóxicos polares termoinstáveis que normalmente não podem ser determinados por cromatografia em fase gasosa ou exigem derivação antes da análise^[8].

Para matrizes complexas, o preparo de amostra é uma etapa muito importante, visto sua capacidade em remover as principais interferências que possam afetar o resultado final^[9-11]. A extração líquido-líquido é o método mais popular de preparo de amostras para o isolamento

de resíduos de agrotóxicos a partir de várias matrizes alimentares^[12]. Entretanto, nos últimos anos, foram utilizados diferentes métodos analíticos para a extração de fungicidas, como mini-Luke^[8], QuEChERS^[9,10], QuEChERS tamponado^[7], extração em fase sólida (SPE)^[13], extração com acetato de etila^[4,6] e extração assistida por microondas^[14].

O objetivo deste trabalho foi validar um método analítico para a determinação dos fungicidas azoxistrobina, carbendazim, difenoconazol, famoxadona, piraclostrobina, tebuconazol, tiabendazol, tiofanato-metílico e trifloxistrobina em suco de laranja (todos permitidos pela ANVISA)^[15], empregando o método mini-Luke para extração dos analitos a partir da matriz e posterior análise por UPLC-MS/MS.

De acordo com a classificação toxicológica estabelecida pela *United States Environmental Protection Agency* (US EPA), os fungicidas carbendazim, difenoconazol e tebuconazol são classificados como Grupo C, possíveis cancerígenos para os seres humanos^[16]. Alguns fungicidas estudados neste trabalho apresentam toxicidade para organismos aquáticos, como também podem apresentar persistência moderada no solo e contaminar os recursos hídricos^[17,18].

2. Experimental

2.1. Reagentes e materiais

Os padrões analíticos (pureza > 97%) dos fungicidas selecionados, incluindo o padrão interno (P.I.) propoxur (inseticida), foram adquiridos da empresa Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha). Os solventes acetona (grau resíduo), acetonitrila (grau HPLC) e ácido acético glacial (grau HPLC) foram adquiridos da J. T. Baker (Nova Jersey, EUA). Diclorometano (grau HPLC), metanol (grau HPLC) e éter de petróleo (grau resíduo) foram adquiridos da Mallinckrodt (Missouri, EUA). Formiato de amônio (P.A.) foi adquirido da Fluka Analytical (Seelze, Alemanha) e sulfato de sódio anidro, da UCT (Bristol, EUA).

2.2. Preparo das soluções analíticas

As soluções analíticas estoque individuais, na concentração de 1000 mg L⁻¹, foram preparadas em tolueno, metanol ou acetona, de acordo com a solubilidade de cada fungicida. Após, foi preparada uma solução mistura contendo todos os analitos na concentração de 1 mg L⁻¹. Todas as soluções foram mantidas sob refrigeração, em temperatura controlada a -18 °C. Posteriormente foram preparadas diluições da solução mistura nas concentrações de 20 e 100 ng mL⁻¹ e a partir destas soluções foram preparadas as soluções diluídas para a curva analítica, em metanol (contendo 0,1% de ácido acético glacial) e em extrato “branco” da matriz, nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 20,0 e 100,0 ng mL⁻¹.

2.3. Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema UPLC-MS/MS, Waters Acquity (Milford, EUA), a separação ocorreu em uma coluna analítica BEH C₁₈ (100 mm × 1,7 mm d.i., 1,7 μm) (Waters, Milford, EUA) e a fase móvel consistiu de uma solução aquosa de formiato de amônio 0,3 g L⁻¹ (eluente A) e metanol (eluente B). O gradiente da fase móvel iniciou com 80% do eluente A, sendo levado diretamente a 15% em 11 minutos, e a proporção foi mantida durante 1 minuto,

em seguida a composição foi levada à composição inicial (80% do eluente A) em 0,5 minutos e a proporção mantida até o final da corrida cromatográfica (tempo total de 14 minutos), vazão da fase móvel de 0,45 mL min⁻¹ e a temperatura do forno foi mantida em 60°C.

O sistema de detecção utilizado foi um espectrômetro de massas (MS) com analisador do tipo triplo quadrupolo, Xevo TQS (Waters, Milford, EUA), com interface por eletronebulização (ESI) e operado no modo positivo. Utilizou-se o modo monitoramento de reações múltiplas (MRM) e para a aquisição e processamento dos dados empregou-se o *software* MassLynx e TargetLynx, versão 4.1.

No MS foram utilizadas as seguintes condições: tensão do capilar 3,0 kV e temperatura do gás de dessolvatação (N₂) 400 °C. As vazões do gás de dessolvatação e do gás do cone de amostragem foram 500 e 150 L h⁻¹, respectivamente. A voltagem do cone de amostragem foi de 35 V e o fluxo do gás de nebulização foi de 7,0 L h⁻¹. Para a fragmentação dos íons, utilizou-se o gás argônio (fluxo do gás de colisão de 0,15 mL min⁻¹). As transições para quantificação e confirmação, voltagem do cone, energia de colisão e tempos de retenção para cada analito de interesse, estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Fungicidas e respectivos íon precursor, tempo de retenção, voltagem do cone, íon produto e energia de colisão no sistema UPLC-MS/MS com ESI no modo positivo e monitoramento de reações múltiplas (MRM).

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

2.4. Procedimento de extração

O extrato “branco” da matriz (isento dos analitos de interesse) foi obtido de amostras de laranja orgânica, adquiridas em propriedade particular, no interior do Estado do Rio Grande do Sul (RS), cujo cultivo não sofreu aplicação de agrotóxicos.

Pesou-se 15 g ($\pm 0,05$ g) de suco de laranja natural, em tubos de teflon® com capacidade de 250 mL, adicionou-se 30 mL de acetona, e a mistura foi submetida à homogeneização durante 20 segundos a 25200 g. Posteriormente, adicionou-se 15 g de sulfato de sódio anidro e a amostra foi novamente homogeneizada por 20 segundos a 25200 g, seguido da adição de 30 mL de éter de petróleo e 30 mL de diclorometano. Após homogeneização nas mesmas condições anteriores, o extrato foi centrifugado durante 3 minutos a 1451,5 g. Uma alíquota de 1,2 mL do extrato foi transferida para um tubo de evaporação e levada a banho de água, inicialmente à temperatura de 45 °C, e posteriormente elevada até 62 °C, até próximo à secura. O resíduo foi ressuspensionado em 1 mL de metanol acidificado contendo o P.I. propoxur na concentração de 40 ng mL⁻¹ e os extratos foram analisados por UPLC-MS/MS^[8].

2.5. Validação

Os parâmetros linearidade, exatidão (recuperações %), precisão (RSD%), limite de quantificação e efeito matriz (%) foram avaliados durante o estudo de validação do método analítico^[19].

A linearidade foi avaliada utilizando as soluções analíticas preparadas (conforme descrito no item 2.2) em solvente orgânico e em extrato da matriz e injetadas no sistema cromatográfico sete vezes (n=7). A partir dos valores médios das áreas dos picos obteve-se os coeficientes de determinação (r^2) e a faixa linear para cada fungicida.

Os valores de exatidão e precisão foram obtidos a partir do estudo de fortificação e recuperação em três níveis de concentração (10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e sete replicatas de cada nível (n=7).

O valor do LOQ, baseado nos valores de exatidão e precisão, foi definido como sendo o menor nível de fortificação que apresentou recuperação na faixa de 70 a 120% e $\text{RSD} \leq 20\%$ ^[20].

O efeito matriz foi determinado, em cada ponto da curva analítica, de acordo com a Equação 1, na qual são utilizadas as áreas dos picos para as soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e para as soluções analíticas preparadas em matriz, injetadas sete vezes (n=7) no sistema cromatográfico.

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \left[\left(\frac{\text{inclinação da curva em matriz}}{\text{inclinação da curva em solvente}} - 1 \right) \right] \times 100 \quad (1)$$

2.6. Análise de amostras reais

O método validado foi aplicado na análise de 20 amostras reais. Todas as amostras foram adquiridas na cidade de Santa Maria (RS).

Para a aplicação do método em suco natural foram adquiridas 15 amostras de laranja (1 kg de cada): cinco amostras em feira de produtos orgânicos e 10 amostras em dois supermercados (cinco amostras em cada supermercado). As amostras de suco processado (embalagens de 600 mL) dos tipos concentrado (duas amostras) e integral pasteurizado (uma amostra) foram adquiridos em outros dois supermercados diferentes. O suco diluído (duas amostras) foi preparado a partir das amostras do suco concentrado.

3. Resultados e discussão

3.1. Validação

Os resultados obtidos para as soluções dos fungicidas preparadas em solvente orgânico e em extrato “branco” da matriz, como o r^2 e o intervalo linear das curvas de calibração mostraram valores aceitáveis de acordo com o valor de r (coeficiente de correlação) igual ou superior a 0,99 ou acima de 0,90, recomendados respectivamente, pela ANVISA e pelo INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia)^[19,21]. Para todas as soluções dos fungicidas, os valores de r^2 foram maiores que 0,9964, tanto para

curva em solvente orgânico quanto em extrato “branco” da matriz. A Tabela 2 apresenta as equações da reta e os coeficientes de determinação para cada fungicida, em solvente orgânico e em extrato “branco” da matriz.

A precisão, em termos de repetibilidade, foi avaliada por estudo de recuperação em três níveis de

concentração, com sete repetições em cada nível. Os valores das recuperações e dos RSD% são apresentados na Tabela 3. Dos nove fungicidas estudados, seis (azoxistrobina, famoxadona, piraclostrobina, tebuconazol, tiabendazol e trifloxistrobina) apresentaram valores aceitáveis de recuperação (entre 70 e 120%) e

Tabela 2. Equações da reta e coeficientes de determinação (r^2) no estudo de linearidade para os fungicidas em solvente orgânico (metanol contendo 0,1% de ácido acético) e em extrato “branco” da matriz, com posterior análise por UPLC-MS/MS com ESI no modo positivo e monitoramento de reações múltiplas (MRM).

Fungicidas	Solvente orgânico		Extrato “branco” da matriz	
	Equação ($Y = ax + b$)	r^2	Equação ($Y = ax + b$)	r^2
Azoxistrobina	$Y = 21548x + 1747,9$	0,9985	$Y = 21484x + 1239,3$	0,9975
Carbendazim	$Y = 19616x + 902,69$	0,9981	$Y = 18866x + 4037,3$	0,9967
Difenoconazol	$Y = 7501,3x - 1347,2$	0,9995	$Y = 7569,1x - 1739$	0,9988
Famoxadona	$Y = 828,47x - 165,94$	0,9969	$Y = 749,15x - 139,83$	0,9978
Piraclostrobina	$Y = 8407,7x + 440,42$	0,9982	$Y = 8200,7x - 632,1$	0,997
Tebuconazol	$Y = 4295x + 314,39$	0,9985	$Y = 4256,2x + 103,41$	0,9976
Tiabendazol	$Y = 9349,5x - 479,92$	0,9996	$Y = 8241,6x - 694,81$	0,9995
Tiofanato-metílico	$Y = 10527x - 2758,7$	0,9964	$Y = 10101x - 1808,4$	0,9967
Trifloxistrobina	$Y = 18634x - 1810,9$	0,9988	$Y = 18463x - 484,57$	0,9986

Tabela 3. Recuperação média (%) para $n = 7$, desvio padrão relativo (RSD,%) e LOQ, para os nove fungicidas fortificados em extrato “branco” de matriz, nas concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Fungicidas	Níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR ^a (mg kg^{-1})
	10		20		50			
	Rec. média (%)	RSD (%)	Rec. média (%)	RSD (%)	Rec. média (%)	RSD (%)		
Azoxistrobina	116,7	5,1	105,9	3	100,3	5,8	10	15,0/15,0/0,5
Carbendazim	141,2	11	112,9	3,7	99,4	11,3	20	^b /0,2/5,0
Difenoconazol	89,1	35,5	102,3	2,4	99,8	5,9	20	0,6/0,1/0,5
Famoxadona	109,7	4,8	104,8	4,6	102,8	5,8	10	^b /0,02/0,05
Piraclostrobina	112,9	2,7	106,3	3,9	100,6	6	10	2,0/2,0/0,5
Tebuconazol	111,1	4,4	105,1	2,7	101,4	5,8	10	^b /0,9/5,0
Tiabendazol	118,3	2,6	108,9	2,6	100,8	6	10	10,0/5,0/10,0
Tiofanato-metílico	7,7	55,1	41,6	27,6	74,5	22,1	50	^b /0,05/5,0 ^c
Trifloxistrobina	112,9	2,7	107,8	2,6	102,5	6,3	10	0,6/0,3/0,2

^aUSDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos)/EU (União Européia)/ANVISA

^bFungicida proibido nos EUA

^cLMR do tiofanato-metílico é expresso como carbendazim

respectivos valores de RSD% ($\leq 20\%$) para o menor nível de fortificação ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) e dois (carbendazim e difenoconazol) apresentaram resultados aceitáveis para o nível de fortificação de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$. O fungicida tiofanato-metílico foi o analito que apresentou valores de recuperação mais baixos. Para o nível de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, a recuperação foi menor que 70%; já o valor de recuperação para o carbendazim ultrapassou 120%. À medida que os níveis de fortificação aumentaram, as recuperações para o tiofanato-metílico também aumentaram e para o carbendazim, os valores diminuíram.

De acordo com Guo et al.^[22] e Fernández et al.^[23], tiofanato-metílico quando submetido a condições tais como elevados valores de pH ($\text{pH} > 7$) ou temperatura elevada ($>40 \text{ }^\circ\text{C}$) é degradado rapidamente para carbendazim. Em matriz ácida, tal como suco de laranja (pH entre 3,0 e 4,5), o tiofanato-metílico e outros agrotóxicos tem apresentado mais estabilidade do que em matriz básica. No entanto, no procedimento de extração, o extrato foi aquecido em banho de água até $62 \text{ }^\circ\text{C}$ para remover o solvente apolar. Assim, o tiofanato-metílico mostrou baixas recuperações para os níveis de 10 e $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ enquanto que o carbendazim apresentou recuperação maior que 120% em $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Assim, uma hipótese que justifica os valores das recuperações para tiofanato-metílico e carbendazim é a possível degradação do primeiro, já que foi utilizada temperatura de $62 \text{ }^\circ\text{C}$ no método de extração.

Para o valor real do LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) considerou-se a menor concentração que, ao ser fortificada na matriz, apresentou valores de recuperação (%) e RSD (%) entre 70 e 120% e $\leq 20\%$, respectivamente.

Os valores de LOQ para cada um dos fungicidas, bem como os LMR no Brasil, nos EUA e na Europa, são apresentados na Tabela 3. Para seis dos nove fungicidas o LOQ foi de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ e dois apresentaram LOQ de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$.

De acordo com SANCO^[24], valores de recuperação entre 60 e 140% e $\text{RSD} > 20\%$, podem ser aceitos em alguns casos justificados, como em casos de degradação de compostos. Nesse caso, o LOQ para tiofanato-metílico pode ser aceito como $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ considerando sua possível degradação.

Para todos os fungicidas estudados, com exceção do tiofanato-metílico, o valor de LOQ obtido foi menor que o valor estabelecido pelas legislações nacional e internacional^[15,25,26]. O valor de LOQ obtido para o tiofanato-metílico ficou igual ao menor LMR (Europa).

O efeito matriz ocorre devido à co-eluição de compostos que interagem com os analitos no processo de ionização, produzindo a supressão ou o aumento do sinal analítico como consequência da competição entre os diferentes compostos (matriz/analitos) ionizados na superfície das gotas formadas na interface ESI^[27]. O número de íons do analito pode ser reduzido por interação com íons da matriz, o que é chamado de “supressão de íons”, ou aumentado pela presença dos íons da matriz, resultando em um efeito matriz negativo ou positivo, respectivamente^[28]. Dessa forma, o resultado do efeito matriz pode comprometer severamente uma análise quantitativa dos compostos presentes em quantidades vestigiais, bem como pode afetar grandemente a precisão e reprodutibilidade do método.

A avaliação do efeito matriz foi feita por comparação das inclinações das curvas analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato “branco” da matriz, de acordo com a Equação 1.

Todos os fungicidas estudados apresentaram percentuais de efeito matriz aceitáveis, ou seja, na faixa entre +20 e -20%, sem comprometer o resultado da análise (Figura 1). O efeito matriz é, em sua maioria, negativo, o que significa efeito de supressão do sinal analítico, diminuindo a intensidade do sinal pela interferência dos componentes da matriz.

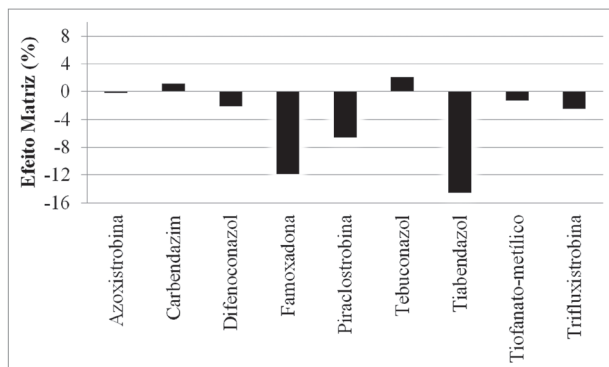


Figura 1. Percentual do efeito matriz ($n = 7$) para cada um dos nove fungicidas obtido por comparação das inclinações das curvas analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato “branco” da matriz suco de laranja natural.

3.2. Aplicação do método validado

A análise das 20 amostras reais proporcionou uma investigação preliminar acerca da possível presença de resíduos dos fungicidas estudados, tanto em sucos naturais quanto nos sucos processados que chegam à mesa do consumidor da cidade de Santa Maria (RS).

Todas as amostras (adquiridas em feira de produtos orgânicos e em quatro mercados diferentes) apresentaram resíduos de piraclostrobina, tebuconazol e trifloxistrobina.

O fungicida carbendazim foi encontrado no suco natural proveniente da feira e dos dois mercados, além do suco concentrado e integral de mercado.

Nas amostras de suco natural dos mercados foram encontrados os fungicidas azoxistrobina, difenoconazol e tiabendazol.

O fungicida tiofanato-metílico foi encontrado somente em suco natural proveniente da feira de produtos orgânicos.

Todos os fungicidas encontrados nas diferentes amostras apresentaram valores de concentração abaixo dos respectivos valores de LOQ. Estes, por sua vez,

estão abaixo dos LMR permitidos pelas diferentes legislações apresentadas neste trabalho. Cabe lembrar que os fungicidas carbendazim, tebuconazol e tiofanato-metílico, caso encontrados em concentração acima do permitido, podem comprometer a exportação do produto para os EUA, uma vez que a legislação americana não permite o uso destas substâncias.

Quanto às amostras de suco natural provenientes de feira de produtos orgânicos, nenhum traço de fungicida poderia ser encontrado.

4. Conclusão

O método de extração mini-Luke aliado ao moderno sistema UPLC-MS/MS foi eficiente para o método multirresíduo proposto neste estudo, com parâmetros de validação compatíveis com os valores exigidos em análises de matrizes alimentares para determinação de contaminantes.

Na aplicação do método para as 20 amostras de sucos natural e processado, todas apresentaram contaminação pelos fungicidas piraclostrobina, tebuconazol e trifloxistrobina, 90% das amostras apresentaram traços dos fungicidas tebuconazol, 30% das amostras apresentaram contaminação por carbendazim, 5% apresentaram os fungicidas azoxistrobina, difenoconazol, tiabendazol e tiofanato-metílico. Em nenhuma das amostras foi detectado o fungicida famoxadona.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES, ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro. Agradecimentos também ao NVWA (Autoridade Holandesa em Segurança Alimentar e do Consumidor) pelo apoio científico.

Referências

- [1] Galaverna G, Di Silvestro G, Cassano A, Sforza S, Dossena A, Drioli E, et al. A new integrated membrane process for the production of concentrated blood orange juice: Effect on bioactive compounds and antioxidant activity. *Food Chem.* 2008;106(2):1021–30.
- [2] PORTO SI, NETO AADO, SOUSA FOB DE. Acompanhamento da Safra de Laranja – 2013/2014 (Conab). 2013.
- [3] GLOBO. Suco: FDA encontra carbendazim em 11 amostras. 2012. [citado em 14 Dez 2015]. Disponível em: <http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2012/01/suco-fda-encontra-carbendazim-em-11-amostras.html>
- [4] Fernández R, Garrido AF, Martínez LJV, Romero RG, Hernández EMT e. One-year Routine Application of a New and Rapid Method Based on Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry to the Analysis of Selected Pesticides in Citric Fruits. *Anal Sci.* 2009;25:535–40.
- [5] Topuz S, Özhan G, Alpertunga B. Simultaneous determination of various pesticides in fruit juices by HPLC-DAD. *Food Control.* 2005;16(1):87–92.
- [6] Dreassi E, Zanfini A, Zizzari AT, La Rosa C, Botta M, Corbini G. Lc/Esi/Ms/Ms determination of postharvest fungicide residues in citrus juices. *LWT - Food Sci Technol.* 2010;43(9):1301–6.
- [7] Romero-González R, Garrido Frenich A, Martínez Vidal JL. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta.* 2008;76(1):211–25.
- [8] Hiemstra M, de Kok A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2007;1154(1-2):3–25.
- [9] Soler C, Mañes J, Picó Y. Routine application using single quadrupole liquid chromatography–mass spectrometry to pesticides analysis in citrus fruits. *J Chromatogr A.* 2005;1088(1-2):224–33.
- [10] Sagratini G, Mañes J, Giardiná D, Damiani P, Picó Y. Analysis of carbamate and phenylurea pesticide residues in fruit juices by solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2007;1147(2):135–43.
- [11] Radišić M, Grujić S, Vasiljević T, Laušević M. Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2009;113(2):712–9.
- [12] Borges KB, Figueiredo EC de, Queiroz MEC. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC; 2015. 263 p.
- [13] Gilbert-López B, García-Reyes JF, Mezcuca M, Molina-Díaz A, Fernández-Alba AR. Determination of postharvest fungicides in fruit juices by solid-phase extraction followed by liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2007;55(26):10548–56.
- [14] Singh SB, Foster GD, Khan SU. Determination of thiophanate methyl and carbendazim residues in vegetable samples using microwave-assisted extraction. *J Chromatogr A.* 2007;1148(2):152–7.

- [15] ANVISA. Monografia de agrotóxicos. [Citado em 14 Dez 2015]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos>
- [16] U. S. EPA. Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential. [Citado em 14 Dez 2015]. Disponível em: http://npic.orst.edu/chemicals_evaluated.pdf
- [17] UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. MEMORANDUM. [Citado em 14 Dez 2015]. Disponível em: http://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-128997_1-Jun-07_a.pdf
- [18] Rodrigues ET, Lopes I, Pardal MÂ. Occurrence, fate and effects of azoxystrobin in aquatic ecosystems: A review. *Environ Int.* 2013;53:18–28.
- [19] INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008 revisão 04-Jul/2011. 2011. [Citado em 12 Dez 2015]. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf
- [20] SANCO. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document No. 12495/2011, 2011.
- [21] ANVISA. Resolução-Re N° 899, de 29 de maio de 2003. [Citado em 12 Dez 2015]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publicação+do+Guia+para+validação+de+métodos+analíticos+e+bioanalíticos.pdf?MOD=AJPERES
- [22] Guo B, Huang Z, Wang M, Wang X, Zhang Y, Chen B, et al. Simultaneous direct analysis of benzimidazole fungicides and relevant metabolites in agricultural products based on multifunction dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2010;1217(29):4796–807.
- [23] Fernández M, Rodríguez R, Picó Y, Mañes J. Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of post-harvest fungicides in citrus fruits. *J Chromatogr A.* 2001;912:301–10.
- [24] SANCO. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document No. 10684/2009, 2009.
- [25] European Union (E.U.) Pesticides database. [Citado em 14 Dez 2015]. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database-redirect/index_en.htm
- [26] ELECTRONIC CODE OF FEDERAL REGULATIONS. U. S. Government Publishing Office. [Citado em 14 Dez 2015]. Disponível em: http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=a3b649316ccb17c31211db2edd81f789&mc=true&node=pt40.24.180&rgn=div5#se40.24.180_1412.
- [27] Niessen WMA, Manini P, Andreoli R. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 2006;25:881–99.
- [28] Martins GL, Friggi C a., Prestes OD, Vicari MC, Friggi D a., Adaime MB, et al. Simultaneous LC-MS/MS Determination of Imidazolinone Herbicides Together with Other Multiclass Pesticide Residues in Soil. *CLEAN - Soil, Air, Water.* outubro de 2014;42:1441–9.